

## Foliküler ve Luteal Faz Sırasında Elde Edilen Sığır Oositlerinin İn-Vitro Değerlendirilmesi\*

Güneş SERİN  
İlker SERİN  
Ahmet CEYLAN

Adnan Menderes  
Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi,  
Doğum ve Reprodüksiyon  
Hastalıkları Anabilim Dalı  
Aydın-TÜRKİYE

Bu araştırmada inek ovaryumlarından elde edilen oositlerin morfolojik yapı ve kalitelerine göre sınıflandırılması yapılmıştır. Bu amaçla mezbaha materyalinden elde edilen 105 adet ovaryum kesimden sonraki 2-4 saat içinde laboratuara ulaştırıldı. Ovaryum yüzeyindeki fonksiyonel yapıların inspeksiyonu ile siklus fazı belirlenen ovaryumlar folliküler (n=66), luteal (n=33) ve nonsiklik (n=6) olarak sınıflandırıldı. Aspire edilen kumulus hücre kompleksleri (COC) stereomikroskopta incelendi. Her bir COC belirtilen morfolojik kriterlere göre sınıflandırıldı. COC-A: çok sıralı (>3) kompakt kumulus hücreleri ile sarılı homojen ooplazma, COC-B: Koyu renkli ve daha az sıralı kumulus hücreli oosit, COC-C: Koyu renkli ve tamamen yayılmış ya da soyulmuş oosit.

A sınıfı (n=341), B sınıfı (n=374) ve C sınıfı (n=260) olmak üzere toplam 975 COC görüldü. Buna göre folliküler faz içerisindeki ovaryumlardan 3,52±0,38 adet A kalite, 3,42±0,28 adet B kalite ve 2,36±0,24 adet C kalite COC; luteal faz içerisindeki ovaryumlardan ise 2,79±0,51 adet A kalite, 3,82±0,41 adet B kalite ve 2,64±0,43 adet C kalite COC elde edildi. Folliküler ve luteal faz grubuna ait ovaryumlardan elde edilen A, B ve C sınıflarındaki ortalama COC sayıları arasında istatistiksel yönden fark gözlenmedi (p>0,05).

Sonuç olarak, seksüel siklus fazının elde edilen COC kalitesi üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı, in-vitro çalışmalar için her iki faza ait oositlerin kullanılabilmesi görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Oosit, COC, östrus siklusu, inek.

### In-Vitro Classification of Bovine Oocyte Recovered at Follicular and Luteal Phases

In this study, bovine oocytes were classified according to morphology and quality. A total of 105 ovaries recovered from slaughterhouse, 2-4 h to our laboratory. After inspection of the functional mass on the ovarian surface for determination of cyclic phases, ovaries were classified as follicular (n=66), luteal (n=33) and noncyclic (n=6).

Cumulus oocyte complexes (COCs) were aspirated and examined stereomicroscopically. Each COCs was assigned to one of three quality based groups on the appearance of the cumulus cells: COC-A: the oocytes with homogenous ooplasm surrounded by multilayer (>3 layers) compact and bright cumulus cells, COC-B: less compact and surrounded by a layer dark cumulus cells, and COC-C: strongly expanded cumulus with dark spots or denuded.

Totally 975 COCs, consisting of A class (n=341), B class (n=374) and C class (n=260) were determined. The mean COCs counts were 3.52±0.38 in A class, 3.42±0.28 B class and 2.36±0.24 C class in follicular phase group; 2.79±0.51 A class, 3.82±0.41 B class and 2.64±0.43 C class in luteal phase group. There was no significant difference between the mean COCs counts recovered from follicular and luteal ovarian phase (p>0,05).

In conclusion, there is no effect of ovarian phase on COCs quality and counts. Therefore, recovered oocytes from follicular and/or luteal phases are suitable for in-vitro studies.

**Key Words:** Oocyte, cumulus oocyte complex, estrus cycle, cows.

Geliş Tarihi : 30.11.2007  
Kabul Tarihi : 27.02.2008

Yazışma Adresi  
Correspondence

Güneş SERİN  
Adnan Menderes  
Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi,  
Doğum ve Reprodüksiyon  
Hastalıkları Anabilim Dalı  
Aydın-TÜRKİYE

guneserin@yahoo.com

### Giriş

Son yıllarda sığır oositlerinin in-vitro maturasyonu (IVM) ve in-vitro fertilizasyonu (IVF) alanında önemli aşamalar kaydedilmesine rağmen in-vivo üretimle karşılaştırıldığında elde edilen başarının oldukça düşük olduğu görülmektedir (1). İn-vitro embriyo üretiminde kullanılan kumulus oosit kompleksleri (COC) mezbahalardan siklus dönemi değerlendirilmeksizin toplanan ovaryumlardan elde edilebilmekte ancak bu hücrelerin birçoğu blastosist aşamasına erişmemektedirler (2, 3). İn vitro çalışmalarda daha kaliteli oosit seçiminin yapılması ile maturasyon ve blastosist gelişim oranlarının artırılabilmesi görülmektedir (2, 4).

\* IV. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 25-28 Ekim-2007, ANTALYA.

İneklerde seksüel siklus boyunca 2 ya da 3 adet folliküler dalga oluşmaktadır. Bu folliküler dalgaların sonucunda o sıklusa ait corpus luteumun (CL) lizisi şekillenmekte ve o dalgaya ait dominant follikül, progesteron hormonunun gonadotropinlerin üzerindeki inhibitörük etkinin kalkmasıyla ovulasyon şansını yakalamaktadır. Aktif CL bulunduğu dönemdeki folliküler dalgaya ait folliküller ise atreziye uğramaktadır (5). Bir kısım araştırmacı ovaryum üzerinde aktif CL ve dominant follikülün bulunmasına bağlı olarak değişecek östradiol, progesteron, FSH ve LH değerlerinin COC kalitesi etkileyerek IVM ve IVF başarısını etkileyebileceğini bildirmektedir (3, 6-8).

Oosit kalitesinin belirlenmesinde morfolojik özellikler ilk sırayı almaktadır. Elde edilen oositlerin morfolojik olarak sınıflandırılmasında kumulus hücreleri tabakalarının sayısı, yaygınlığı ve ooplazmanın yapısı ve rengi gibi kriterler kullanılmaktadır (3, 9, 10).

Bu araştırma mezbahe materyalinden elde edilen siklusun değişik fazlarındaki (folliküler ya da luteal) inek oositlerinin morfolojik yapılarının in-vitro değerlendirilmesi ve siklus fazının elde edilen oositlerin morfolojik kalitelerine etkilerinin olup olmadığının araştırılmasına yönelik tasarlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmada materyal olarak Aydın ili ve çevresindeki mezbahalardan temin edilen 105 adet inek ovaryumu kullanıldı. Bu ovaryumlar sıcaklığı 30-35 °C olan penisilin (100 IU/ml) -streptomisin (100 µg/ml) katkılı serum fizyolojik içerisinde termos kap vasıtasıyla kesimden sonraki 2 saat içerisinde laboratuara ulaştırıldı. Yüzeyindeki fonksiyonel yapıların inspeksiyonu ile siklus dönemi tahmin edilen ovaryumlar; folliküler (n=66), luteal (n=33) ve nonsiklik (n=6) olarak sınıflandırıldı.

#### *Oosit kaynağı olan ineklerin seksüel siklus fazının belirlenmesi*

Labortauvara getirilen ovaryumlar inspeksiyon yöntemi ile aşağıdaki kriterlere göre folliküler, luteal ya da nonsiklik olarak değerlendirildi.

**Luteal faz:** Değişik büyüklüklerde kırmızımsı, portakal ya da kahverengi CL barındıran ovaryumlar.

**Foliküler faz:** Regrese olmuş ve soluk rengi ile tanınabilen CL ile dominant follikülü barındıran ovaryumlar.

**Nonsiklik Ovaryumlar:** Yüzeyinde herhangi bir fonksiyonel yapı (değişen boyutlardaki folliküler yapılar ve/veya corpus luteum) görülmeyen ovaryumlar.

#### **Oositlerin elde edilmesi**

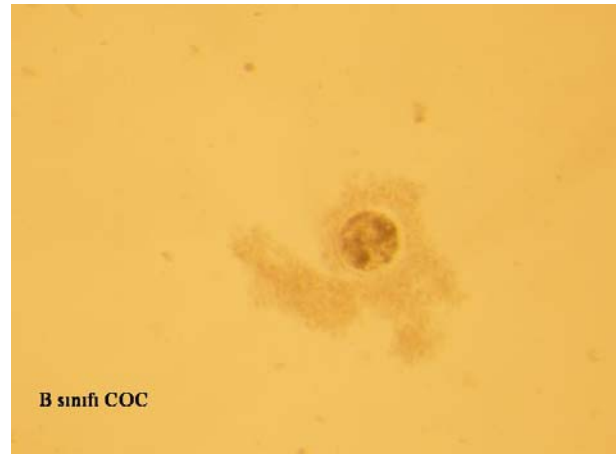
Oositler ovaryum yüzeyinde bulunan 3-8 mm çaplı antral folliküllerden 10 ml'lik steril enjektöre bağlı 18 G iğne ile aspire edilerek elde edildi. Aspire edilen kumulus hücre kompleksleri PBS ile 3 kez yıkanarak stereomikroskopta aşağıdaki morfolojik kriterlere göre değerlendirildi (Wit ve ark., 2000).

**A sınıfı COC:** Oositin etrafını en az 3 sıra halinde tam olarak çevreleyen temiz, berrak cumulus hücreleri ile saydam ve homojen ooplazmaya sahip oositler (Şekil 1).



**Şekil 1.** A sınıfı COC'nin steriomikroskopik görüntüsü

**B sınıfı COC:** Kompakt ve koyu renkli en az 3 sıra halinde oositi çevreleyen cumulus hücreleri ile koyu renkli homojen olmayan ooplazmaya ve bu ooplazmayı çevreleyen koyu renkli corona radiataya sahip oositler (Şekil 2).



**Şekil 2.** B sınıfı COC'nin steriomikroskopik görüntüsü

**C sınıfı COC:** Düzensiz, kümeler halinde ekspande olmuş cumulus hücreleri ile homojen olmayan ooplazmaya sahip oositler (Şekil3).



**Şekil 3.** C sınıfı COC'nin steriomikroskopik görüntüsü

A, B ve C sınıfı oosit sayıları bakımından, folliküler ve luteal faz döneminde elde edilen ortalamalar arasında istatistiksel yönden bir fark olup olmadığını belirlemek için Mann-Whitney U Testi yapıldı.

### Bulgular

Araştırmada nonsiklik ovaryumlar değerlendirilmeye alınmazken folliküler ve luteal faza ait COC 'lerinin kalite yönünden sınıflandırılması ve bu sınıflandırmalara ait ortalama oosit sayıları Tablo 1'de sunulmuştur. Buna göre araştırmada kullanılan tüm ovaryumlardan A sınıfı (n=341), B sınıfı (n=374) ve C sınıfı (n=260) olmak üzere toplam 975 COC elde edilmiştir. Siklus dönemine göre folliküler faz içerisindeki ovaryumlardan 3,52±0,38 adet A kalite, 3,42±0,28 adet B kalite ve 2,36±0,24 adet C kalite COC, luteal faz içerisindeki ovaryumlardan ise 2,79±0,51 adet A kalite, 3,82±0,41 adet B kalite ve 2,64±0,43 adet C kalite COC elde edilmiştir. A, B ve C sınıflarındaki COC sayıları bakımından her iki faz grubuna ait ovaryumlardan elde edilen ortalama değerler arasında istatistiksel yönden fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 1.** Ovaryumlardan (n=105) elde edilen A, B ve C sınıfı COC ortalama sayıları.

	A sınıf (n=341)	B sınıf (n=374)	C sınıf (n=260)
<b>Foliküler faz</b>	3,52±0,38	3,42±0,28	2,36±0,24
<b>Luteal faz</b>	2,79±0,51	3,82±0,41	2,64±0,43
<b>Önemlilik</b>	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil ( $p > 0,05$ )

### Tartışma

Bu çalışmada farklı siklus fazlarına ait mezhiba materyalinden elde edilen COC 'lerin morfolojik yönden sınıflandırılması yapılmış ve siklus fazının COC kalitesi üzerindeki olası etkisi araştırılmıştır.

İn vitro çalışmalarda kullanılan COC'lerin morfolojik yönden değerlendirilmesi ilk kez Leibfried ve First (11) tarafından yapılmış bundan sonra da çok sayıda araştırmacı oositi saran cumulus hücre katmanlarının sayısı, bütünlüğü ve oositin genel görünümüne dayanarak COC'i sınıflandırmıştır (12-14). Buna göre

saydam ve homojen ooplazmalı oosit bulunan ve etrafında en az 3 katmanlı cumulus hücresi bulunan A kalite komplekslerin en yüksek gelişim potansiyeline sahip olduğu görülmüştür (15). Yine intrafolliküler progesteron ve androjen konsantrasyonu yüksek olan atretik folliküllerden elde edilen COC'lerinin östradiolden zengin büyük antral folliküllerde bulunan COC'lere oranla in vitro fertilizasyon başarısının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (16). Östrus siklusu içerisinde en yüksek COC-A sayısına ulaşabilmek için ovaryum üzerindeki değişkenlerin etkisi çok sayıda araştırmacının konusunu oluşturmuştur.

Wit ve ark., (3) follikül kalitesinin COC kalitesi ile paralel seyrettiğini, atrezi derecesi düşük folliküllerden daha fazla sayıda COC-A, atretik folliküllerden ise artan ölçüde B ve C kalite COC elde edildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, siklus fazının COC kalitesi dağılımı ve blastosist oluşum oranı üzerinde önemli derecede etkisi olmadığını kaydetmişlerdir. Bu araştırmada siklusun dönemlerine göre elde edilen ortalama COC sayıları folliküler fazda 7,0, erken luteal fazda 6,7 ve geç luteal fazda 6,6 adet bulunduğunu, yapılan istatistiksel değerlendirmede de seksüel siklus evresinin elde edilen oosit kalitesi üzerinde bizim çalışmamızla paralel olarak bir etkisinin bulunmadığı bildirilmektedir.

Machatkova ve ark., (8) yaptıkları araştırmalarında da in vitro çalışmalarda kullanılabilir kalitedeki oosit sayısının siklusun fazından etkilenmediğini ancak follikül büyüklüğünün elde edilen embryo sayısına direkt olarak etki ettiğini bildirmektedirler. Aynı araştırmada gelişen follikül döneminden elde edilen oositlerin gelişme kapasitelerinin dominant follikül döneminde elde edilen oositlerden daha fazla olduğu da söylenmektedir.

Vassena ve ark., (10) CL bulunan ovaryumlarda kontralateral ovaryuma oranla C kalite COC sayısında azalma, bununla birlikte dominant follikül bulunan ovaryumlarda ise C kalite COC sayısında artış gözlemlenmiştir. Ancak bu değişim A ve B kalite COC'lerinde gözlenmemiştir. Folliküler dalganın 2, 3, 5 ve 7. günlerinde elde edilen sağlıklı COC'lerinin fertilizasyon sonuçlarında belirgin bir farklılık bulunmadığını belirtmişlerdir.

Salamone ve ark., (6) ise folliküler fazın farklı dönemleri içerisinde elde edilen COC'lerin fertilizasyon başarısını etkilediğini bildirmektedir. Araştırmacılar folliküler regresyon döneminde COC-B sayısında anlamlı bir artış kaydetmişlerdir. Folliküllerin gelişme ve statik fazında ağırlıklı sayıda COC-A ver COC-C elde edilmesine rağmen, maksimum morula üretimi COC-B eldesinin yüksek olduğu regresyon fazında gerçekleşmiştir.

Varisanga ve ark., (4) çalışmaları sırasında COC'lerini sağlıklı, dejenere ve çıplak olmak üzere 3 grupta incelemişler ve yapısında dominant follikül ya da CL gibi aktif bir yapı bulunmayan (nonsiklik) ovaryumlardan elde edilen oositlerin in-vitro gelişimlerinin daha zayıf olduğunu gözlemlenmişlerdir.

Knuth ve Hunter (17) yaptıkları çalışmalarında olgun corpus luteum (CL) bulunan ovaryumlardan elde edilen oositlerin fertilizasyon oranlarının gelişen CL bulunan ya da CL bulunmayan ovaryumlardan elde edilen oositlerin fertilizasyon oranlarından daha düşük bulunduğunu bildirmektedirler. Yine Boedino ve ark. (18) aynı şekilde fertilize olan oositlerdeki bölünme oranlarının da daha düşük olduğunu rapor etmektedirler.

Benzer şekilde gebe olan ya da olmayan ineklerden elde edilen oositlerin bölünme oranları bakımından da farklı yayınlar bulunmaktadır. Örneğin Behboodi ve ark. (19) ile Vajta ve ark. (20) gebe olmayan ineklerden elde edilen oositlerin bölünme oranlarını gebelerden daha yüksek olarak bildirirlerken Sivakumaran ve ark. (21) gebe inek oositlerinin bölünme oranlarını diöstrüs ve anöstrüsteki inek oositlerinden daha yüksek belirtmektedirler.

### Kaynaklar

1. Farin PW, Crosier AE, Farin CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 2001; 55:151-170
2. Leibfried-Rutledge ML. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology* 1999; 51: 473-485
3. Wit AAC, Wurth YA, Kruip AM. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci* 2000; 78: 1277-1283.
4. Varisanga MD, Sumantri C, Murakami M, Fahurdin M, Suzuki T. Morphological classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for IVF produced bovine embryos. *Theriogenology* 1998; 50: 1015-1023.
5. Noakes DE. Endogeneous and exogenous control of ovarian cyclicity In: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. (Editors). *Arthur's veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th Edition Philadelphia: Saunders: 21. 2003
6. Salamone DF, Adams GP, Mapletoft RJ. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology* 1999; 52: 549-561.
7. Hagemann LJ, Beaumont SE, Berg M, Donnison MJ, Ledgard A, Peterson AJ Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage follicle size and atresia. *Mol Reprod Dev* 1999; 53: 451-458.
8. Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 2004; 61: 329-335.
9. Goeseels SB, Panich P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 2002; 71: 143-155.
10. Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP. Morphology and development competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 2003; 60: 923-932.
11. Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 1979; 48: 76-86.
12. De Loos FAM, van Vliet C, van Maurik P, Kruip THAM. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* 1989; 24: 197-204.
13. Yang YB, Lu KH. The influence of bovine oocyte type on invitro fertilization and subsequent in vitro development. *Theriogenology* 1990; 33: 355.
14. Hazeleger NL, Stubbings RB. *Developmental potential of selected bovine oocyte cumulus complexes*. *Theriogenology* 1992; 37: 219.
15. Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology* 1995; 43: 509-522.
16. Smith LC, Olivera-Angel M, Grome NP, Bathia B, Price CA. Oocyte quality in small antral follicle in the presence and absence of a large dominant follicle in cattle. *J Reprod Fert* 1996; 106: 193-199.
17. Knuth KM, Hunter AG. Effects of a corpus luteum and source of mineral oil overlay on in-vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *J Dairy Sci* 1996; 79 (Suppl-1): 147.
18. Boedino A, Rajamahendran R, Saha S, Sumantri C and Suzuki T. Effect of presence of CL on ovary on the oocyte number, cleavage rate and blastocyst production in-vitro in cattle. *Theriogenology* 1995; 43: 169.
19. Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH. Development of in-vitro fertilized oocytes from pregnant and non pregnant cows in oviductal epithelial and cumulus cell coculture systems. *Theriogenology* 1992; 38: 1077-1084.
20. Vajta G, Machaty Z, Barandi ZS, Varga ZS. Embryos derived from the in-vitro fertilization of oocytes of pregnant cows. *Theriogenology* 1992; 37: 811-815.
21. Sivakumaran K, Calder M, Rajamahendran R. The influence of reproductive status of bovine on oocyte number and maturation in-vitro and the effect of coculture systems on fertilization and subsequent development. *J Anim Sci* 1991; 69 (Suppl.): 438.