

# Kedi Oositlerinin İn Vitro Olgunlaştırılması Üzerine Gonadotropinlerin Etkisi

Mithat EVECEN, Alper BARAN

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, 34851, İstanbul - TÜRKİYE

Çağatay TEK

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 34851, İstanbul - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 25.07.2001

**Özet:** Çalışmada kedi oositlerinin in vitro olgunlaştırılması üzerine, FSH ve LH hormonlarının olgunlaşma oranları üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmanın materyalini, kısırlandırılmış kedilerin ovaryumlarından kazanılan oositler oluşturdu. Ovaryumlar iki saatlik süre içerisinde +4 °C'deki PBS solüsyonu içerisinde laboratuara taşındı. Kazanılan oositler 1. Grup (Kontrol): TCM 199+% 5 FCS+2,2 gr/lit NaHCO<sub>3</sub>+0,23 mM Na Pyruvate, 2. Grup (Deneme): TCM 199+% 5 FCS+2,2 gr/lit NaHCO<sub>3</sub>+0,23mM Na Pyruvate+FSH (Sigma F-2293) (1 µg/ml)+LH (Sigma L-5269) (1 µg/ml), medyum gruplarında % 5 CO<sub>2</sub> ve % 100'e yakın nem'in sağlandığı 38,5 °C'lik inkübatör ortamında 48 saat süre ile olgunlaşmaya bırakıldı. Bu sürecin sonunda, oositler fikse edildi ve boyandı. Faz-kontrast mikroskopta x400 büyütmede olgunlaşma durumları saptandı. Veriler t testi yöntemiyle karşılaştırıldı ve önemlilik kontrolü gerçekleştirildi. Kontrol grubunda 203 ve deneme grubunda 225 adet olmak üzere toplam 428 adet oosit kullanıldı. Kontrol grubundaki oositlerden 11 tanesinin (% 5,4) M I, 2 tanesinin (% 0,98) anafaz I ve 2 tanesinin de (% 0,98) M II dönemine ulaştığı saptandı. Hormon katkılı grupta gözlenen bu değerler sırasıyla; 25 (% 11,11), 0 (% 0,00), 6 (% 2,66), olarak belirlendi. Kontrol ve hormon katkılı grupların yapılan istatistiksel karşılaştırmalarında bu parametreler arasında herhangi bir fark bulunmadı (p>0,05). Ancak mayozta devam eden oositler (M I+M II) yönünden yapılan karşılaştırmada ise hormon katkılı grupta bulunan % 31,55'lik değer ile kontrol grubundaki % 22,66'lık değer arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (p<0,05). Sonuç olarak, kedi oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında kültür medyumuna gonadotropin (FSH+LH) katılmasının olgunlaşmayı destekleyici bir etki yaptığı söylenebilir.

**Anahtar Sözcükler:** Kedi, Oosit, İn Vitro Olgunlaşma, Gonadotropin

## The Effects of Gonadotrophins on In Vitro Maturation of Cat Oocytes

**Abstract:** The aim of this study was to determine the effects of FSH and LH hormones on in vitro development of cat oocytes. The ovaries from spayed cats were brought to the laboratory in +4 °C PBS solution two hours after being collected. The oocytes were recovered by slicing of ovaries and were separated into two groups: Group 1 (Control); TCM 199 + 5% FCS + 2.2 g/l NaHCO<sub>3</sub> + 0.23 mM Na Pyruvate; and Group 2 (Treatment); TCM 199 + 5% FCS + 2.2 g/l NaHCO<sub>3</sub> + 0.23mM Na Pyruvate + FSH (Sigma F-2293) (1 µg/ml) + LH (Sigma L-5269) (1 µg/ml). Oocytes were matured for 48 hours at 38.5 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. At the end of this period oocytes were fixed, stained and evaluated for maturation criteria by phase-contrast microscope at x400 magnification. Data were analyzed statistically by Student's *t* - test.

A total of 428 oocytes (Control: 203; Treatment: 225) were used. Eleven of the control group oocytes were at M I (5.4%), 2 (0.98%) were at anaphase I and 2 (0.98%) were at M II stage. These values for the treatment group were 25 (11.11%), 0 (0.00%) and 6 (2.66%), respectively. There was no statistical difference between the control and hormone added groups (p>0.05). For the oocytes which continued to undergo meiosis, the difference between the groups (Control: 22.66%; Treatment: 31.55%) was statistically significant (p<0.05). In conclusion, it may be suggested that addition of gonadotrophins (FSH+LH) to the maturation media supports in vitro maturation of cat oocytes.

**Key Words:** Cat, Oocyte, In Vitro Maturation, Gonadotrophins

## Giriş

Bugün dünyada bulunan 36 vahşi kedi türünün (1) ve ülkemize özgü olan Van ve Ankara kedilerinin nesli tükenme tehdidi altında bulunmaktadır. İlk defa 1988 yılında, in vivo olgunlaşmış oositler kullanılarak in vitro

fertilizasyon yöntemiyle elde edilmiş kedi embriyolarının ovidukta transferi yoluyla kedi yavruları doğmuştur (2). Bu alandaki çalışmalar, son yıllarda özellikle nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya bulunan kedigiller için iyi bir model oluşturabilecek olan evcil kediler üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır (1,3,4).

Pope ve ark. (3) 1997 yılında in vitro olgunlaştırdıkları kedi oositlerinin in vitro fertilizasyonu, kültürü ve transferini müteakip dört adet yavru kedi elde etmeyi başarmışlardır.

İn vitro fertilizasyon teknikleri ile, kısırlaştırılan veya hastalık ve benzeri nedenlerden dolayı ölen kedilerin ovaryumlarından, embriyo elde edilmesi mümkün olabilmektedir (1,3,5-7).

Memeli ovaryumlarında mitoz bölünme, fetal yaşamın ilk döneminde başlar fakat, doğumdan önce veya hemen sonra 1. mayoz bölünmenin profaz safhasında durur. Bu dönemde GV (Germinal Vezikül) olarak adlandırılan yapı oluşmuştur. Mayoz bölünme in vivo ortamda puberteye birlikte, hipofiz'den salınan gonadotropinlerin etkisiyle kaldığı yerden devam eder. Ovaryumlarda farklı gelişim dönemlerinde bulunan primer oositlerin fertilize olabilmesi için; oosit nüklear membranının yıkılması (GVBD), kromozomların iki homolog set oluşturması, bunlardan bir set'inin sitoplazma ile perivitellin boşluğa, birinci polar cisim olarak atılması gerekmektedir. Böylece birinci mayoz bölünme tamamlanmış olur ve oosit olgunlaşarak sekonder oosit adını alır (8-11).

Bazı araştırmacılar, memeli oositlerinde in vitro olgunlaştırma amacıyla medyuma çeşitli hormonların katılmasının oositlerin M II aşamasına olgunlaşması üzerine olumlu katkılar sağladığını bildirirken (5-7,12), bazıları da bu etkinin önemli olmadığını bildirmişlerdir (13,14).

İn vivo ortamda oosit gelişimi esnasında birtakım molekül dizilerinin sentezlenmesi ve depolanması gerektiği, depolanan bu ürünlerin olgunlaşma sırasında ancak bir uyarıcı tarafından uyarılmak suretiyle tekrar kullanılabilirdiği ve bu uyarıcının da endojen gonadotropin salınımı olduğu bildirilmiştir (15).

Memeli oositlerinin in vitro olgunlaşmasında kumulus hücreleri ile oosit arasında intersellüler bir ilişki olduğu ve bu ilişkinin olgunlaşmayı sağlamada aktif rol oynadığı bildirilmiştir. İn vitro ortamda, kumulus hücrelerine sahip oositlerin, medyumdan bu hücreleri uzaklaştırılmış olanlardan çok daha fazla miktarda leucyne, uridine, choline ve inositol kullandıkları bildirilmiştir. Aynı zamanda bu hücrelerin diğerlerinden çok daha yüksek oranlarda gelişebildikleri saptanmıştır. Buna karşın kumulus hücreleri ile oosit arasındaki bu ilişkinin nasıl geliştiği henüz aydınlatılamamıştır (11).

Kedi oositlerinin in vitro olgunlaştırılması üzerine çalışmaların yeni olması ve henüz istenilen düzeyde başarılı sonuçların alınamaması, bu konudaki çalışmalara daha fazla eğilmek gerekliliğini doğurmaktadır (3,6).

Günümüzde yapılmış olan çalışmalarda elde edilen sonuçlar yeterince tatminkar olamamış ve kedi oositlerinin in vitro olgunlaştırılması için standart bir yöntem geliştirilememiştir. Bu nedenle, sunulan çalışmada Hepes modifikasyonlu TCM 199 medyumuna ilave edilen FSH ve LH hormonlarının kedi oositlerinin in vitro olgunlaşmalarına etkisi araştırıldı.

## Materyal ve Metot

Ovaryumlar ovario-histerektomi yapılmış, ortalama 2-3 yaşlı ve 2-4 kg. ağırlığa sahip sokak kedilerinden alınarak +4 °C'deki PBS solüsyonunda 2 saat içerisinde laboratuvar ortamına getirildi. Ovaryumların yüzeyine bistüri yardımıyla kesitler atılmak suretiyle 38 °C'deki PBS solüsyonu yardımıyla saat camına yıkandı. Hemen ardından HEPES modifikasyonlu % 5 FCS içeren TCM 199 (Sigma, M 2520) medyumunu içeren yıkama petrilere aktarılan oositler burada 3 kere pasajlanarak yıkandılar. İn vitro maturasyon için ayrılacak oositlerin seçiminde; sağlam bir zona pellusida, en az 4 sıra kumulus hücresi, homojen ve zona içini dolduran vitellus varlığı kriterleri göz önünde tutuldu (3).

Her iki çalışma grubu için önceden hazırlanmış ve 38 °C'lik ısı ve % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatör ortamında bekletilen farklı olgunlaştırma medyumunu (Hepes Modifikasyonlu TCM 199, Sigma M-2520) gruplarına aktarıldı. Kazanılan oositler 1. Grup (Kontrol): TCM 199+% 5 FCS, 2,2 gr/lit NaHCO<sub>3</sub>+0,23 mM Na Pyruvate ( pH: 7,3; Ozmolarite: 286 mOsmol), 2. Grup (Deneme): TCM 199+% 5 FCS, 2,2 gr/lit NaHCO<sub>3</sub>+0,23mM Na Pyruvate+FSH (Sigma F-2293) (1 µg/ml)+LH (Sigma L-5269) (1 µg/ml) (pH: 7,3; Ozmolarite: 286 mOsmol), % 5 CO<sub>2</sub> ve % 100'e yakın nem'in sağlandığı 38,5 °C'lik inkübatör ortamında 48 saat süre ile olgunlaşmaya bırakıldı. Her bir 500 µl'lik bölmeye 10-15 oosit konuldu. 48 saatlik olgunlaşma sonunda (Şekil 1), oositlerin kumulus hücreleri pastör pipeti yardımıyla mekanik olarak uzaklaştırıldı. Ardından % 0,7'lik KCl solüsyonunda 3-5 dakika bekletildikten sonra lam-lamel arasında sıkıştırılarak sabitlendi. 1:3 asetik asit-etanol solüsyonu içerisinde 24 saat fikse edilen preparatlar, % 2'lik aseto-orsein ile boyandıktan sonra faz-kontrast mikroskopta kromatin ve kromozom yapıları

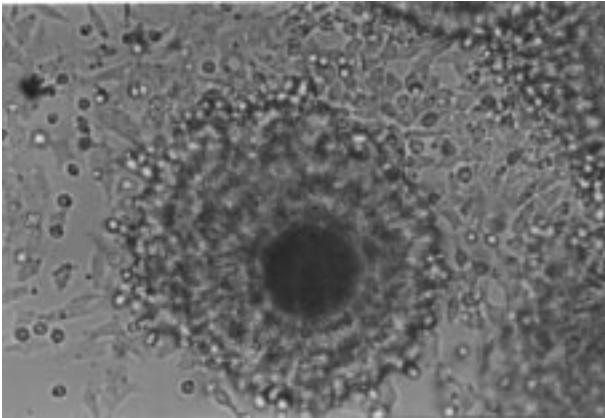
gözlenmek suretiyle olgunlaşma durumları saptandı. Çalışma süresince 10 adet dişi kediden 428 adet oosit elde edildi. Bunların 203 adedi kontrol grubu, 225 adedi ise deneme grubunda (hormon katkılı) kullanıldı.

İstatistiksel açıdan gruplar arasındaki fark, *t-testi* kullanılarak değerlendirildi.

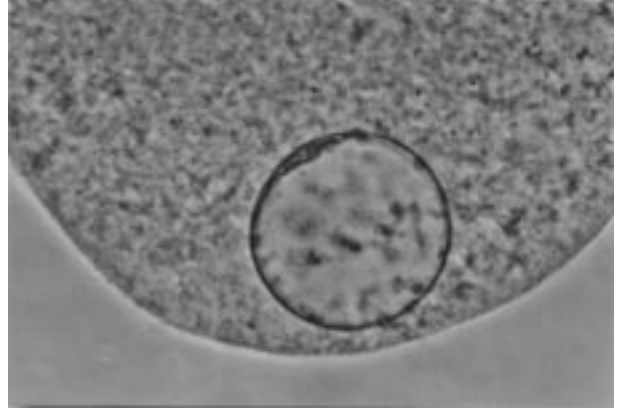
### Bulgular

Araştırma süresince 10 kez tekrarlanan çalışmada 10 adet kediden, toplam 428 adet kullanılabilir kalitede oosit toplandı. Oositlerin olgunlaştırıldığı kontrol grubunda (n=203), 94 oosit (% 46,3) germinal vezikül (GV) döneminde (Şekil 2) kalırken 31 oosit (% 15,27) diyakinez, 11 tanesi (% 5,4) M I (Şekil 3), 2 tanesi (% 0,98) anafaz I (Şekil4) ve 2 tanesi (% 0,98) M II (Şekil 5) dönemine ulaştı. Bu gruptaki oositlerin 15'i (% 7,38) partenogenetik (Şekil 6) bölünme gösterdi. Yapılan incelemede dokuz tanesi (% 4,43) içerisinde herhangi bir kromozom yapısına rastlanmazken (UDNM: Undetermined Nuclear Material: Tanımlanamayan Çekirdek Materyali), 39'unun da (% 19,21) dejenere olduğu saptandı.

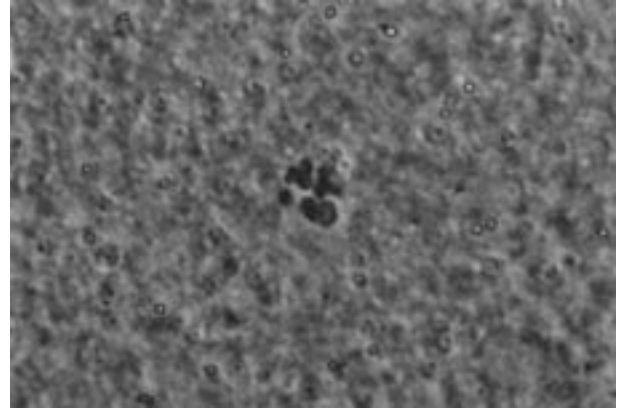
Hormon katkılı gruptaki (n=225) GV, diakinez, M I, anafaz I, M II, partenogenetik, UDNM ve dejenere oosit sayıları sırasıyla; 92 (% 40,88), 40 (% 17,77), 25 (11,11), 0 (% 0,00), 6 (% 2,66), 13 (% 5,77), 16 (% 7,11) ve 33 (% 14,66) olarak gözlemlendi (Tablo 1). Kontrol ve hormon katkılı grupların yapılan istatistiksel karşılaştırmalarında bu sekiz parametre arasında herhangi bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).



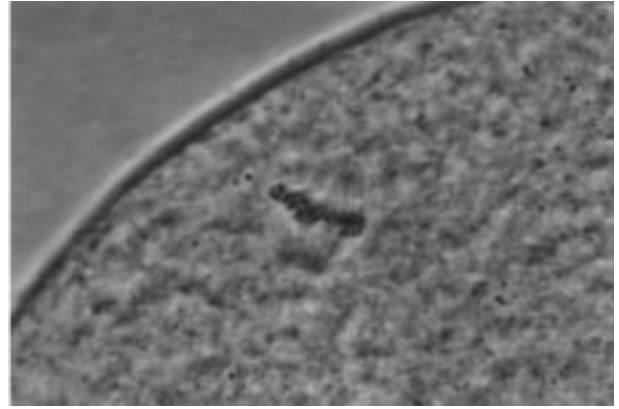
Şekil 1. 48 saatlik In Vitro Olgunlaşma Sonrası Kumulus Ooforus Görüntüsü (x20 Büyütme).



Şekil 2. Germinal Vezikül Döneminde Bir Oosit (x40 Büyütme).



Şekil 3. Metafaz I Aşamasında Bir Oosit (x40 Büyütme).



Şekil 4. Anafaz I Aşamasında Bir Oosit (x40 Büyütme).

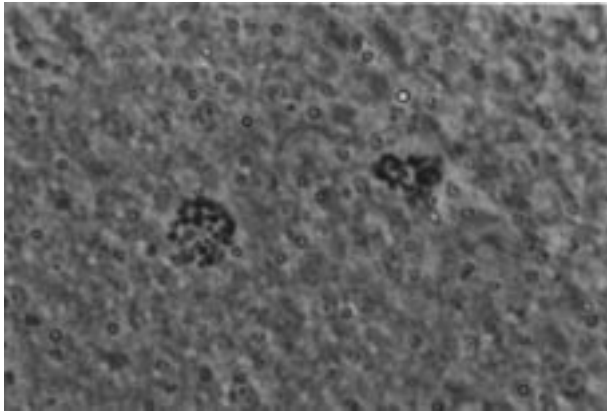
Çalışmada 48 saatlik olgunlaşma süresinin sonunda kontrol ve hormon katkılı gruplarda sırasıyla 46 (% 22,6) ve 71 (% 31,55) oositin mayozu devam (Diakinez+M I+Anafaz I+M II) ettiği gözlemlendi (Tablo 2). Gruplar

Tablo 1. Kedi oositlerinin 48 saatlik İn Vitro olgunlaştırma sonrası ulaştıkları gelişim safhaları ve oranları.

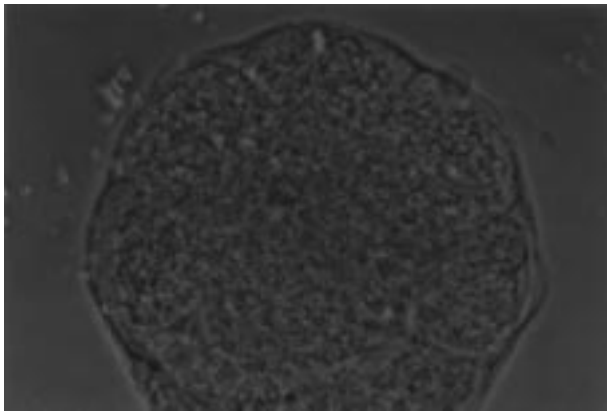
Gruplar	GV (%)	Diak. (%)	M I (%)	A I (%)	M II (%)	Part. (%)	UDNM (%)	Dej. (%)
Kontrol n=203	94 (46,30)	31 (15,27)	11 (5,41)	2 (0,98)	2 (0,98)	15 (7,38)	9 (4,43)	39 (19,21)
Hormon (FSH+LH) n=225	92 (40,88)	40 (17,77)	25 (11,11)	0 (0,00)	6 (2,66)	13 (5,77)	16 (7,11)	33 (14,66)

GV: Germinal Vezikül, Diak.: Diakinez, M I: Metafaz I, A I: Anafaz I, M II: Metafaz II

Part: Partenogenetik, UDNM: Undetermined Nuclear Material (Belirlenemeyen Çekirdek Materyali), Dej.: Dejenere.



Şekil 5. Metafaz II Aşamasında Bir Oosit (x40 Büyütme).



Şekil 6. Partenogenetik Bölünmüş Bir Oosit (x20 Büyütme).

arasında yapılan karşılaştırmalarda hormon katkılı gruptakilerin, kontrol grubundakilere nazaran istatistiksel olarak önem teşkil edecek şekilde yüksek olduğu saptandı ( $p<0,05$ ).

Tablo 2. 48 saatlik İn Vitro olgunlaştırma sonrasında mayoz aktivasyonu gösteren oositlerin oranı.

Gruplar	Mayoza Devam Edenler (Diak., M I, A I, M II) (%)
Kontrol n=203	46 (22,66) <sup>b</sup>
Hormon (FSH+LH) n=225	71 (31,55) <sup>a</sup>

( $p<0,05$ ) dikey kolonlarda değişik harf taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir.

(Diak: Diakinez, M I: Metafaz I, A I: Anafaz I, M II: Metafaz II)

## Tartışma

Memeli oositlerinin in vitro maturasyonu üzerine, medyuma gonadotropin katılmasının gerekli olup olmadığı konusu henüz yeterince açık değildir. Kısırlaştırılmış kedilerin ovaryumlarından elde edilen primer oositlerin in vitro olgunlaştırıldıkları bu çalışmanın kontrol ve gonadotropin katkılı (FSH+LH) çalışma grubunda M II dönemine ulaşan oositlerin oranları arasındaki farkların istatistiki açıdan önemli olmadığı saptandı ( $p>0,05$ ). Bu bulgular, siğir ve koyun oositlerinin in vitro olgunlaştırılması çalışmalarında M II ye ulaşma yönünden oositler üzerine gonadotropinlerin etkisiz olduğu sonucunu bulan Pabuççuoğlu (13) ile Birler ve ark. (14)'in bulgularıyla bağdaşmaktadır. Ancak çalışmanın kontrol ve gonadotropin katkılı deneme grubunda, mayoza devam eden (Diakinez+M I+Anafaz I+M II) oosit oranları sırasıyla, % 22,66 ve % 31,55 olarak gerçekleşti ve aradaki bu farkın, hormon katkılı grubun lehine olmak üzere istatistiki açıdan önem taşıdığı saptandı ( $p<0,05$ ).



Çalışmanın hormon katkılı grubunda bulunan % 31,5'lik (Diakinez+M I+Anafaz+M II) değer, kedi oositlerinin in vitro olgunlaştırılması çalışmalarında olgunlaşma medyumuna FSH ve LH katan ve bunun yararlı olduğunu bildiren Schramm ve Bavister (5)'in (% 64), Johnston ve ark. (7)'in (% 62,5), Wolfe ve Wildt (16)'in (>% 61) ve Pope ve ark. (3)'ünün (>% 60) buldukları değerlerin oldukça altında gerçekleşti.

Foliküler dönemdeki kedi ovaryumlarından elde edilen oositlerin, anöstrus ve lüteal dönemdekilerden elde edilenlere nazaran daha yüksek oranda olgunlaşma kabiliyeti gösterdiklerini bildiren Johnston ve ark. (7), kedi ovaryumlarının oosit eldesi amacıyla kullanıldığı sırada, kedinin içinde bulunduğu seksüel siklus döneminin, in vitro maturasyon üzerine etkili bir faktör olduğunu saptamışlardır. Buradan hareketle, sunulan çalışmada ovaryumların tamamının, seksüel siklusun hangi döneminde olduğuna bakılmaksızın, oosit eldesi amacıyla kullanılmasının olgunlaşma sonuçlarının düşük kalmasına yol açmış olabileceği fikrini akla getirmiştir.

İn vitro kültür çalışmalarında, in vitro maturasyon sonuçlarını etkileyen faktörlerin başında, kullanılan medyumun tipi, bu medyuma katılan proteinin tip ve oranları, medyuma katılan hormonların tip ve miktarları gibi bir çok parametre gelmektedir (3,5,6,10). Çalışmanın hormon katkısı yapılmayan kontrol grubunda saptanan % 22,66'lık (Diak+M I+M II) değeri, çalışmalarında kültür medyumunu olarak mKRB kullanan Goodrowe ve ark. (6)'nın (% 40) ve CMR-1066 kullanan Schramm ve Bavister (5)'in (% 36) buldukları değerlerden daha düşük bulundu. Bu sonuçların, bu araştırmacıların kullandıkları medyum tipinin, sunulan çalışmadakinden farklı olmasının bir sonucu olabileceği düşünüldü.

Diğer taraftan, sunulan çalışmada saptanan % 2,66'lık M II değeri, çalışmada kültür medyumunu olarak TCM 199 kullanan Pope ve ark. (3)'ünün buldukları % 10-53'lük değerlerin bir hayli aşağısında gerçekleşti.

Bir çok memeli türünde, beslenmenin reproduktif fonksiyonlar üzerinde etkili bir faktör olduğu bilinmektedir (17). Oositlerin in vitro maturasyonu üzerine olumlu katkılar yaptığı bilinen faktörlerin yanı sıra, in vitro kültür sistemlerinin başarısını etkileyen bir çok olumsuz etkenin varlığı da söz konusudur. Bunların bir kısmının kültür sistemlerindeki eksikliklerden kaynaklanabileceği, bir kısmının ise kullanılan verici kedilerin beslenme koşullarından ortaya çıkan faktörler olabileceği düşünülmektedir. Sunulan çalışmada kullanılan

ovaryum vericisi kedilerin tamamının, iyi beslenemeyen sokak hayvanlarından oluşmasının ve seksüel siklusun hangi döneminde olduğuna bakılmaksızın çalışmaya alınmış olmasının, olgunlaşma oranlarını etkilemiş olabileceği düşüncesini akla getirmiştir.

Memeli oositlerinin partenogenetik aktivasyonu in vivo koşullarda nadiren meydana gelmesine karşın, in vitro kültür sistemlerinde bu her zaman karşılaşılabilen bir fenomendir (18).

Wood ve ark. (19), ovaryumların +4 °C'de taşınmasının 48 saatten sonra oositlerdeki olgunlaşmayı olumsuz yönde etkilediğini bildirmiştir. Bunun yanı sıra Johnston ve ark. (7), ovaryumların 2-8 saatlik süreyi aşmamak kaydıyla +4 °C veya +22 °C'lik serum fizyolojik solüsyonunda taşınması arasında, kedi oositlerinin in vitro maturasyon oranları açısından herhangi bir fark yaratmadığını bildirmişlerdir.

Çalışmanın kontrol ve deneme gruplarında bulunan % 7,38 ve % 5,77'lik partenogenetik aktivasyon oranları da Schramm ve Bavister (5)'in çalışmalarında tespit ettikleri % 3,1'lik değer üzerinde gerçekleşti. Bu farkın da çalışmamızdaki ovaryumların taşınmasında kullandığımız PBS'in +4 °C'de olmasının bir etkisinin olabileceği düşüncesini akla getirdi.

Çalışmada in vitro kültür ortamında gelişemeyerek dejenerasyona uğrayan oosit oranlarının ise hormon katkısı yapılmamış grupta (% 39), hormon katkılı gruba (% 33) nazaran biraz daha yüksek olduğu saptandı. Ancak yapılan istatistiksel karşılaştırmada bu iki değer arasında herhangi bir farka rastlanmadı ( $p>0,05$ ). Buradan hareketle, medyuma gonadotropin katkısının in vitro kültür ortamındaki kedi oositlerinin dejenere olmasını engelleyici bir faktör olmadığı kanısına varıldı.

Sunulan bu çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda, kedi oositlerinin in vitro maturasyonunda, gonadotropin katkısının olgunlaşma üzerine uyarıcı etkiler yapan bir faktör olduğu söylenebilir. Kedi oositlerinin in vitro maturasyonunda daha iyi sonuçların alınabilmesi için, kedinin beslenme durumunun ve seksüel döneminin göz ardı edilmemesi gerekmektedir. İn vitro embriyo eldesi ve bunların transferinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi, öncelikle elde edilen olgunlaşma sonuçlarının artırılmasına bağlıdır. Sonuç olarak, nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya bulunan, Türkiye'ye özgü olan Van ve Ankara kedilerinin korunabilmesinin yanı sıra, vahşi kedigillere de bir model oluşturabilmesi amacıyla bu konuda daha fazla temel çalışmaya ihtiyaç vardır.

## Kaynaklar

1. Pope, C.E.: Embryo Technology in Conservation Efforts for Endangered Felids. *Theriogenology*. 2000; 53: 163-174.
2. Goodrowe, K.L., Wall, R.J., O'Brien, S.J., Schmidt, P.M., Wildt, D.E.: Developmental Competence of Domestic Cat Follicular Oocytes after Fertilization In Vitro. *Bio. Reprod.* 1988; 39: 355-372.
3. Pope, C.E., McRae, M.A., Plair, B.L., Keller G.L., Dresser B.L.: In Vitro and In Vivo Development of Embryos Produced by In Vitro Maturation and In Vitro Fertilization of Cat Oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 1997; Suppl., 51: 69-82.
4. Goodrowe, K.L.: Feline Reproduction and Artificial Breeding Technologies. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 28: 389-397.
5. Schramm, R.D., Bavister, B.D.: Effects of Gonadotrophins, Growth Hormone and Prolactin in Developmental Competence of Domestic Cat Oocytes Matured In Vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995; 7: 1061-1066.
6. Goodrowe, K.L., Hay, M., King, W.A.: Nuclear Maturation of Domestic Cat Ovarian Oocytes In Vitro. *Biol. Reprod.* 1991; 45: 466-470.
7. Johnston, L.A., O'Brien, S.J., Wildt, D.E.: In Vitro Maturation and Fertilization of Domestic Cat Follicular Oocytes. *Gam. Res.* 1989; 24: 343-356.
8. Pineda, M.H., Faulkner, L.C.: *The Biology of Sex. Veterinary Endocrinology and Reproduction.* Lea and Febiger, 208-234, Philadelphia, 1980.
9. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E.: *Manipulating the Mouse Embryo.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 38-39, 1994.
10. Hafez, E.S.E.: *Embryo Transfer, IVF and Genetic Engineering, Reproduction in Farm Animals.* Lea and Febiger, 535-538, Philadelphia, 1987.
11. Wassarman, P.M., Albertini, D.F.: *The Mammalian Ovum. The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York, 79-188: 1994.
12. Hewitt, D.A., England, G.C.W.: Influence of Gonadotrophin Supplementation on the In Vitro Maturation of Bitch Oocytes. *Vet. Rec.* 1999; 44: 237-239.
13. Pabuççuoğlu, S.: Sığır Oositlerinin in Vitro Olgunlaştırılmasında HEPES ve Hormonların Etkileri. *İst. Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2001; 27 (2): 659-670
14. Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Ak, K., Alkan, S., Evecen, M., Öztürkler, Y., İleri, İ.K.: Effects of Serum and Hormone Additions to Maturation Medium on In Vitro Maturation of Sheep Oocytes. *İst. Üniv. Vet. Fak. Derg.* 1999; 25: 75-79.
15. Moor, R.M., Dai, Y., Lee, C., Fulka J. Jr.: Oocyte Maturation and Embryonic Failure. *Human Reprod. Update*, 1998; 4, (3): 223-236.
16. Wolfe, B.A., Wildt, D.E.: Development of Blastocysts of Domestic Cat Oocytes Matured and Fertilized In Vitro after Prolonged Cold Storage. *J. Reprod. Fert.* 1996; 106 (1): 135-141, (Abstr.).
17. Prunier, A., Quesnel, H.: Influence of the Nutritional Status on Ovarian Development in Female Pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61: 181-197.
18. Pushett, D.A., Gunn, I.M., Trounson, A.O.: Retrieval of Parthenote-Like Embryos from the Ovaries of Domestic Cats. *Theriogenology*. 1997; Issue 1, 404; (Abstr.).
19. Wood, T.C., Byers, A.P., Jannette, B.D., Wildt, D.E.: Influence of Protein and Hormone Supplementation on In Vitro Maturation and Fertilization of Domestic Cat Eggs. *J. Reprod. Fert.* 1995; 104 (2): 315-323, (Abstr.).