

## Sığır Ovaryum Folliküllerinin Makroskopik Olarak Sınıflandırılmasının Granulosa Hücrelerinin İn Vitro Steroidogenik Aktivitelerine Etkisi

Mehmet KURAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, 55149 Samsun-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 21.01.1997

**Özet:** Sığır ovaryum folliküllerinin steroidogenik özellik ve aktivitelerinin, folliküllerin bazı makroskopik özellikleri ile olan ilişkileri ile olan ilişkileri ve bu kriterlerin folliküllerin fizyolojik durumu hakkında bir karar kriteri olarak kullanılabilme olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır. Sığır ovaryumlarından (n=46) izole edilen 5-8 mm çapındaki folliküllerin follikül içi sıvıları analiz edilmiş ve granulosa hücrelerinin steroidogenik aktiviteleri araştırılmıştır. Folliküllerin (n=232) makroskopik olarak sınıflandırılmasında dış görünüşleri, thecal vaskularizasyon, theca internanın rengi ve follikül içi sıvıda debris bulunup bulunmaması gibi kriterler kullanılmıştır. Folliküller belirtilen makroskopik kriterlere göre normal, yarı atretik ve atretik olarak sınıflandırılmış ve normal folliküllerin follikül içi sıvılarında östradiol-17 $\beta$  hormonu progesterone hormonundan daha yüksek (P<0.01) bulunmuştur. Follikül içi sıvıda östradiol-17 $\beta$  ve progesterone hormonları konsantrasyonları sırasıyla normal, yarı atretik ve atretik folliküller için 1034 pg östradiol/ml ve 769.5 ng progesterone/ml olarak tesbit edilmiştir. Normal, yarı atretik ve atretik folliküllerden elde edilen granulosa hücreleri inkübasyon süresince sırasıyla 402, 106 ve 62 pg östradiol-17 $\beta$ /10<sup>5</sup> hücre üretmişlerdir (P<0.01). Normal folliküllerden elde edilen granulosa hücrelerinin progesterone üretimleri 76 ng/10<sup>5</sup> hücre olurken, yarı atretik ve atretik folliküllerden elde edilen granulosa hücreleri için ise sırasıyla 131 ve 1412 ng/10<sup>5</sup> hücre olmuştur (P<0.01). Sonuç olarak, atretik, yarı atretik ve normal olarak sınıflandırılan folliküllerin steroidogenik özellikleri ve aktiviteleri birbirinden farklıdır ve folliküllerin fizyolojik durumlarının göstergeleri olarak kullanılabilir.

**Anahtar Sözcükler:** Sığır, ovaryum, follikül, granulosa hücreleri, atresia, steroidogenesis.

### Effect of Macroscopic Classification of Bovine Ovarian Follicles on Steroidogenic Activities of Granulosa Cells in vitro

**Abstract:** This study aimed to investigate relationships between steroidogenic characteristics and abilities, and some macroscopic characteristics of bovine ovarian follicles and to relate this criterion to the physiological status of the follicles. Follicular fluid of 5 to 8 mm diameter follicles from bovine ovaries (n=46) were analysed and steroidogenic activities of granulosa cells were studied. For the macroscopic classification of the follicles (n=232), appearance of the follicles, thecal vascularization, the colour of theca interna and the presence of follicular debris were determined. Follicles were classified as non-atretic, intermediate and atretic using the criterion above. Oestradiol-17 $\beta$  concentration was higher than progesterone concentration in the follicular fluid of non-atretic follicles (P<0.01). Oestradiol-17 $\beta$  and progesterone concentrations in the follicular fluid were 034 pg oestradiol/ml and 82.4 ng progesterone/ml for non-atretic follicles, 442 pg oestradiol/ml and 274.6 ng progesterone/ml for intermediate follicles, and 113 pg oestradiol/ml and 769.5 ng progesterone/ml for atretic follicles, respectively. Granulosa cells from non-atretic, intermediate and atretic follicles produced 402, 106 and 62 pg oestradiol-17 $\beta$ /10<sup>5</sup> cells, respectively, during the incubation period (P<0.01). While granulosa cells from non-atretic follicles produced 76.2 ng progesterone/10<sup>5</sup> cells, granulosa cells from intermediate and atretic follicles secreted 130.8 and 1412.3 ng progesterone/10<sup>5</sup> cells, respectively, into the incubation medium. In conclusion, there are differences between steroidogenic characteristics and abilities of follicles macroscopically classified as non-atretic, intermediate and atretic, and macroscopic evaluation of follicles may be used for reflection of physiological status of follicles.

**Key Words:** Cattle, ovary, follicle, granulosa cells, atresia, steroidogenesis.

### Giriş

Ovaryum folliküllerindeki somatik hücreler tarafından üretilen steroid hormonların ve özellikle östradiol-17 $\beta$ 'nin, oositlerin gelişmesi, olgunlaşması ve ovulasyona hazırlanmasını sağladığı bilinmektedir (1). İn vitro embriyo üretimi teknolojisinde, transfer edilebilir kalitede

embriyoların üretim etkinliği, in vitro olgunlaşma, fertilizasyon ve kültür uygulanacak oositlerin kendilerine ilişkin bir takım faktörlerden etkilenebilir. Oositlerin kültür şartlarını iyileştirici, ortama farklı serum, hormon ve hücre ilavesi gibi bir takım uygulamalar yapılmış olmasına rağmen, yapılan çalışmalardan çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (2-4).

Siğır ovaryumlarında, kızgınlık döngüsünün her aşamasında atretik olmayan ve gelişen folliküllerin yanında ovaryum folliküllerinin %99'undan fazlasının maruz kaldığı atresia'nın farklı aşamasında bulunan folliküller mevcuttur (5). Atresia terimi, gelişmekte olan folliküllerde olan dejeneratif olaylar zincirini ifade etmektedir (6, 7). Ovaryum folliküllerinin büyük bir çoğunluğu, folliküler gelişimin preantral döneminden antral döneme geçişte ve ovulasyona kadar olan dönemde atresiya maruz kalırlar (8). Folliküllerin morfolojik, biyokimyasal ve histolojik özelliklerine göre atresianın farklı devreleri bir çok araştırmacı tarafından tesbit edilmiştir (9-14).

Siğırlarda follikül içi sıvının steroidogenik şartlarının belirlenmesine ilişkin bir çok çalışma yapılmıştır (15-26). Ancak ovaryum folliküllerinin makroskopik özellikleri, follikül içi sıvının steroid içeriği ve granulosa hücrelerinin in vitro steroidogenik aktiviteleri birlikte değerlendirilmeye alınmamıştır. Follikül içerisinde granulosa ve theca hücreleri tarafından sentezlenen progesterone ve östradiol, folliküler gelişme ve atresianın temel düzenleyicileridir. Aslında follikül içi sıvıdaki steroid hormon konsantrasyonlarındaki varyasyonlar, atresianın bir sebebi olmaktan ziyade sonucudurlar. Atresia, ilk önce folliküllerin somatik hücrelerindeki morfolojik dejenerasyonlarla başlar ve sonucunda da somatik hücrelerin steroidogenesis kabiliyetlerinde değişiklikler olur. Atresia, folliküller tarafından progesterone üretiminin artması ve östradiol üretiminin azalması ile karakterize edilir (1, 15-18, 27-30). Buna karşılık atretik olmayan folliküler, follikül içi sıvıda kısmen yüksek östradiol ve düşük progesterone konsantrasyonuna sahiptirler. Bu steroid hormonlarının follikül içi sıvıdaki konsantrasyonlarının varyasyonu, follikül hücreleri tarafından söz konusu steroid hormonların üretimindeki değişiklikleri yansıtmaktadır. Follikül içi sıvıdaki steroid ortam da oosit gelişimini etkilemektedir. Takagi ve ark. (31), follikül içi sıvıda progesterone konsantrasyonu yüksek olan antral folliküllerin %95'den fazlasının morfolojik olarak dejenere olduklarını bildirmektedirler. Atresia devresinin ilerlemesi ile birlikte, follikül içi sıvıda inhibin konsantrasyonu azalır (32, 33), androgenler ve oksitosin konsantrasyonlarında artışlar olur (16, 34) ve folliküler dokuda IGF bağlayıcı proteinler artar (11).

Follikül içerisinde granulosa, theca ve oosit arasında dinamik bir iletişim vardır. Granulosa ve theca hücreleri birbirlerinin mitotik ve steroidogenik aktivitelerini düzenledikleri gibi granulosa hücreleri de oositlerin olgunlaşmasını direkt olarak etkilemektedir (35-37). Dolayısıyla oositin içerisinde bulunduğu follikülün atretik olup olmaması oositlerin in vitro gelişme potansiyellerini

etkileyebilir. Nitekim, Hazeleger ve ark. (38) siğır oositlerini oosit-cumulus kompleksinin morfolojik özelliklerine göre sınıflandırdığı bir çalışmada, blastosist devresine kadar olan gelişmelerin normal ve normal olmayan oositlerde birbirinden farklı olduğunu ve bununda follikül içi sıvıdaki steroid hormonlarının konsantrasyonları ile ilişkili olduğunu tesbit etmişlerdir. Bunun bir sonucu olarakta follikül içi sıvıdaki progesterone konsantrasyonu ve oosit-cumulus kompleksinin morfolojik kriterlerinin, blastosist devresine gelişme potansiyeli yüksek oositlerin seçiminde kullanılabileceğini bildirmektedirler. Stubbings ve ark., (39), süperovulasyon uygulanan düvelerde preovulatory dönemde follikül içi sıvının steroidogenik özellikleri ile oosit kalitesi arasında bir ilişki olduğunu bildirmektedirler.

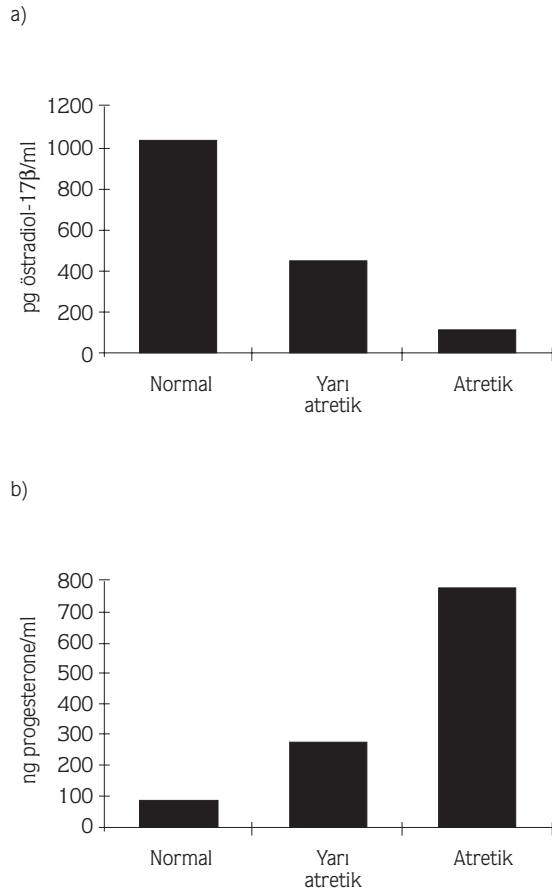
Bu nedenle bu çalışmada, siğır ovaryum folliküllerinin steroidogenik özellik ve aktivitelerinin, follikülerin bir takım makroskopik özellikleri ile olan ilişkileri ve bu kriterlerin folliküllerin fizyolojik durumu hakkında bir karar kriteri olarak kullanılabilme olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metod

Bu çalışma University of Aberdeen, Department of Agriculture, UK, laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışmada mezbahaneden kesim sonrası elde edilen 46 siğır ovaryumu kullanılmıştır. Ovaryumlar daha önceki üreme fonksiyonları hakkında bilgiye sahip olunmayan pubertas çağına ulaşmış düvelerden elde edilmiştir (30, 40). Ovaryumlar, mezbahaneden laboratuara buz üzerinde 100 IU penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren %9'luk tuz çözeltisi içerisinde taşınmıştır. Ovaryumlar %70'lik ethanol çözeltisine 30 saniye süre ile batırılmışlar ve işlemler tamamlanincaya kadar bütün ovaryumlar buz üzerinde tutulmuştur.

Ovaryumlardan, 5-8 mm çapındaki folliküller izole edilmiştir. Folliküllerin follikül içi sıvıları daha sonraki progesterone ve östradiol-17β radioimmunoassay analizleri için bir şırınga yardımı ile toplanmış ve bireysel olarak -20°C'de muhafaza edilmiştir. Follikül içerisinden granulosa hücreleri, follikül duvarı enine ve boyuna yarıldıktan sonra, bir spatula yardımıyla follikül iç duvarını yavaşça kazıyarak izole edilmiştir. Her bir follikülden bireysel olarak izole edilen granulosa hücreleri, bir test tüpü içerisinde buz üzerinde muhafaza edilmiş ve kültür ortamı ile yıkanarak 200 g hızda, 4°C'de 4 dakika santrifüj edilmiştir.

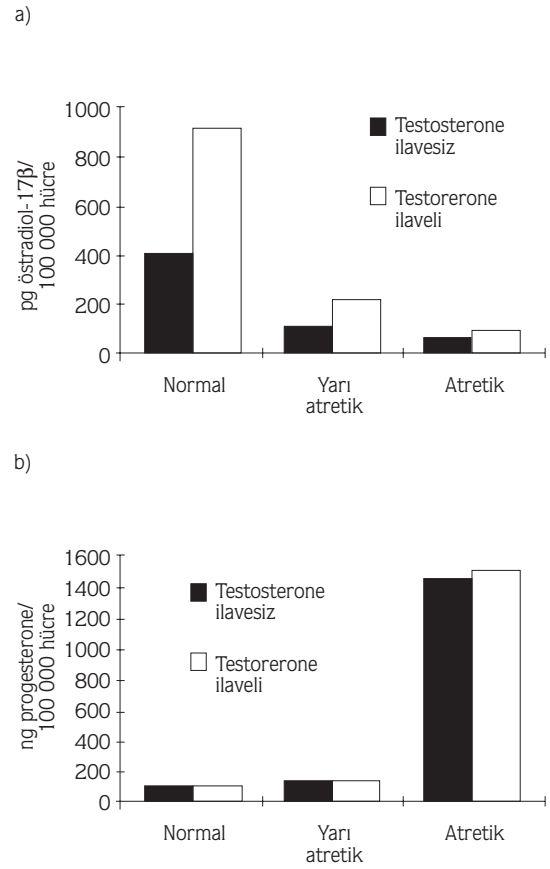
Folliküllerin (n=232) makroskopik olarak sınıflandırılmasında dış görünüşleri (parlak, bulanık,



Şekil 1. Normal, yarı atretik ve atretik olarak sınıflandırılan 5-8 mm çapındaki siğir ovaryum folliküllerinin follikül içi sıvılarında östradiol-17β(a) ve progesterone (b) konsantrasyonları.

karanlık), thecal vaskularizasyon (iyi, orta ve zayıf), theca internanın rengi (kırmızı, pembe ve beyaz) ve follikül içi sıvıda debris (ölü hücre pıhtıları) bulunup bulunmaması gibi literatürde bildirilen (18, 20, 23) kriterler kullanılmıştır. Folliküller makroskopik özelliklerine göre normal (atretik olmayan), yarı atretik ve atretik olarak sınıflandırılmıştır. Parlak görümlü folliküller, thecal vaskularizasyonu iyi, theca internanın rengi kırmızı veya kırmızı pembe arası ve follikül içi sıvıda debris bulunmayan folliküller, normal folliküller olarak sınıflandırılmıştır. Atretik folliküller ise, bulanık ya da karanlık renkli görünüme sahip, thecal vaskularizasyonu zayıf, theca internanın rengi beyazımsı ve follikül içi sıvıda debrislere sahip folliküller olarak kabul edilmiştir. Yarı atretik folliküller ise bu iki grup arasında yer alan folliküllerden oluşmuştur.

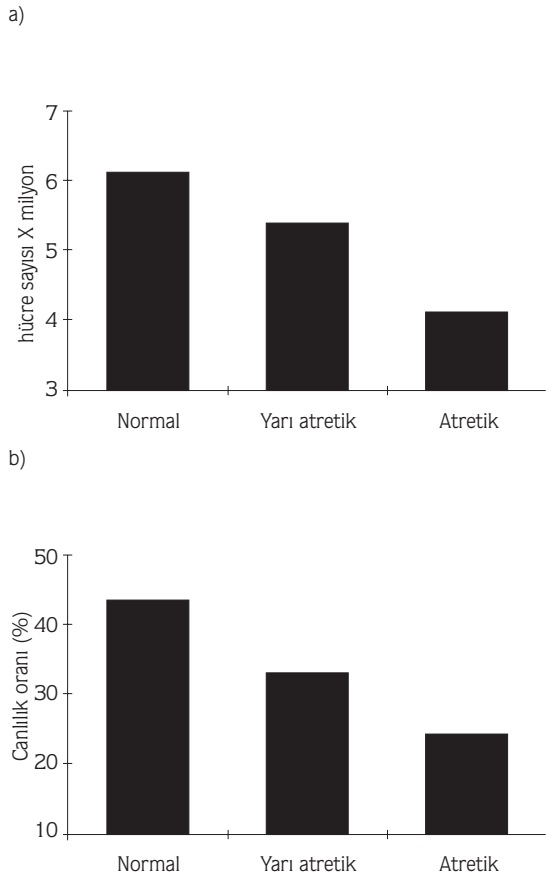
Granulosa hücrelerinin canlılık testleri, trypan blue (%0.4) kullanılarak yapılmıştır. Her bir folliküle ait



Şekil 2. Normal, yarı atretik ve atretik olarak sınıflandırılan 5-8 mm çapındaki siğir ovaryum folliküllerinden elde edilen granulosa hücrelerinin inkübasyon ortamına testostereone ilave edilmeksizin (doğal) ve testostereone ilave edilerek 3 saatlik inkübasyon süresi boyunca ortama salgıladıkları östradiol-17β (a) ve progesterone (b) miktarları.

ortalama  $3-5 \times 10^5$  canlı granulos hücresi, bir inkübasyon kabı içerisinde  $37^\circ\text{C}$ 'de 3 saat süreyle, %1 bovine serum albumin ve %0.22 sodyum bikarbonat içeren 1 ml Medium 199 (Sigma Chemical Co.; Medium 199 with Earle's Salts, L-glutamine and 25 mM HEPES) içerisinde ve dakikada 80 çalkalama yapan bir çalkalayıcı su banyosunda, %5  $\text{CO}_2$  ile havada muamele edilerek, inkübe edilmiştir. Inkübasyon ortamına bir grupta prekürsör olarak testostereone (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ilave edilirken, kontrol grubuna prekürsör verilmemiştir. Inkübasyon süresinin sonunda, kültür ortamı daha sonraki radioimmunoassay analizleri için  $-20^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Kültür ortamı ve follikül içi sıvının progesterone ve östradiol-17β hormon içerikleri radioimmunoassay yöntemiyle daha önce açıklandığı gibi (30, 40) steroidlerin ekstraksiyonlarından sonra analiz edilmiştir.



Şekil 3. Normal, yarı atretik ve atretik olarak sınıflandırılan 5-8 mm çapındaki siğir ovaryum folliküllerden elde edilen toplam granulosa hücre sayısı (a) ve canlı oranları (b).

Ekstraksiyon etkinliği, progesterone için %88.9, östradiol-17 $\beta$  için %85.6 olarak bulunmuştur. Follikül içi sıvı, analiz öncesi 1:10 ile 1:40 arasında değişen oranlarda seyreltilmiştir. Analizler içi ve analizler arası varyasyon katsayıları sırasıyla progesterone analizleri için, %9.1 ve %11.5, östradiol-17 $\beta$  analizleri için %1.5 ve %5.9 olarak tesbit edilmiştir.

Elde edilen veriler, Minitab (Release 8.2) istatistik programında varyans analizine tabi tutulmuştur. Veriler, ortalaması±standart hata olarak sunulmuştur ( $\bar{x}\pm Sx$ ). Ortalamalar arasındaki istatistiksel farklar, t testi ile belirlenmiştir.

## Bulgular

Folliküller belirtilen makroskopik kriterlere göre normal, yarı atretik ve atretik olarak sınıflandırılmış ve normal folliküllerin follikül içi sıvılarında östrodiol-17 $\beta$

hormonu progesterone hormonundan daha yüksek ( $P<0.01$ ) bulunmuştur. Follikül gruplarının follikül içi sıvıdaki östradiol-17 $\beta$  ve progesterone konsantrasyonları sırasıyla Şekil 1a ve b'de sunulmuştur. Follikül içi sıvıda östradiol-17 $\beta$  ve progesterone hormonları konsantrasyonları sırasıyla normal ( $n=18$ ), yarı atretik ( $n=32$ ) ve atretik ( $n=27$ ) folliküler için  $1034\pm 63$  pg östradiol/ml ve  $82.4\pm 13.3$  ng progesterone/ml;  $442\pm 39$  pg östradiol/ml ve  $274.6\pm 32.2$  ng progesterone/ml;  $113\pm 23$  pg östradiol/ml ve  $769.5\pm 52.4$  ng progesterone/ml olarak tesbit edilmiştir.

Normal, yarı atretik ve atretik folliküllerden elde edilen granulosa hücrelerinin, testosterone ilave edilmeksizin ve testosterone ilave edilerek, inkübasyon ortamına salgıladıkları östradiol-17 $\beta$  ve progesterone değerleri sırasıyla Şekil 2a ve b'de sunulmuştur. Normal ( $n=48$ ), yarı atretik ( $n=85$ ) ve atretik ( $n=99$ ) folliküllerden elde edilen granulosa hücreleri inkübasyon süresince sırasıyla  $402\pm 41$ ,  $106\pm 21$  ve  $62\pm 14$  pg/ $10^5$  hücre östradiol-17 $\beta$  üretmişlerdir ( $p<0.01$ ). Kültür ortamına testosterone ilavesi granulosa hücrelerinin östradiol-17 $\beta$  üretimlerini artırmış ( $P<0.01$ ) ve normal, yarı atretik ve atretik folliküllerden elde edilen granulosa hücreleri testosterone ilave edildiğinde sırasıyla  $917\pm 54$ ,  $221\pm 19$  ve  $96\pm 12$  pg/ $10^5$  hücre östradiol-17 $\beta$  üretmişlerdir. Normal folliküllerden elde edilen granulosa hücrelerinin progesterone üretimleri  $76.2\pm 15.7$  ng/ $10^5$  hücre olurken, yarı atretik ve atretik folliküllerden elde edilen granulosa hücreleri için ise sırasıyla  $130.8\pm 19.8$  ve  $1412.2\pm 88.6$  ng/ $10^5$  hücre olmuştur ( $p<0.01$ ). Ortamda testosterone bulunması, granulosa hücrelerinin progesterone üretimlerini etkilememiştir ( $P>0.05$ ). Inkübasyon ortamına testosterone ilave edildiğinde, normal, yarı atretik ve atretik folliküllerden elde edilen granulosa hücrelerinin progesterone üretimleri sırasıyla  $78.1\pm 14.3$ ,  $125.6\pm 21.7$  ve  $1470.0\pm 96.4$  ng/ $10^5$  hücre bulunmuştur.

Şekil 3a ve b'de normal, yarı atretik ve atretik olarak sınıflandırılana folliküllerden elde edilen toplam granulosa hücre sayısı ve canlılık oranları verilmiştir. Normal folliküllerden elde edilen toplam granulosa hücre sayısı  $6.12\pm 0.72 \times 10^6$  olurken, bu değer yarı atretik ve atretik folliküler için sırasıyla  $5.36\pm 0.66 \times 10^6$  ve  $4.12\pm 0.65 \times 10^6$  olmuştur ( $P<0.05$ ). Aynı sırayla, granulosa hücrelerinin canlılık oranları ise  $42.8\pm 5.1$ ,  $32.5\pm 4.7$  ve  $23.7\pm 2.8$  olarak bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

## Tartışma

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, makroskopik özelliklerine göre atretik olarak sınıflandırılan folliküllerin

follikül içi sıvı östradiol konsantrasyonunun atretik olmayan folliküllerinkinden daha düşük olduğu, buna karşılık progesterone konsantrasyonlarının yüksek olduğu fikrini doğrulamıştır (1, 15-18, 20, 23, 28-30). Buna karşılık, normal folliküllerde ise yine diğer çalışmaları destekleyen follikül içi sıvıda yüksek konsantrasyonlarda östradiol-17 $\beta$  ve düşük konsantrasyonlarda progesterone olduğu tesbit edilmiştir. Koyunlarda yapılan çalışmalar, ovaryum folliküllerinin steroidogenesis kaabiliyetleri ve follikül içi sıvının steroid hormon konsantrasyonlarının sığırlardakine benzer olduğunu göstermiştir (41).

Theca hücrelerinin androgen salgılamasını, granulosa hücrelerindeki östradiol aromatisasyonu için prekürsör sağladığı bildirilmektedir (42, 43). Bu çalışmada gözlemlenen testosteron ilavesinin granulosa hücrelerinin östradiol-17 $\beta$  üretimlerini artırması, theca hücreleri tarafından salgılanan testosteronun granulosa hücreleri tarafından östradiol-17 $\beta$ 'ya dönüştürüldüğünü doğrulamaktadır.

Henderson ve ark., (22), folliküllerin atretik olup olmamasının, granulosa hücrelerinin in vitro progesterone ve östradiol-17 $\beta$  üretim kaabiliyetlerini etkileyen bir faktör olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada da, normal ve atretik folliküllerden elde edilen granulosa hücrelerinin inkübasyon ortamındaki progesterone ve östradiol-17 $\beta$  üretimleri, bu durumu desteklemektedir. Skyer ve ark. (44), follikül içi sıvının steroid hormon konsantrasyonlarına göre östrojen aktif ya da

progesterone aktif olarak sınıflanan folliküllerin inkübasyonu ile bu çalışmada elde edilen steroid üretimine benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Histolojik inceleme sonucu atretik olarak sınıflandırılan folliküllerin inkübasyonundan da bu çalışmaya benzer sonuçlar elde edilmiştir (45).

Ireland ve Roche (16), atretik folliküllerde granulosa hücre sayısının normal folliküllerden daha düşük olduğunu, ayrıca normal folliküllerden elde edilen granulosa hücrelerinde FSH ve LH reseptörlerinin atretik folliküllerden daha fazla olduğunu ve theca hücrelerinde ise LH reseptörlerinin daha fazla olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada elde edilen toplam granulosa hücre sayılarına ilişkin veriler bu sonucu destekler niteliktedir. Ayrıca bu çalışmada, normal folliküllerden elde edilen granulosa hücrelerinin canlılık oranları, atretik folliküllerden elde edilenlerden daha yüksek bulunmuştur. Bu fark, atretik folliküllerde granulosa hücrelerinin atresia nedeniyle hücrelerin dejenerasyona uğramasıyla açıklanabilir.

Sonuç olarak, makroskopik özelliklere göre atretik, yarı atretik ve normal olarak sınıflandırılan folliküllerin steroidogenik özellikleri ve aktiviteleri birbirinden farklıdır ve folliküllerin fizyolojik durumlarının göstergeleri olarak hem follikülogenezis çalışmalarında ve hemde in vitro embriyo üretiminde blastosist devresine gelişme potansiyeli yüksek sağlıklı oositlerin seçilmesinde kullanılabilirler.

## Kaynaklar

1. Kruij, Th.A.M. and Dieleman, S.J.: Steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrus cycle. *Theriogenology*. 24: 395-408, 1985.
2. Galli, C. and Lazzari, G.: Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*. 42: 371-379, 1996.
3. Sirard, M.A. and Blondin, P.: Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*. 42: 417-426, 1996.
4. Thompson, J.G.: Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*. 45: 27-40, 1996.
5. Rajakoski, E.: The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinologica (Suppl.)*. 52: 1-68, 1960.
6. Byskov, A.G.: Atresia. In: *Ovarian Follicular Development and Function*. Eds. A.R. Midgley and W.A. Sadler. Raven Press, New York. pp.41-57, 1979.
7. Spicer, L.J. and Echtenkamp, S.E.: Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. *Journal of Animal Science*. 62: 428-451, 1986.
8. Fortune, J.E.: Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*. 50: 225-232, 1994.
9. Tsafiri, A. and Braw, R.: Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. 6: 226-265, 1984.
10. Greenwald, G.S. and Terranova, P.F.: Follicular selection and its control. In: *The Physiology of Reproduction*. Eds. E. Knobil and J. Neill. Raven Press Ltd., New York. pp.387-445, 1988.
11. Hsueh, A.J.W., Billig, H. and Tsafiri, A.: Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*. 15: 707-724, 1994.
12. Richards, J.S.: Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*. 15: 725-751, 1994.
13. van den Hurk, R., Spek, E.R., Dijkstra, G., van Vorstenbosch, C.J.A.H.V., Hurshof, S.C.J. and Dieleman, S.J.: Effects of pregnant mares' serum gonadotrophin on antral follicles in heifers: a micromorphological study with special reference to atypical granulosa cells. *Journal of Reproduction and Fertility*. 95: 903-913, 1992.

14. van den Hurk, R., Dijkstra, G., Hurshof, S.C.J. and Vos, P.L.A.M.: Micromorphology of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis, with particular reference to a typical granulosa cells. *Journal of Reproduction and Fertility*. 100: 137-142, 1994.
15. Ireland, J.J. and Roche, F.: Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 111: 2077-2086, 1982.
16. Ireland, J.J. and Roche, F.: Development of nonovulatory antral follicles in heifers changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*. 112: 150-156, 1983.
17. Ireland, J.J. and Roche, J.F.: Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in steroids in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *Journal of Animal Science*. 57: 157-167, 1983.
18. Kruip, Th.A.M. and Dieleman, S.J.: Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod., Nutrition and Development*. 22: 465-473, 1982.
19. Kruip, Th.A.M. and Dieleman, S.J.: Intrinsic and extrinsic factors influencing steroid production in vitro by bovine follicles. *Theriogenology*. 31: 531-544, 1989.
20. McNatty, K.P., Heath, D.A., Henderson, K.M., Lun, S., Hurst, P.R., Ellis, L.M., Montgomery, G.W., Morrison, L. and Thurley, D.C.: Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72: 39-53, 1984.
21. Fortune, J.E. and Hansel, W.: Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biology of Reproduction*. 32: 1069-1079, 1985.
22. Henderson, K.M., McNatty, K.P., Smith, P., Gibb, M., O'Keeffe, L.E., Lun, S., Heath, D.A. and Prisk, M.D.: Influence of follicular health on steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 79: 185-193, 1987.
23. Spicer, L.J., Matton, P., Echternkamp, S.E., Convey, E.M. and Tucker, H.A.: Relationships between histological signs of atresia, steroids in follicular fluid, and gonadotropin binding in individual bovine antral follicles during postpartum anovulation. *Biology of Reproduction*. 36: 890-898, 1987.
24. Hansen, T.R., Randel, R.D. and Welsh, T.H.: Granulosa cell steroidogenesis and follicular fluid steroid concentrations after the onset of oestrus in cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 89: 773-782, 1988.
25. Sunderland, S.J., Crowe, M.A., Boland, M.P., Roche, J.F. and Ireland, J.J.: Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 101: 547-555, 1994.
26. Price, C.A., Carriere, P.D., Bhatia, B. and Groome, N.P.: Comparison of hormonal and histological changes during follicular growth, as measured by ultrasonography, in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*. 103: 63-68, 1995.
27. Dieleman, S.J., Kruip, Th.A.M., Fontijne, P., de Jong, W.H.R. and van der Weyden, G.C.: Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *Journal of Endocrinology*. 97: 31-42, 1983.
28. Tsafiri, A. and Eckstein, B.: Changes in follicular steroidogenic enzymes following the prevolutary surge of gonadotropins and experimentally induced atresia. *Biology of Reproduction*. 34: 783-787, 1986.
29. Roberts, A.J. and Echternkamp, S.E.: In vitro production of estradiol by bovine granulosa cells: evaluation of culture condition, stage of follicular development, location of cells within follicles. *Biology of Reproduction*. 51: 273-282, 1994.
30. Kuran, M., Broadbent, P.J. and Hutchinson, J.S.M.: Follicle-stimulating hormone stimulated differentiation and progesterone production of bovine granulosa cells in culture. *Animal Reproduction Science*. 39: 237-249, 1995.
31. Takagi, M., Tsukihara, T., Nishikata, Y. and Suzuki, T.: Relationship between progesterone and estradiol contents of follicular fluid and the morphological appearance of granulosa cells of follicles coexisting with corpora lutea in bovine ovaries. *Theriogenology*. 40: 135-147, 1993.
32. Martin, T.L., Fogwell, R.L. and Ireland, J.J.: Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*. 44: 693-700, 1991.
33. Guilbault, L.A., Rouillier, P., Matton, P., Glencross, R.G., Beard, A.J. and Knight, P.G.: Relationships between the level of atresia and inhibin contents (a subunit and a-b dimer) in morphologically dominant follicles during their growing and regressing phases of development in cattle. *Biology of Reproduction*. 48: 268-276, 1993.
34. Meidan, R., Wolfenson, D., Thatcher, W.W., Gilad, E., Afalo, L., Greber, Y., Shoshani, E. and Girsh, E.: Oxytocin and estradiol concentrations in follicular fluid as a means for the callisification of large bovine follicles. *Theriogenology*. 39: 421-432, 1993.
35. Jungclas, B. and Luck, M.R.: Evidence for granulosa-theca interaction in the secretion of oxytocin by bovine ovarian tissue. *Journal of Endocrinology*. 109: R1-R4, 1986.
36. Sirard, M.A. and Bilodeau, S.: Effects of granulosa cell co-culture on in-vitro meiotic resumption of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 89: 459-465, 1990.
37. Kotsuji, F., Kubo, M. and Tominaga, T.: Effect of interactions between granulosa and theca cells on meiotic arrest in bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 100: 151-156, 1994.
38. Hazeleger, N.L., Hill, D.J., Stubbings, R.B. and Walton, J.S.: Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology*. 43: 509-522, 1995.

39. Stubbing, R.B., Liptrap, R.M. and Basrur, P.K.: The assessment of follicular parameters for the selection of oocytes recovered from superovulated heifers. *Animal Reproduction Science*. 23: 181-195, 1990.
40. Kuran, M., Broadbent, P.J., Hutchinson, J.S.M.: The use of bovine granulosa cell culture to assess the biological potency and specificity of antibodies to pregnant mares' serum gonadotrophin. *European Journal of Endocrinology*. 134: 497-500, 1996.
41. Moor, R.M., Hay, M.F., Dott, H.M. and Cran, D.G.: Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *Journal of Endocrinology*. 77: 309-318, 1978.
42. Hsueh, A.J.W., Adashi, E.Y., Jones, P.B.C. and Welsh, T.H. (Jr.): Hormonal regulation of the differentiation of cultured granulosa cells. *Endocrine Reviews*. 5: 76-127, 1984.
43. Skinner, M.K. and Osteen, K.G.: Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. *Endocrinology*. 123: 1668-1675, 1988.
44. Skyer, D.M., Garverick, H.A., Youngquist, R.S. and Krause, G.F.: Ovarian follicular populations and in vitro steroidogenesis of different days of the bovine estrous cycle. *Journal of Animal Science*. 64: 1710-1716, 1987.
45. Guilbault, L.A., Rouillier, P. and Matton, P.: In vitro release of estradiol and level of atresia of subordinate follicles collected during the growing or regressing phase of follicular dominance in cattle. *Theriogenology*. 37: 218, 1992.