T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ
TOHUMLAMA ANABİLİM
DALI

KÖPEK OOSİTLERİNİN VİTRİFİKASYON YÖNTEMİYLE DONDURULMASI VE PARTENOGENEZ AKTİVASYONU

R. GÖZDE ÖZALP

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2020

R.Gözde ÖZALP

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2020

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA
ANABİLİM DALI

KÖPEK OOSİTLERİNİN VİTRİFİKASYON YÖNTEMİYLE DONDURULMASI VE PARTENOGENEZ AKTİVASYONU

R. Gözde ÖZALP

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA

BURSA-2020

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

~~Yüksek Lisans~~/Doktora tezi olarak sunduğum "Köpek oositlerinin vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması ve partenogenez aktivasyonu" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

R. Gözde ÖZALP

Tarih ve İmza

23.07.2024

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

25/02/2020

Adı Soyadı: R. Gözde ÖZALP

Anabilim Dalı: Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

Tez Konusu: Köpek oositlerinin vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması ve partenogenez aktivasyonu

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	■	❑	
Dış Kapak Sayfası	■	❑	
İç Kapak Sayfası	■	❑	
Kabul Onay Sayfası	■	❑	
Sayfa Düzeni	■	❑	
İçindekiler Sayfası	■	❑	
Yazı Karakteri	■	❑	
Satır Aralıkları	■	❑	
Başlıklar	■	❑	
Sayfa Numaraları	■	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	❑	
Kaynaklar	■	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN		II
KABUL ONAY		III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU		IV
İÇİNDEKİLER		V
TÜRKÇE ÖZET		VII
İNGİLİZCE ÖZET		IX
1.	**GİRİŞ**	1
2.	**GENEL BİLGİLER**	3
2.1	Köpeklerde Reproduktif Siklus	3
2.1.1	Proöstrus	3
2.1.2	Östrus	4
2.1.3	Diöstrus	4
2.1.4	Anöstrus	5
2.2	Köpeklerde Foliküler Gelişim ve Ovulasyon	5
2.3	Köpeklerde In Vivo Oosit Maturasyonu	6
2.3.1	Oosit Maturasyonunda Gonadotropinler ve Steroidogenezisin Rolü	8
2.3.2	Sperm Penetrasyonunun Oosit Maturasyonuna Etkisi	10
2.3.3	Köpeklerde İn vitro Oosit Maturasyonu	10
2.3.4	İn vitro maturasyon (IVM) için Biyokimyasal Faktörler	11
2.3.4.1	Kültür Medyumu	11
2.3.4.2	Hormon Katkıları	11
2.3.4.3	Büyüme Hormonu ve Büyüme Faktörleri	12
2.3.4.4	Mayotik İnhibitörler	12
2.4	Köpek Oositlerinde Partenogenetik Aktivasyon	13
2.5	Köpek Oositlerinin Dondurulma Yöntemleri	14
3.	**GEREÇ VE YÖNTEMLER**	16
3.1	Hayvan Materyali	16
3.2	Çalışma Materyalinin Toplanması	16
3.3	Oositlerin Toplanması ve Olgunlaştırılması - İn vitro maturasyon (IVM)	17
3.4	Oositlerin Dondurulması	19
3.5	Oositlerin Çözdürülmesi ve Partenogenetik Aktivasyonu	20
3.6	Boyama ve Değerlendirme	21
3.7	Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi	21
3.8	Çalışmada Kullanılan Medyumların Hazırlanması	22
3.8.1	PBS Hazırlanması	22
3.8.2	TL-HEPES Yıkama Medyumu Hazırlanması	22
3.8.3	Olgunlaşma (Maturasyon) Medyumu Hazırlanması	23
3.8.4	Vitrifikasyon Solüsyonlarının Hazırlanması	24
3.8.5	Çözdürme Solüsyonunun Hazırlanması	24
3.8.6	Partenogenetik Aktivasyon Solüsyonlarının Hazırlanması	24
3.8.7	Partenogenetik Aktivasyon Sonrası Maturasyon Medyumu	25
3.8.8	Boya Maddesinin Hazırlanması	25
3.8.9	Alet ve Malzeme Listesi	25
4.	**BULGULAR**	28

5. **TARTIŞMA** 33
6. **KAYNAKLAR** 38
7. **SİMGELER VE KISALTMALAR** 51
8. **TEŞEKKÜR** 53
9. **ÖZGEÇMİŞ** 54

TÜRKÇE ÖZET

Pet hayvanlarında biyoteknolojik çalışmalar son yıllarda hız kazanmaya başlamıştır. Köpeklerde başarısız yardımcı üreme teknikleriyle ilgili oluşan sorular, muhtemelen köpek türlerinin reprodüktif fizyolojisine ait yetersiz bilgiden kaynaklanmaktadır. Bu konuda yapılan araştırmaların hız kazanmasında duygusal nedenler önemlidir. Fakat diğer taraftan pet biyolojisindeki uygulamalar, insan hastalıkları için model oluşturmaktadır. Bunun ötesinde gamet kriyopreservasyonunun gelişmesi, nesli tükenmekte olan türlerin korunması ve genetik banka oluşturulması için önemlidir. Köpek oositlerindeki düşük maturasyon oranlarına rağmen, bu tezde, partenogenetik aktivasyonun etkileri, vitrifiye matur oositlerde test edilmiştir.

Köpek oositleri, Yıldırım Belediyesi Sokak Hayvanları Bakım ve Rehabilitasyon merkezinden alınan, 10 adet sağlıklı köpekten toplanmıştır. Ovaryumların tekrarlı dilimlenmesinden sonra, seçilen kumulus oosit kompleksleri, 5%CO_2'li inkübatörde, mineral yağla kaplanmış 500 µl TCM-199 içeren dört-gözlü petrilerde, 39°C'de, 72 saat boyunca maturasyona bırakılmıştır. Maturasyondan sonra oositler, 0%, 10%, 20% etilen glikol içeren 50 ml PBl içinde sırasıyla, 5, 5 dakika ve 30 saniye muamele edilmiştir. Oositler, 30 µl VS3 ile kriyoviallere aktarılarak sıvı nitrojende dondurulmuştur. Bu grubun oositleri (n=257) vitrfiye oosit 'VO' olarak gruplanmıştır. Çözdürme sonrasında, oositler ionomisinle 5 dakika ve sikloheksimid ile 3 saat muamele edilerek partenogenetik aktivasyona maruz bırakılmıştır. Sonrasında oositler 72 saat kültüre edilerek oositlerin nükleer durumları değerlendirilmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan oositler (n=257), 'FO' olarak gruplandırılmıştır. Maturasyondan sonra, oositler direkt olarak ionomisin ve sikloheksimid ile muamele edilerek aktivasyona bırakılmıştır ve 72 saat kültüre edilmiştir. Tüm oositler Hoechst33342 ile 30 dakika boyandıktan sonra nükleer maturasyon oranları faz kontrast mikroskopta değerlendirilmiştir.

Maturasyon oranları (MI+MII) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0,05$).

Maturasyon sonrasında, vitrifiye köpek oositlerinde partenogenetik aktivasyona bağlı nükleer değerlendirme çalışması bulunmamaktadır. Fakat bu uygulamada elde

edilen düşük maturasyon oranlarının, ileri moleküler çalışmalarla açıklanması gerektiği kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: Köpek oositleri, vitrifikasyon, in vitro maturasyon, partenogenetik aktivasyon

INGILIZCE ÖZET

Biotechnologic researches in pet animals have been run up in recent years. Raised questions about unsuccesful assisted reproductive technologies in canid species are probably related with poor information in reproductive physiology of canid species. The studies about this subject has been thought to be motivated by emotional reasons. But on the other hand the applications in pet biology is accepted as model for human diseases. Apart from this, development of gamete cryopreservation is an important tool for genetic bank and conservation of endangered species. In spite of low maturation rates of canine oocytes, the results of parthenogenetic activation has been tried to maturated and vitrified-warmed canine oocytes in this thesis.

Oocytes were collected from 10 healthy bitches at Yıldırım Municipality Stray Animals Sterilization and Rehabilitation Center. After slicing of ovaries, selected cumulus oocyte complexes were maturated for 72 h at 39°C in four-well petri dishes containing 500 µl TCM-199 under mineral oil in a 5%CO_2 incubator. After maturation, oocytes were exposed to 50 ml PBl containing 0%, 10%, 20% ethylene glycol for 5, 5 minutes and 30 seconds respectively. They were vitrified in cryovials containing 30 µl VS3 in liquid nitrogen. The oocytes in this group (n=257) were grouped as vitrified oocyted 'VO'. After warming, the oocytes were parthenogenetically activated with ionomycin for 5 minutes and followed by cycloheximide for 3 hr. Oocytes were then cultured for 72 hr and assessed for nuclear maturation. The oocytes (n=257), grouped as fresh oocytes 'FO' were used as control group. After maturation, oocytes were directly incubated with ionomycin and cycloheximide for parthenogenetic activation and cultured for 72 h. All oocytes were stained with Hoechst33342 for 30 min and nuclear maturation rates were assessed using a phase contrast microscope.

Maturation rates (MI+MII) between groups had not been found statistically different ($p>0,05$).

To our knowledge there is no information available about the influence of parthenogenetic activation on nuclear maturation after vitrification of maturated

canine oocytes. However, low maturation rates should be clarified by further molecular studies.

Keywords: Canine oocytes, vitrification, in vitro maturation, parthenogenetic activation

1. GİRİŞ

Köpeklerde, Abbe Lazzaro Spallanzani tarafından 1780'de yapılan ilk başarılı suni tohumlama ve gerçek bir köpek oositinin, 1827'de Karl Ernst von Baer tarafından tanımlanmasından sonra, reprodüktif biyoteknoloji çalışmaları, insan ve diğer türlere göre oldukça gerilerde kalmıştır (Heape, 1897; von Baer, 1827). Evcil köpeklerin fertilitesinin yüksek olması, bu alandaki çalışmaları geri planda tutarken, vahşi yaşamda nesli tükenmekte olan türler için, biyoteknoloji konuları tekrar gündeme gelmiştir. Bu türün reprodüktif fizyolojisinin farklılıkları nedeniyle, *in vitro* oosit maturasyonu, embriyo oluşumu ve gamet dondurulmasındaki başarı oranları tartışmalıdır.

Köpekler mevsime bağlı olmayan monoöstrik hayvanlar olup, spontan ovulasyon gösterirler. Oldukça uzun süren luteal dönem, gebelik dönemiyle benzer endokrinolojik özellikler göstermektedir ve takibinde zorunlu anöstrus dönemine girerler (Concannon, 2011). Diğer türlerden farklı olarak, köpek oositleri maturasyonu tamamlamadan ovule olur ve mayotik süreç LH salınımlarıyla başlatılarak, ovidukt içinde tamamlanır. Granulosa hücrelerinin bu süreçte diğer türlerde olduğu gibi önemli rol oynadığı bilinse de, cAMP'nin görevi hala tartışmalıdır. Mayoz bölünmenin başlamasından sadece birkaç saat sonra oosit transkripsiyonunun başlaması, *in vitro* maturasyon oranlarını düşürmektedir (Chastant-Maillard ve ark., 2011). *İn vitro* şartlarda oositlerin sadece %10-20'si mayoz II (M-II) aşamasına ulaştığından, *in vitro* embriyo üretimi de oldukça başarısızdır (Luvoni ve ark., 2005). *İn vitro* maturasyon oranının düşük olmasına rağmen, nesli tükenmekte olan hayvanların gamet kriyopreservasyonu önemini korumaktadır (Songsasen ve Wildt, 2007). Vitrifikasyon ya da yavaş dondurma metotları denenmiş ve M-II aşamasına ulaşabilen az sayıda oosit belirlenmiştir. Konu hakkında yapılan çalışmalar ve bilgiler çok sınırlıdır.

Bu çalışmada, ovaryumlarda *slicing* (dilimleme) yöntemiyle kazanılan oositlerin, 72 saatlik *in vitro* maturasyona alındıktan sonra, mayotik durumu dikkate alınmaksızın vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması planlanmıştır. Çalışma grubunda, çözdürülen oositler sperma penetrasyonu olmaksızın mayoz bölünmenin devam ettirilebilmesine olanak tanıyan partenogenetik aktivasyona bırakılarak, hücre

nükleuslarının durumu değerlendirildi. Kontrol grubu olarak da, vitrifikasyon yapılmamış oositler, ‘taze oosit’ grubu olarak direkt partenogenetik aktivasyona alınarak değerlendirildi.

Partenogenetik aktivasyonun, nükleus transferi ile klonlama, embriyonik kök hücre üretimi gibi birçok biyoteknolojide önemli bir yere sahip olduğundan, vitrifikasyonun bu sürece etkileri değerlendirildi. Her iki uygulamanın köpek oositlerinde ilk defa birlikte uygulanmış olması ve elde edilen sonuçların konu ile ilgili yapılacak çalışmalara katkı yapması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Köpeklerde Reprodüktif Siklus

Köpeklerde seksüel siklus düzeni diğer hayvan türlerinden belirgin derecede farklıdır. Foliküllerin preovulatorik luteinizasyonuyla ilişkili preovulatorik serum progesteron artışı, gebeliğin olmadığı durumda luteolizinlerin olmayışı, progesteronun gebelerde metabolizasyonunun belirgin derecede artmasına rağmen, gebe ve gebe olmayan köpeklerde benzer hormon profilleri, erken gebelik teşhisinde kullanılabilecek gebelik spesifik proteinlerin olmayışı ve sadece implantasyondan sonra relaksin hormonu ile gebelik tayini yapılabilmesi, bunlardan sadece birkaçıdır (Chakraborty, 1987; Gudermuth ve ark., 1998; Concannon ve ark., 2001; Gobello ve ark., 2002; Klonisch ve ark., 1999; Kowalewski ve ark., 2015).

Köpeklerde östrus siklusu proöstrus, östrus, diöstrus ve anöstrus olarak dört dönemde incelenir (Feldman ve Nelson, 1996). Seksüel siklus hipotalamustan salgılanan GnRH'un etkilediği hipofiz bezinin LH ve FSH salınımı ile kontrol edilir. Bu hormonlar, foliküler gelişim ile ovaryumlardan steroid hormonların salınımını gerçekleştirir (Meinecke 2000).

2.1.1 Proöstrus

Proöstrus yüksek östrojen konsantrasyonu ile karakterize ve bu endokrinolojik profilde vulva ödemi, kanlı serosanginöz akıntının kendini gösterdiği dönemdir (Concannon, 2011). Bu dönemde östradiol 17-β konsantrasyonu artmaya başlar, östrus öncesinde en yüksek seviyeye ulaşır ve endokrinolojik olarak preovulatorik LH piki ile fizyolojik proöstrus sona erer (Feldman ve Nelson, 2004; Concannon, 2011). LH pikinden hemen önce, preovulatorik foliküller lüteinleşmeye başlayarak, östrus döneminde serumda ölçülebilir miktarda progesteron üretirler (Feldman ve Nelson, 2004). Proöstrus döneminde erkeğe karşı olan agresif davranışlar yumuşar ve erkek etkisi feromon sekresyonunu artırarak, vaginal sekresyonda metil p-hidroksibenzoat salınımını indükler (Concannon, 2011).

2.1.2 Östrus

Köpeklerde östrus, ortalama 9 gün süren ve geç proöstrusta azalan östradiole verilen cevap olarak nitelendirilen davranışsal östrus ve ovulasyonun görüldüğü dönemdir (Concannon ve ark., 1979; Wildt ve ark., 1979; Concannon, 2011). LH konsantrasyonundaki artışla birlikte, matur folikülde hızla gelişim ve LH pikinden sonra preovulatorik luteinizasyon gözlenir. Bu sürecin başlangıcından yaklaşık 24-72 saat sonra ovulasyon meydana gelir ki, serum progesteron konsantrasyonu ovulasyon zamanında yüksektir (Wildt ve ark., 1977; Wildt ve ark., 1979; Concannon ve ark., 1989; Keynaud ve ark., 2005). Ovulasyonda oosit, mayozun profaz I - germinal vezikül (GV) aşamasında salınır ve mayoz bölünme 48-72 saat içinde oviduktta tamamlanır (Wildt ve ark., 1979; Concannon ve ark., 1989).

2.1.3 Diöstrus

Östrus sonrasında ortalama iki ay süren ve progesteron salınımı ile karakterize diöstrus dönemi gözlenir (Concannon ve ark., 1989; Johnston ve ark., 2001). Korpus luteum fazı ve progesteron sekresyonu, diğer memelilerden farklı olarak, gebe ve siklik köpeklerde neredeyse benzerdir (Concannon ve ark., 1989; Hoffmann ve ark., 1994). Ancak, gebe olmayan köpeklerde, sürekli azalan progesteron seviyesi dikkat çekicidir ki, uzayan luteal regresyon döneminin progesteron konsantrasyonunun 1ng/ml'nin altına ininceye, yani 1-3 aya kadar sürdüğü bildirilmiştir (Concannon ve ark., 1989; Concannon, 1993; Hoffmann ve ark., 1994; Hoffmann ve ark., 2004).

Gebe olmayan köpeklerde korpus luteumun yaşam süresini histerektomi etkilememektedir ve endojen $PGF_{2\alpha}$'nın etkisinin sadece, gebe köpeklerde doğumdan hemen önce progesteron konsantrasyonunun ani düşüşüyle görüldüğü bildirilmiştir (Kowalewski ve ark., 2006). Luteal regresyonun uterin luteolizinleri tarafından kontrol edilmediği; ancak, uterusun anöstrus süresini kontrol etmede rol üstlenebileceği bildirilmiştir (Hoffmann ve ark., 1992).

2.1.4 Anöstrus

Korpus luteum fonksiyonları diöstrusun ikinci yarısından itibaren azalmaya ve buna bağlı olarak progesteron salınımı da dereceli olarak azalmaya başlar. Köpekler bu dönemden sonra 2-10 ay arasında değişen oldukça uzun sürebilen anöstrus dönemine girer. Bu dönem gonadal aktivitenin olmadığı, seksüel davranışların gözlenmediği ve sirküle progesteron konsantrasyonunun çok düşük olduğu dönem olarak tanımlanır. Orta anöstrustan geç anöstrusa doğru, GnRH üretiminin başlamasıyla FSH ve episodik LH salınımı artarak proöstrus başlatılır (Kooistra ve ark., 1999; Kooistra ve Okkens, 2001; Beijerink ve ark., 2004).

2.2 Köpeklerde Foliküler Gelişim ve Ovulasyon

Köpeklerde folikül gelişimi, ovulasyon ve oosit maturasyonu diğer türlerden farklılık göstermektedir. Gelişen folikülden üretilen östrojen, preovulatorik LH kontrolünü sağlar ve ovulasyonun hemen öncesinde mayotik bölünmeyi tamamlayan oositler fertilizasyona kadar ikinci mayoz bölünmenin metafaz (MII) aşamasında kalır. Ancak köpeklerde preovulatorik foliküller, LH pikinden önce luteinize olur ve progesteron konsantrasyonu ovulasyon zamanında 5 ng/ml'ye ulaşır (Concannon ve ark., 1989; Feldman ve Nelson, 2004).

Foliküler gelişim süreci tam olgunlaşmamış olsa da, köpek folikülleri büyüklük, tip, folikül hücre katmanları sayısı ve foliküler sıvı varlığına bağlı olarak beş grupta kategorize edilmiştir. Foliküler büyüme süresince RNA ve protein sentezine yol açan transkripsiyonel aktivite oluşur. Oosit kumulus hücreleriyle *gap junctions*'lar aracılığıyla birleşir ve sitoplazmik maturasyon için gerekli olan besin, iyon ve kalsiyum, cAMP gibi küçük regülatorik moleküllerin geçişlerine olanak tanır (Hyttel ve ark., 1999; Grazul-Bilska ve ark., 1997). Bu aşamadan sonra *gap junctions*'ların yakın fizyolojik ilişkisi nükleer maturasyon ve mayozun başlatılmasında oldukça önemlidir (Sirard, 2001). Primordiyal ve primer foliküller çapsal olarak benzer yapıda olup, sırasıyla doğumdan 17-54 ve 120 gün sonra oluşurlar (Andersen ve Simpson, 1973; Tesoriero 1981; Durrant ve ark., 1998; Barber ve ark., 2001; Blackmore ve ark., 2004). Primordiyal foliküllerin zona pellusida katmanı olmadığı gözlenirken, primer foliküllerin solgun belirgin zona

pellusidası vardır (Durrant ve ark., 1998; Barber ve ark., 2001; Blackmore ve ark., 2004).

Sekonder ve tersiyer oositlerin morfolojik olarak gelişmesinin yanında, oosit ve zona pellusida büyümesi de meydana gelir (Barber ve ark., 2001). Bu ultrastrüktürel değişimler, yine diğer türlerden farklılık gösterir (Tesoriero, 1982). Köpek oositinin yolk materyal lipid içeriği ve bunun gelişimi oosit maturasyonunun en erken indikatörü olarak kabul edilir (Tesoriero, 1982; Guraya, 1965). Sekonder foliküllerde koyu sitoplazmik lipid içeriği olan gelişmiş oositler bulunur ve son aşama olan tersiyer foliküllerde de bu verilere ek olarak foliküler sıvı sentezi gözlenir (Andersen ve Simpson, 1973; Durrant ve ark., 1998; Barber ve ark., 2001). Pubertas öncesinde primordiyal folikülden antral foliküllere geçiş süreci 70-150 gün arasındadır ve ortalama 6 aylık yaşta orta proöstrusta gözlenir (Andersen ve Simpson, 1973; Concannon ve ark., 1989).

LH piki sonucunda, ileri antral foliküller hızlıca 4-13 mm'lik preovulatorik folikül haline gelir ve 48 saat sonra da ovule olur (Wildt ve ark., 1979; Concannon ve ark., 1989; England ve Allen, 1989).

2.3 Köpeklerde *İn Vivo* Oosit Maturasyonu

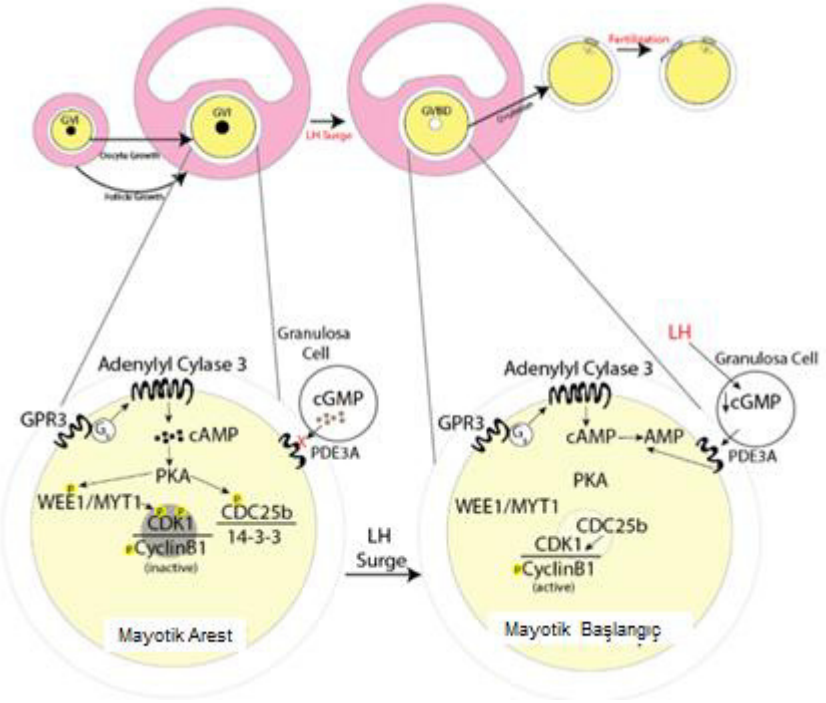
Oosit maturasyonu sitoplazmik ve nükleer değişimlerden oluşan oldukça karmaşık bir mekanizmadır. Köpek oositlerinde mayotik süreç, embriyonik dönemde başlar ve ovulasyona kadar profaz I-diploten aşamasında kalarak, ovulasyondan sonra mayotik olgunlaşmayı ovidukt içinde tamamlar. Germinal vezikül aşamasında ovule olan oositler 2-5 gün arasında oviduktta olgunlaşmayı tamamlar (Reynaud ve ark., 2006; Songsasen ve Wildt, 2007). Germinal vezikül aşamasındaki oositler 48 saat içinde *germinal vezikül breakdown* (GVBD) aşamasına geçer ve nükleer maturasyon artan progesteron konsantrasyonuyla 48-72 saat içinde tamamlanır (Holst ve Phemister, 1971; Wildt ve ark., 1978; Concannon ve ark., 1989; Farstad ve ark., 1989; Tsutsui, 1989; Renton ve ark., 1991). Mayoz I'in başlamasını takiben, organize nükleus zarfının parçalanması başlar ki, buna GVBD denir. Takibinde kromozom yoğunlaşması, kromozom liflerinin oluşumu ve birinci polar cisimciğin atılması gerçekleşir (Sen ve Caiazza, 2013). Bundan sonra, oosit mayoz II'ye girer ve fertilizasyona kadar metafaz II aşamasında bekletilir. Fertilizyonla birlikte oosit

mayoz II'ye girer ve sekonder polar cisimcik atılır, maturasyon tamamlanır (Dekel 1995; Eppig ve ark., 2004).

Başarılı ferilizasyon ve takibinde embriyonik gelişim için oosit maturasyonu en önemli ana basamaklardandır. Oositin gelişimsel ilerleme sağlayabilmesi için, fertilizasyondan önce, farklı sinyalizasyon yolakları tarafından kontrol edilen çoklu faktörün etkisi altına girer (Gall ve ark., 2002; Jones, 2004). Memeli oositlerinde mayotik blokaj, intrasellüler yüksek cAMP düzeyi ile kontrol edilir (Conti ve ark., 2002; Luciano ve ark., 2004; Eppig ve ark., 2004; Mehlmann, 2005a). Antral folikül oositlerinde cAMP düzeyinin düşük olmasıyla mayoz bölünme başlar. cAMP düzeyinin mayoz arestinde nasıl etkili olduğuna ilişkin iki hipotez mevcuttur. Oosit çevresindeki granulosa hücreleri yüksek konsantrasyonda cAMP üretir ve bu *gap junction'*lar aracılığıyla oosit içine geçer (Tsafriri ve Dekel, 1994; Dekel, 1995; Edry ve ark., 2006). Fare oositlerinde yapılan çalışmalara göre ise, ikinci hipotez mayotik aresti koruyan cAMP en azından oosit içinde oluşturulur. Aslında cAMP üretimi için gerekli tüm komponentler oosit içinde var olan G-proteinleri ve adenilat siklaz (AC)'dır (Hinckley ve ark., 2005; Freudzon ve ark., 2005).

Kemirgen fare oositlerinde yapılan çalışmalarda farklı (GPR3-GPR12) Gs-reseptörleri tanımlanmıştır ve mayotik arest kontrolünü bunların yaptığı sanılmaktadır (Kalinowski ve ark., 2004; Mehlmann ve ark., 2004; Mehlmann 2005b). GPR-3 antral folikülde mayoz arestinde gerekli reseptörken, GPR12 yüksek konsantrasyonda cAMP üretiminden sorumludur (Mehlmann ve ark., 2004; Hinckley ve ark., 2005). Mayoz maturasyonu için cdc2/*cyclin B* kompleks gibi, çoğunlukla maturasyon promoting faktör (MPF) olarak bilinen komponent oldukça gereklidir ve birçok türde MPF aktivasyonu GVBD'yi uyarır (Kubelka ve ark., 2000; Wu ve ark., 2002; Jones 2004; Sanfins ve ark., 2004). MPF heterodimer olup sitoplazmik bir faktördür ve CDK1 (cdc2 gen ürünü) ile regulatorik alt birimden (siklin B)'den oluşur. Siklin B'nin periyodik olarak birikimi-yıkımı ile ve cdc2'nin fosforilasyonu-defosforilasyonu ile MPF aktivitesi kontrol edilir. Mayotik arest esnasında oositler içerisinde korunan cAMP konsantrasyonu, cAMP bağımlı protein kinaz A aktivitesini destekler ve bu durum Wee1/Myt1 yolağını aktive ederek MPF'yi fosforile edip inaktif halde tutar (Mehlmann 2005b; Smitz ve ark., 2011). Gonadotropik hormonların ikincil mesajcısı, kumulus hücrelerinde artan seviyede

cAMP, EGF yolağını aktive ederek fosfokinaz C ve AII (PKC/PKAII), PI3K/AKT(PKB) fosforilasyonunu sağlar ve MAPK'lar (mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz) MPF aktivitesi ve sonrasında mayozu başlatır (**Şekil 1**). Oosit ve kumulus hücreleri arasındaki *gap junctions*'lardaki değişimler MAPK'ların aktivitesi ile kontrol edilir (Luciano ve ark., 2004; Tripathi ve ark., 2010, Firmani, 2018).



Şekil 1: Mayotik arest ve LH'ya cevap olarak mayotik başlangıcın farklı sinyalizayon süreçleri (Firmani L, Doktora tezi, 2018)

2.3.1 Oosit Maturasyonunda Gonadotropinler ve Steroidogenezisin Rolü

Köpek oositlerinin *in vitro* mayoz bölünmeye başlatılmasında gonadotropinlerin katkısı oldukça etkilidir (Songsasen ve ark., 2003b). *İn vivo* şartlarda hipofiz bezinden salgılanan FSH, folikülü olgunlaştırır, LH olgun folikülün ovule olmasını stimüle eder (Reynaud ve ark., 2006). Bundan dolayı gonadotropinlerin oositlerin IVM'da etkisini değerlendirmek ilk hedeftir.

Memelilerde oosit maturasyonunu LH piki ile cAMP seviyesinin düşürülmesiyle indüklenmektedir (Mehlmann ve ark., 2006; Conti ve ark., 2006). Granulosa hücrelerinde LH pikiyle, cAMP konsantrasyonu geçici olarak artar ve

cAMP bağımlı yolak aracılığıyla farklı epidermal büyüme faktörleri (EGFs) benzeri proteinlerin salgılanmasını indükler (Mehlmann 2005b; Conti ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2009). Bu durum cAMP'nin konsantrasyonunu düşürür ve mayozis başlar (Mehlmann 2005a; Zhang ve ark., 2009). EGF-benzeri proteinler kumulus hücrelerinde EGF-reseptörleri aracılığıyla otokrin ve parakrin etkilidir (Prochazka ve ark., 2003; Park ve ark., 2004; Ashkenazi ve ark., 2005; Hsieh ve ark., 2005). Bu proteinler parçalanıp matriks metalloproteinazlar aracılığıyla, LH'ya cevap olarak salınır ve mayozun başlatılmasında ve oosit maturasyonunda oldukça etkilidir (Ashkenazi ve ark., 2005; Conti ve ark., 2006; Mehlmann ve ark., 2006).

LH-aracılı cAMP değişimlerinin üç ana yolak kullanarak etkili olabileceği yönünde hipotezler vardır. 1) *G-coupled protein* reseptörler ve GPR3'ün adenilat siklaz fosforilasyonu ve kumulus hücrelerinde cAMP üretimini artırması, 2) Oosit içinde fosfodiesteraz-3A'nın (PDE-3A) direkt aktivasyonu ile cAMP'nin degredasyonu, 3) İntrasellüler kalsiyum artmasıyla adenilat siklazın inaktivasyonu ve cAMP seviyesinin azalması (Mehlmann, 2005b).

Kumulus hücrelerinde EGF-EGFR steroid mekanizmasını StAR aktivitesi aracılığıyla aktive eder ve steroidler oosit maturasyonunda klasik steroid reseptörler tarafından kontrol edilir (Jamnongjit ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda farelerde androjenin non-genomik yolak aracılığıyla, domuzlarda testosteronun, non-primatlarda progesteron/androjenlerin oosit maturasyonunu indüklediği bildirilmiştir (Gill ve ark., 2004; Borman ve ark., 2004; Li ve ark., 2008). Oositler CYP17'yi eksprese eder ve progesteronu androjen metabolitlerine çevirir (Lutz ve ark., 2001; Yang ve ark., 2005). Bu durumda progesteronun maturasyonda önemli bir indikatör olduğu, testosteronun ise androjen artışına bağlı hastalık tablosunda önemi vardır. Farklı çalışmalar ve birbirinden zıt sonuçlara rağmen, kabul gören hipotez steroidlerin katılımıyla oosit maturasyonunun tamamlanabildiğidir. Köpek oositlerinin de oviduktun orta bölümüne ulaştığında yüksek progesteron konsantrasyonuna bağlı olarak nükleer maturasyonu tamamladığı bildirilmiştir (Wildt et al., 1978; Tsutsui 1989; Concannon et al., 1989; Keynaud et al., 2005).

Diğer mekanizmalar ise *gap junctions*'ların parçalanması oosit maturasyonunda önemli rol oynayan mayotik maturasyon hedefli G-protein ilişkili

sinyalizasyon yolağıdır (Gill ve ark., 2004; Jamnongjit ve ark., 2005, Ning ve ark., 2008).

2.3.2 Sperm penetrasyonunun oosit maturasyonuna etkisi

Ovulasyondan en erken 3 gün öncesinden çiftleşme gerçekleşebildiğinden, oosit ve spermatozoon oviduktta karşılaşır. Sperm penetrasyonunun mayozu başlatma ve nükleer maturasyonda önemli bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Sperm başları *in vivo* şartlarda immatur oositlerde gösterilmiştir ve in vitro olarak da immatur aşamadaki penetrasyonun yüksek oranda olduğu belirlendiğinden dolayı mayozun başlatılmasında bir indikatör olabileceği kabul edilmiştir (Van der Stricht 1923; Farstad ve ark., 1993; Saint-Dizier ve ark., 2001a). Laboratuvar ortamında köpek spermasının GV aşamasında sperm penetrasyonunun gerçekleşmesi ve sonrasında pronükleus oluşumundan dolayı insan ve inek oositlerinde olduğu gibi sperm penetrasyonunun köpeklerde de mayozu başlatabileceği rapor edilmiştir (Chian ve ark., 1992; Van Blerkom ve ark., 1994; Farstad, 2000; Saint-Dizier ve ark., 2001b). Memeli oositlerinde mayotik maturasyon spontan olarak metafaz II'de kalır ve devamında nükleer süreç sperm-indüklenmiş aktivasyonla sürer.

Olgun olmayan oosit ve spermatozoon oviduktta karşılaşır. Bu aşamada sperm penetrasyonu nükleer maturasyonun tamamlanabilmesi için gereklidir. *İn vitro* şartlarda sperma oosite penetre olduktan sonra, mayozun aktivasyonu gerçekleşir (Saint-Dizier ve ark., 2001a,b). *İn vivo* şartlarda bu süreç, serbest kalsiyum (Ca^{+}) iyonlarının intrasellüler seviyede salınımının artırılmasıyla gerçekleştirilir (Yanagimachi ve Bhattacharyya, 1988). Artan Ca^{2+} seviyesi MPF (Hashimoto ve ark., 1988) ve CSF (cytostatic factor) (Masui, 1991) aktivitesini etkiler ve mayoz tamamlanır.

2.3.3 Köpeklerde *İn Vitro* Oosit Maturasyonu

Köpek oositlerinin in vitro şartlarda olgunlaşması biyoteknolojik alanda kullanımı ve gelişimsel yeterlilik için en önemli basamaktır (Bukowska ve ark., 2012). Oosit popülasyonu içinde yalnızca tam gelişmiş oositlerin mayozu başlatabildiği ve maturasyon sürecine girebildiği belirlenmiştir. Messenger RNA (mRNA) transkripsiyonu başlangıçta down-regüle edilir ve GVBD aşamasına girdikten sonra tamamen durur. Bundan sonraki aşamada mayozu kontrol eden

spesifik genlerin transkripsiyonu metafaz II aşamasına kadar ya artırılır ya da azaltılır (Fair ve ark., 2007). Bu durumda 6-8 mm'nin üzerinde olan ve tam gelişmiş oositlerde mRNA ve protein miktarından dolayı maturasyonun tamamlanması ve embriyonik yaşama giriş oldukça başarılı olur (Van Soom ve ark., 2007).

2.3.4 *In vitro* maturasyon (IVM) için Biyokimyasal Faktörler

2.3.4.1 Kültür medyumu

Köpek oosit maturasyonu sürecinin folikül ve ovidukt içindeki gelişiminin taklit edilebilmesi için birçok araştırma yapılmıştır. Kültür medyumlarının hazırlamasında hormon, protein, enerji substratları ve antioksidanlar gibi farklı maddelerin katılması, yüksek maturasyon oranına ulaşmak amaçlıdır (Luvoni ve ark., 2005).

Köpek oositlerinin maturasyonu ve embriyo gelişimi için test edilen kültür medyumları Modifiye Krebs Ringer Bikarbonat (Yamada ve ark., 1992), sentetik oviduktal sıvı (Hewitt ve England, 1999) ve TCM 199'dur (Fujii ve ark., 2000; Otoi ve ark., 2000; Luvoni ve ark., 2001; Willingham-Rocky ve ark., 2003). En başarılı sonuç veren kültürün, amino asit, vitamin gibi katkılı hazırlanan kompleks medyum olan TCM 199 olduğu ileri sürülmektedir (Cinone ve ark., 1992; Gordon, 1994)

2.3.4.2 Hormon Katkıları

Ovulasyon sonrasında, köpek oositleri ovidukt içinde yüksek konsantrasyonda östradiol ve progesteron etkisinde kaldığı için, kültür medyumuna her iki hormonun katılması büyük önem taşımaktadır. Preovulatorik luteinizasyondan dolayı oositlerin progesterona maruz kalması, bu hormonun katkısını zorunlu hale getirmiştir (Metcalfe, 1999). Ancak foliküler fazda toplanan oositlerin kültür ortamında progesteron katkısının iyi sonuçlar verdiği, diğer reprodüktif aşamalarda alınan oositlerde progesteron katkısının başarı oranını artırmadığı belirtilmiştir (Willingham-Rocky ve ark., 2003; Kim ve ark., 2005). Egzojen östrojenlerin aynı zamanda DNA guanin bazlarının 8-hidroksilasyonunu inhibe ettiği için antioksidan etkisi de belirtilmiştir (Markides ve ark., 1998).

Luteal dönemde azalan progesteron konsantrasyonuna artan prolaktin hormonu eşlik eder ve prolaktin mitojenik, sekretorik etkili bir hormondur (Ben-

Jonathan ve ark., 1996). İnsan oosit çalışmalarında foliküler sıvıda yüksek konsantrasyonda prolaktin olmasının oosit-kumulus kompleksinin maturasyonu ve başarılı gebeliklerde prolaktinin etkili bir hormon olduğu kanıtlanmıştır (Laufer ve ark., 1984). Köpek oositlerinde bu konuda bilinen bir çalışma bulunmamaktadır; ancak, maturasyonu olumlu etkileyecek bir hormon olabileceği düşünülmektedir (Rodrigues ve Rodrigues, 2010).

Mayotik maturasyonu ovidukt içinde tamamlayan köpek oositleri, farklı endokrinolojik değişimlerin etkisinde kalır. Özellikle preovulatorik LH'nın erken luteinizasyona neden olması önemli rol oynamaktadır (Concannon ve ark., 1989). Kültür ortamına katılan hCG'nin muhtemelen kumulus ekspansiyonunu ve kumulus hücreleriyle oosit arasındaki *gap junctions*'ların ayrışmasını stimüle ederek, oositin GVBD aşamasına girmesine neden olmaktadır (Concannon ve ark., 1989; Yamada ve ark., 1993). Ayrıca, diğer türlerde olduğu gibi kültür ortamına eCG'nin eklenmesi halinde, köpek oositlerinde mayozu başlattığı ve bunun sonucunda oositlerin MI/MII aşamasına geçtiği bildirilmiştir (Songsasen ve ark., 2003b).

2.3.4.3 Büyüme Hormonu ve Büyüme Faktörleri

Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF) etkileri köpek oositlerinde test edilmiştir (Ribeiro ve ark., 2010). EGF MAP kinaz ve EGF-reseptörlerini aktive ederek kumulus hücrelerinde ekspansiyona neden olmaktadır (Gall ve ark., 2005; Conti ve ark., 2006). Ancak, köpek oositlerinde doz bağımlı etki gösterirken aynı zamanda LH-EGF ve EGF-östradiol arasındaki sinerjik etkiyi yakalamak gerekir (Bolamba ve ark., 2006). LH'nın kumulus hücreleri aracılığıyla EGF mRNA ekspresyonunu artırdığı ve EGF'ün mayotik indükleyici etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür (Conti ve ark., 2006). FSH'nın EGF ile birlikte kültüre edildiğinde ise, nükleer maturasyonu durdurduğu belirlenmiştir (Bolamba ve ark., 2006).

2.3.4.4 Mayotik İnhibitörler

Primer foliküllerden alınan köpek oositlerinin mayotik maturasyonu kolaylıkla başlatamadığından, mayotik ve sitoplazmik maturasyon için bir dizi yapısal değişikliklere yol açan *in vitro* maturasyon kültürlere ihtiyaç vardır (Bolamba ve ark., 1998; Bolamba ve ark., 2002; Songsasen ve Wildt, 2005). Diğer türlerde

fosfodiesteraz ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri oositlere gelişimsel yeterlilik kazandırırken, köpek oositlerinde kısmen etkili olduğu gözlenmiştir (Funahashi ve ark., 1997; Pavlok ve ark., 2000, Songsasen ve ark., 2003b).

Mayotik bölünmenin başlatılması süreci açıklanamamış; ancak, çalışmalar bu süreci kontrol ederek oosit maturasyonunu artıran ya da durduran çok sayıda molekül olduğunu göstermiştir (Aktas ve ark., 2003; Tosti 2006). Bundan dolayı, protein sentezinin non-spesifik inhibitörleri ve protein kinazların aktivasyonu, yüksek cAMP konsantrasyonuna neden olarak MPF'ün spesifik inhibitörleri mayozu durdurmaktadır (Meinecke ve ark., 2001; Hashimoto ve ark., 2003).

2.4 Köpek Oositlerinde Partenogenetik Aktivasyon

Köpek oositlerinin *in vitro* maturasyon oranı, ovulasyon karakteristiğine ya da reprodüktif fizyolojisinin farklılığına bağlı olarak oldukça düşüktür (Lee ve ark., 2007; Song ve ark., 2010). Normal şartlarda metafaz II aşamasında kalarak maturasyonunu tamamlayan oositin çekirdek değişim süreci, sperma aktivasyonu ile devam eder. Sperm penetrasyonu olmaksızın mayozun devam ettirilebilmesine ya da dişi gametten, erkek gametin genetik katkısı olmaksızın, embriyo üretebilmesine partenogenetik aktivasyon denmektedir (Kaufman, 1983). Oositlerin partenogenetik aktivasyonu, nükleus transferi ile klonlama, embriyonik kök hücre üretimi gibi birçok biyoteknoloji alanında gerekli olduğundan, oositlerin partenogenetik aktivasyon çalışmaları büyük önem arz etmektedir.

Oosit partenogenetik aktivasyon mekanizması, intrasellüler serbest kalsiyum salınımı temeline dayanmaktadır (Meo ve ark., 2004; Lee ve ark., 2007). *In vivo* şartlarda ise, oosit aktivasyonu spermin oosite penetrasyonuyla, serbest kalsiyum (Ca^{+}) iyonlarının intrasellüler seviyede salınımının artmasıyla indüklenir (Yanagimachi ve Bhattacharyya, 1988). Sitoplazmada artan Ca^{2+} seviyesi, MII korunmasında önemli faktörleri, MPF (Hashimoto ve ark., 1988) ve CSF (cytostatic factor) (Masui, 1991) aktivitesini etkiler ve MPF'nin alt birimi olan siklin B'yi yıkımlar (Nussbaum ve Prather, 1995; Meo ve ark., 2004). Aktivasyon için, *in vitro* şartlarda, kalsiyum iyonofor, elektriksel şok, kalsiyum klorid, protein kinaz inhibitörleri ve sikloheksimid gibi değişik metotlar denenmiştir (Hagen ve ark., 1991; Funahashi ve ark., 1994; Mayes ve ark., 1995, Nussbaum ve Prather, 1995;

Kim ve ark., 1996; Machaty ve ark., 1996). Suni şekilde aktive olan oosit, kortikal reaksiyonu ve mayozu başlatarak, ikinci polar cisimciğin atılmasıyla cevap verir. Bundan dolayı partenogenetik aktivasyondaki olaylar zinciri, penetre spermatozoon tarafından oluşturulan intrasellüler aktivite zincirini taklit eder. Partenogenetik olarak aktive edilen domuz oositlerinde yaklaşık %20–50 oranında blastosist oluşurken (Hewitt ve ark., 1998; Lee ve ark., 2004; Sato ve ark., 2005); bu oran ineklerde %34 (Campbell ve ark., 2000) ve koyunda %50 bulunmuştur (Loi ve ark., 1998).

Köpek oositlerine GV aşamasında uygulanan, Ca-EDTA'nın, mekanizmasının bilinmemesine rağmen, partenogenetik aktivasyon ve pronükleer formasyonunu indüklediği bildirilmiştir. Ca-EDTA uygulaması, oositlerin çinko şelasyonunu etkilemiş, pronükleus formasyonunu stimüle etmiş ve ikinci polar cisimciğin atılmasını sağlamıştır (Lee ve ark., 2007).

2.5 Köpek Oositlerinin Dondurulma Yötemleri

Köpeklerde oositlerin *in vitro* maturasyonu ile ilgili çalışmalar reprodüktif fonksiyonlar ve maturasyon-gelişim süreçlerinin açıklanamamasına bağlı olarak çözülmesi gereken zor bir problem olarak değerlendirilmektedir. Hayvan seçimi, oosit kalite identifikasyonu, çevresel koşullar ve medyum kompozisyonları gibi birçok faktörün ele alındığı çalışmalara rağmen, henüz tatmin edici sonuçlara ulaşılamamıştır (Rodrigues ve Rodrigues, 2010). Düşük *in vitro* maturasyon oranlarının nedenlerinin net olarak açıklanamamasına rağmen, genetik banka oluşturma ve nesli tükenen köpekgillerin korunabilmesi çalışmalarında oosit kriyopreservasyonu önemini korumaktadır (Songsasen ve Wildt, 2007). Bu konu vahşi ve nadir türlerin neslinin korunması ve kıymetli evcil türlerin devamlılığı için önem arz etmektedir (Luvoni, 2013). Oositlerin dondurularak saklanmasının yanında, ovaryan korteksin ya da ovaryumların dondururulması da mümkündür. Bu sayede primer ve primordiyal foliküllerden oluşan büyük havuzun fertil oositleri gelecekte kullanılabilmektedir (Turathum ve ark., 2010; Luvoni 2013; Lopes ve ark., 2016; Fujihara ve ark., 2019). Ovaryum ya da küçük parçalara ayrılarak ovaryan korteks olarak dondurulan oositlerin kültür sonuçları halen tartışmalıdır. Antral folikül ve sağlıklı immatür oositlerin birlikte maturasyon sürecine girmesiyle daha başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Santos ve ark., 2010; Luvoni, 2013). Ancak

vitrifikasyon yönteminin, dokuların histolojik yapısını koruduğunun bildirilmesine rağmen, farelere uygulanan ksenotransplantasyondan sonra antral folikül oluşumu gözlenmemiş olup, eritropoetin uygulandıktan sonra farelerde folikül gelişimi sağlanmıştır (Ishijima ve ark., 2006; Suzuki ve ark., 2008). Ovaryan dokuların yavaş dondurma protokolleriyle saklanmasının ardından ise, ksenotransplantasyon sonuçları oldukça iyi bulunmuştur (Commin ve ark., 2012).

Köpek oositleri GV aşamasında dondurulur ve çözdürüldükten sonra maturasyonu yapılabilir ya da metafaz II aşamasında olgun halde dondurulur ve çözdürüldükten sonra kullanılır (Luvoni, 2013). Oositler, spermayla karşılaştırıldığında, daha büyük hücreler olduğundan farklı kriyotoleransları vardır ve kriyoprotektan solüsyonlarla dondurulmasında ozmotik basınca ulaşabilmesi için daha uzun süreye ihtiyaç duyarlar. Oositler zona pellusida ile çevrili olduğundan permeabilitesi spermaya göre farklı olup plazmatik membran (oolemma) yalnızca hücre çevresinde olur (Luvoni, 2013). Oositlerin ve ovaryan dokuların dondurulmasında iki tip kriyoprezervasyon yöntemi vardır.

1. Yavaş Dondurma: Embriyo dondurma protokollerinden köken almıştır ve su kristalizasyonu esasına dayanır. Dehidrasyon esnasında intraselüler buz kristalleri oluşumuna engel olması için hipertonik solüsyonlar kullanılır. Dimetilsulfoksit (DMSO) ve etilen glikol en çok kullanılan kriyoprotektanlardır. Sıvı azotta saklanmadan önce, programlanabilir dondurma cihazıyla yavaşça düşürülen ısıya maruz kalan oositler payetlerde saklanır (Turathum ve ark., 2010; Abe ve ark., 2011; Lopes ve ark., 2016). Dondurulmuş oositler intrasellüler buz kristallerinin çabuk dağılması için hızlıca çözdürülür ve protektanları bir an evvel uzaklaştırmak için yıkama medyumlarına alınır.

2. Vitrifikasyon: Memeli gametlerinde uygulanan, prosedürü daha basitleştirilmiş ve hücre canlılığının devam ettirilmesinde memnun edici sonuçlara ulaşılan bir yöntemdir. Yoğun kriyoprotektan solüsyonlarla, buz kristalleri oluşturmaksızın, camsı katılaşmaya neden olan fiziksel bir işlemdir ve bundan dolayı hücreler bu süreçte zarar görmemektedir (Kasai 1997; Ataman, 1998).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Hayvan Materyali

Çalışmada, Yıldırım Belediyesi Veteriner İşleri'nin onayı ile adı geçen birimde yapılan rutin ovariohisterektomi (OHE) operasyonlarında çıkartılan ovaryumlar kullanılmıştır. Beş ayrı hayvana ait toplamda 10 adet ovaryum (n=10) kullanılmıştır. Yaşları 2-5 arasında değişen ve ortalama 15-30 kg canlı ağırlık aralığındaki köpeklerden alınan ovaryumlar, hayvanların reprodüktif statüsü dikkate alınmaksızın toplanmıştır.

Tez çalışması, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (21.02.2017 tarihli ve 2017-03/05 numaralı etik kurul kararı) onayı alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.2 Çalışma Materyalinin Toplanması

Operasyona alınacak köpekler bir akşam önceden aç bırakılmış ve ertesi sabah operasyona alınmıştır. Tüm operasyonlar kurumda çalışan Veteriner Hekimler tarafından gerçekleştirilmiştir. Köpekler Xylazine HCl ile 1mg/kg dozda intramuskuler uygulama ile premedikasyona alınmıştır. Genel anestezi 2,5 mg/kg dozda intramuskuler olarak uygulanan ketamin ile sağlanmıştır. Bölgenin traşı yapılıp, asepsi antisepsisi sağlandıktan sonra, ventral median seliotomi yapılmıştır. Her iki ovaryumun kranial bölgesi ve serviksin kraniali 1 numaralı Vicryl ile ligatüre edildikten sonra, kanama kontrolleri yapılarak, periton, kas katmanları ve deri 1 numara Vicryl ile kapatılmıştır. Çıkartılan ovaryumlar 37°C'lik su banyosunda bekletilen 1xPBS içinde toplanarak hızlıca laboratuvara getirilmiştir (**Fotoğraf 1**).

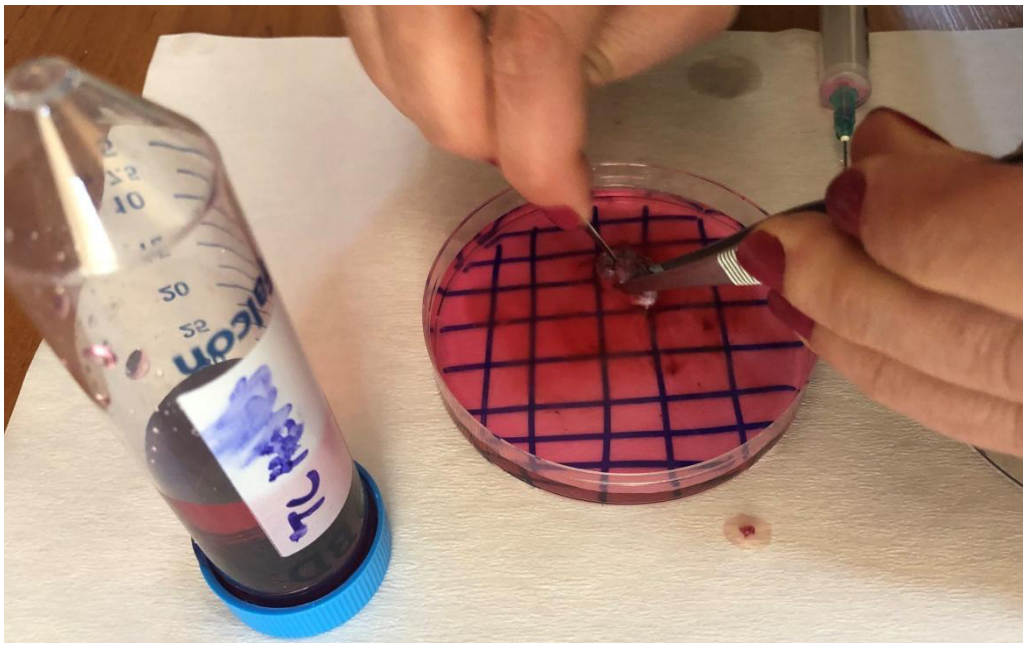


Fotoğraf 1. Laboratuvara getirilen ovaryumlar ve oosit toplama hazırlık aşaması

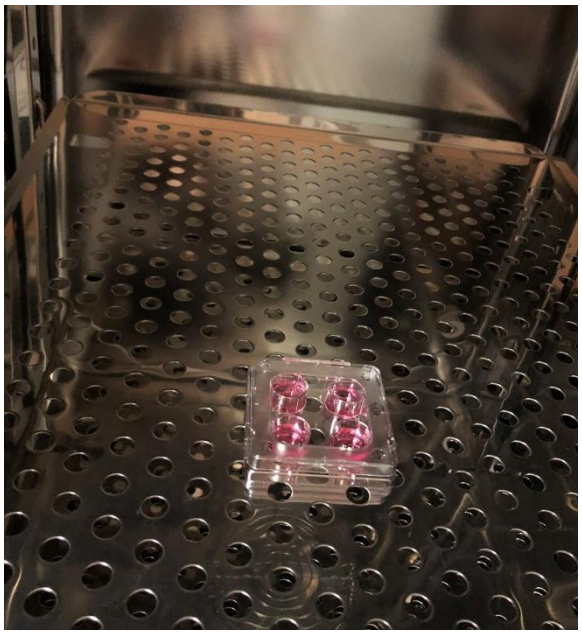
3.3 Oositlerin Toplanması ve Olgunlaştırılması - *İn vitro* maturasyon (IVM)

Laboratuvara getirilen ovaryumlar, steril petriler içinde keskin bistüri uçları kullanılarak çaprazlamasına ve boylamasına tekrarlı kesme yapılarak (*slicing, dilimleme*) parçalanmıştır. Ovaryumlar, bu işlem aralarında 21 gauge steril kanül ve 20 ml'lik TL-HEPES yıkama medyumu çekilmiş enjektör yardımıyla steril petrilerde yıkanmıştır, oositlerin petrilerde çökmesi sağlanmıştır (**Fotoğraf 2**). *Slicing* işlemi tamamlandıktan sonra, stereo mikroskop altında Hamilton enjektör ile toplanan oositler, mini petri kutularında, TL-HEPES içinde 2-3 kez yıkandıktan sonra, olgunlaşma (maturasyon) medyumuna alınmıştır. Olgunlaşma medyumu 4'lü petri kutularında hazırlanmıştır ve her bir kuyucuğa 500 µl konarak, üzerine 250 µl mineral yağ ilave edilmiştir. Oositler yerleştirilmeden en az 3 saat önce olgunlaşma medyumu, %5 CO_2 içeren 39°C'de inkübatörde gazlanmıştır. Her bir kuyucukta 30-40 adet oosit olacak şekilde yerleştirilerek, 72 saat boyunca olgunlaşmaya bırakılmıştır (**Fotoğraf 3**). İnkübasyon sonunda kumulus ekspansiyonu görülenler olgun kabul edilmiştir. Bu süre sonunda toplanan tüm oositlerin denudasyonu, 100 µl TL-HEPES içine eklenen 300 IU/ml hyaluronidaz ile 5-10 dakika boyunca

vortekslenerek yapılmış ve oositler kumulus hücrelerinden ayrılmıştır. Takibinde, oositlerin enzimden uzaklaştırılması için, TL-HEPES medyumunda 3 kez yıkama yapılmıştır.



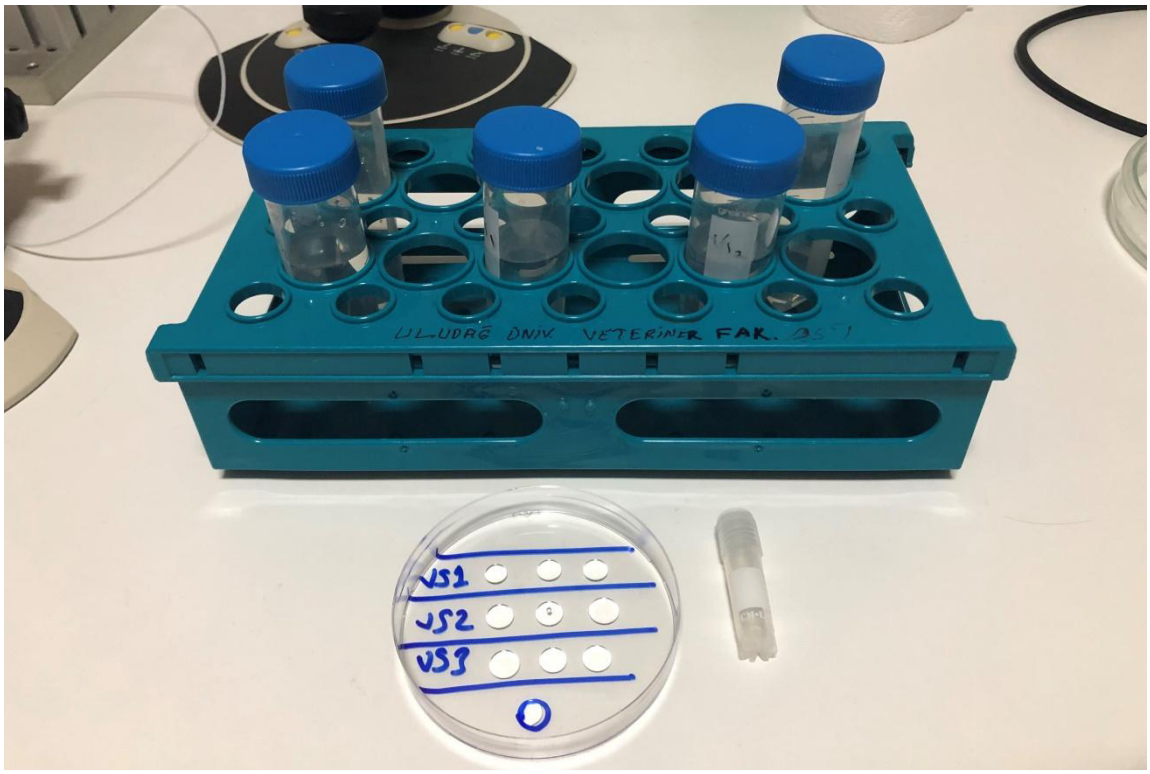
Fotoğraf 2. Oositlerin slicing işlemiyle toplanma aşaması



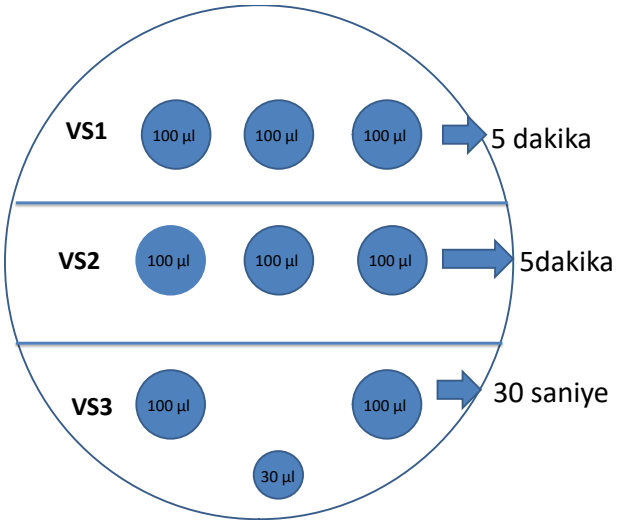
Fotoğraf 3. Toplanan oositlerin *in vitro* maturasyon aşaması

3.4 Oositlerin Dondurulması

Olgunlaşmasını tamamlayan ve kumulus hücrelerinden ayrılan oositler vitrifikasyon metoduyla dondurulmuşlardır. Oda sıcaklığında, sırasıyla VS1 (5 dakika), VS2 (5 dakika) ve VS3 (30 saniye) içinde ekilibrasyonu gerçekleştirilmiştir (**Şekil 2**). Oositler petriler içine hazırlanan 100'er mikrolitrelik 3 mikro damladan 5 dakika süresince geçirilmiştir. Aynı işlem VS2 için de 5 dakika süreli uygulanmıştır. VS3 için 100'er mikrolitrelik 2 damla hazırlanmış ve oositler 30 saniyede bu damlalardan geçirilmiştir. Son aşamada 30 µl VS3 içinde alınan oositler, 2 ml'lik kriyoviyal plastik tüpe aktarılmış ve hızlıca sıvı azotta dondurulmuştur (**Fotoğraf 4**).



Fotoğraf 4. Oositlerin vitrfikasyonu için hazırlık aşaması

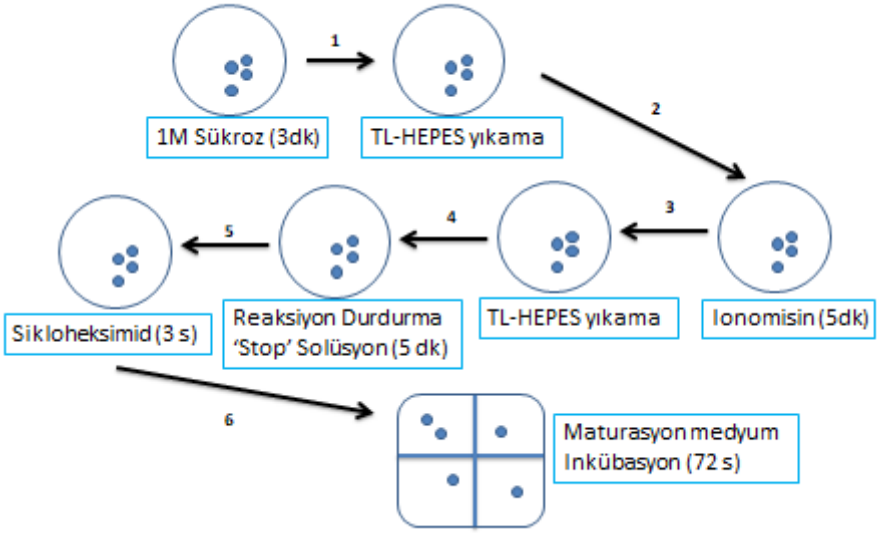


Şekil 2. Vitrfikasyon solüsyonlarının hazırlık safhası

3.5 Oositlerin Çözdürülmesi ve Partenogenetik Aktivasyonu

Sıvı azot içinde saklanan kriyovialler tanktan çıkartılarak 37°C'lik su banyosunda 30 saniye süre ile çözdürülmüştür. Kriyovialler peçete ile iyice kurulandıktan sonra, oositler PBS kullanılarak hazırlanan 1 M Sükroz solüsyonu bulunan 35 mm'lik petriye aktarılmıştır. Üç dakika boyunca oositler, farklı osmotik basınçlar nedeniyle oluşan büzüşmelerin giderilmesi için bekletilmiştir. Takibinde TL-HEPES yıkama solüsyonu içine alınan oositler, aynı solüsyonda 2 kez yıkanmıştır **(Şekil 3).**

Hazır oositler partenogenetik aktivasyona alınmış ve öncelikle ionomisin ile 5 dakika inkübe edilerek ardından TL-HEPES ile yıkanmıştır. Takibinde, 30%'luk BSA ile hazırlanan medyumda beş dakika bekletilerek reaksiyon durdurulmuştur. Üç saatlik sikloheksimid inkübasyonundan sonra, oositler maturasyon medyumu içinde 72 saat boyunca, 39°C'de, 5% karbondioksitli etüv içinde inkübe edilmiştir **(Şekil 3).**



Şekil 3. Vitrifiye oositlerin çözdürme ve partenogenetik aktivasyon aşamaları

3.6 Boyama ve Değerlendirme

Partenogenetik aktivasyondan sonra 72 saat kültüre edilen oositler medyumdan çıkartılarak TL-HEPES içinde 2 kez yıkanmıştır. Aynı esnada 10 µl Hoechst boya 990 µl TL-HEPES içinde karıştırılarak mini petrilere droplar hazırlanmıştır. Droplar içine bırakılan oositler 30 dakika boyunca 39°C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda lam üzerine 20 µl gliserol damlatılmış ve oositler gliserol içine bırakılarak mikroskopta incelenmiştir.

3.7 Elde edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistik analizleri için IBM SPSS 23.0 programı kullanılmıştır ve anlamlı farklılıkların yorumlanmasında α değeri 0.05 olarak hesaplamalara dahil edilmiştir. Veriler, Mann-Whitney U yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.8 Çalışmada Kullanılan Medyumların Hazırlanması

3.8.1 PBS Hazırlanması

Operasyon sonrasında toplanan ovaryumların transportu esnasında kullanılan solüsyon aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır.

PBS (pH 7,2)

NaCl	41 g
Na_2HPO_4 x $2H_2O$	11 g
KH_2PO_4	2,75 g
Distile su	1 litre

3.8.2 TL-HEPES Yıkama Medyumu Hazırlanması

Oositlerin dilimlenmesi esnasında ve çalışma süresince yıkama işlemlerinde kullanılan solüsyon aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır.

TL-HEPES Stok (mg/500 ml)* Medyumu

NaCl	3330
KCl	120
$NaHCO_3$	84
NaH_2PO_4 anhidröz	24
Na laktat (60% şurup)	0,930
$CaCl_2$ x $2H_2O$	150
$MgCl_2$ x $6H_2O$	50
Hepes	1200
Penisilin	32,5
Fenol Kırmızısı	5

*pH değeri 7,4'e ayarlandıktan sonra filtre edilmiştir.

TL-HEPES Yıkama Medyumu

TL-HEPES Stok	50 ml
BSA fraksiyon V	3 mg/ml
Piruvat stok	10 µl/ml (1 ml serum fizyolojik içinde 2,2 mg piruvat)
Gentamisin	0,5 µl/ml

3.8.3 Olgunlaşma (Maturasyon) Medyumu Hazırlanması

Oositlerin 72 saat boyunca olgunlaşmasında (IVM-*in vitro* maturasyon) kullanılan solüsyon aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır.

TCM-199 Solüsyonu

TCM 199	495 mg
$NaHCO_3$	110 mg
Distile su	50 ml

Maturasyon Medyum (5 ml için)

TCM 199	4,5 ml
FCS (60°C'de 30 dak. işlem görmüş)	0,5 ml
Piruvat stok (0,2mM final)	50 µl
NIH oLH (0.023 Units), 5µg/ml final	10 µl
NIH oFSH (0,002 Units), 0,5µg/ml final	2,5 µl
Gentamisin (50mg/µl) 25µg/ml final	2,5 µl

3.8.4 Vitrifikasyon Solüsyonlarının Hazırlanması

Oositlerin vitrifikasyonu için kullanılan solüsyonlar aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır.

	Sakkaroz	Ksiloz	PEG	Gliserol	Etilen glikol	PBS
VS1	1,7115 g	0,7507 g	0,5 g	5 ml	-	50 ml'ye tamamla
VS2	3,4230 g	1,5013 g	1,0 g	5 ml	5 ml	50 ml'ye tamamla
VS3	5,1345 g	2,2520 g	1,5 g	10 ml	10 ml	50 ml'ye tamamla

3.8.5 Çözdürme Solüsyonunun Hazırlanması

Oositlerin çözdürülmesinde kullanılan stok solüsyon aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır. Çözdürme esnasında stok solüsyondan 1 M hazırlanarak kullanılmıştır.

Sakkaroz	10,697 mg
M-PBS	50 ml'ye tamamlanır

3.8.6 Partenogenetik Aktivasyon Solüsyonlarının Hazırlanması

Partenogenetik aktivasyonda kullanılan Kalsiyum ionofor (İonomisin), Sikloheksimid ve Reaksiyon durdurucu (Stop) solüsyonların içerikleri aşağıda verilmiştir.

İonomisin (ION) katılmış medyum (5µM)

TCM 199	4997,5 ml
$NaHCO_3$	2,5 ml

Reaksiyonu durduran (Stop) solüsyon

TL-HEPES Stok	10 ml
BSA fraksiyon V	30 mg/ml
Piruvat stok	10 µl/ml
Gentamisin	0,5 µl/ml

Protein sentez inhibitörü Sikloheksimid katılmış medyum (10 µg/ml)- 5 ml için

TCM 199	4,5 ml
BSA (FAF)	15 mg
Piruvat stok	50 µl
Gentamisin	2,5 µl
Sikloheksimid	50 µl

3.8.7 Partenogenetik Aktivasyon Sonrası Maturasyon Medyumu

Oositlerin partenogenetik aktivasyonundan sonra 72 saat boyunca inkübe edileceği medyum aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır.

TCM 199	4,5 ml
BSA (FAF)	15 mg
Piruvat stok	50 µl
Gentamisin	2,5 µl

3.8.8 Boya Maddesinin Hazırlanması

Hoechst 33342	1 mg

1 ml protein-free SOF içinde çözdürülür.

3.8.9 Alet ve Malzeme Listesi

Alet Listesi

CO_2 inkübatörü
Stereo mikroskop
Isıtma tablası
Steril kabin
Buzdolabı
pH metre
Hassas terazi
Manyetik karıştırıcı

Santrifüj cihazı

Vorteks

Floresans ataçmanlı mikroskop

Malzeme Listesi

Azot tankı

Penset

Enjektörler (5-20-50 ml'lik)

4 gözlü kültür petrileri

35 ve 100 mm'lik kültür petrileri

Otomatik pipetler

Otomatik pipet uçları

Hamilton enjektör

Kimyasal Malzeme Listesi*

Sodyum Klorür (NaCl)

Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4 x $2H_2O$)

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO4)

Potasyum klorür (KCl)

Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$)

Mono sodyum fosfat anhidröz (NaH_2PO_4 anhidröz)

Sodyum laktat (şurup)

Kalsiyum klorid dihidrat ($CaCl_2$ x $2H_2O$)

Magnezyum klorid hegzahidat ($MgCl_2$ x $6H_2O$)

Hepes

Penisilin

Fenol Kırmızısı

Sığır serum albumin (BSA)

Piruvat

Gentamisin

Maturasyon medyum (TCM 199)

Fetal buzağı serum (FCS)

Luteinleştirici hormon (LH)

Folikül stimüle edici hormon (FSH)

Sakkaroz

Ksiloz

Polietilen glikol (PEG)

Gliserol

Etilen Glikol

Sakkaroz

Ionomisin

Sikloheksimid

* Tüm kimyasal maddeler Sigma katoloğundan seçilmiştir.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında maturasyondan sonra vitrifiye edilen köpek oositleri, partenogenetik aktivasyona alınmıştır. Köpek oositlerinin vitrifikasyonunun, aktivasyona olan etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla deney düzenekleri planlanmıştır.

Çalışmada, taze oosit grubu için 6 adet deney düzeneği hazırlanmıştır. Oositler *in vitro* maturasyondan hemen sonra, partenogenetik aktivasyona tabi tutulmuştur. Çalışmanın vitrifiye oositleri için 14 deney grubu hazırlanarak, oositlerin maturasyonu sonunda vitrifikasyon yapılmıştır. Bu oositler 8 deney düzeneği hazırlanarak partenogenetik aktivasyona bırakılmıştır. Herbir grup için GV, GVBD, MI ve MII aşamalarındaki 257'şer oosit (n=257) değerlendirilmiştir. Denejere oositler değerlendirmeye alınmamıştır. Deneyler sonucunda elde edilen tüm veriler **Tablo-1 – 4** arasında ve **Grafik 1**'de sunulmuştur. Çalışmada değerlendirilen oositlerin nükleer durumları **Fotoğraf 5 - 8** arasında sunulmuştur.

Taze ve vitrifiye oosit grupları arasında GV, GVBD, MI ve MII aşamasına ulaşan oosit sayılarının arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Yine iki grup arasında mayotik sürece giren (GVBD, MI ve MII) oositler arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Mayotik sürece giren ve MI-MII aşamasına ulaşmış oositlerin oranları da, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0,05$).

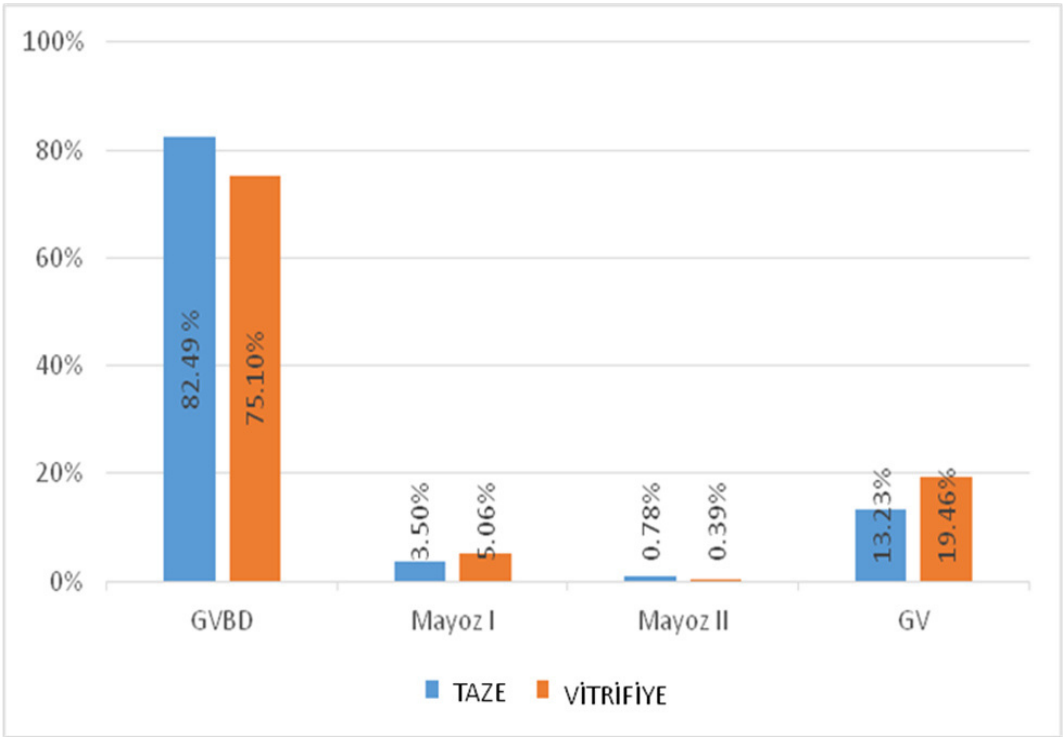
Tablo 1. Partenogenetik aktivasyon sonrası inkübe edilen ortalama oosit sayıları

Taze Oosit (TO) Grubu (n=257) (6-PA düzeneği)	**Vitrifiye Oosit (VO) Grubu (n=257)** (8-PA düzeneği)
42,83±22,19	32,12±23,91

Tablo 2. Gruplar arasında GV, GVBD, MI ve MII oranları (p>0,05)

	GV	**GVBD**	**MI**	**MII**
TO	34 (%13,23)	212 (%82,49)	9 (%3,50)	2 (%0,78)
VO	50 (%19,46)	193 (%75,10)	13 (%5,06)	1 (%0,39)

Grafik 1. Gruplar arasında GV, GVBD, MI ve MII oranları (p>0,05)

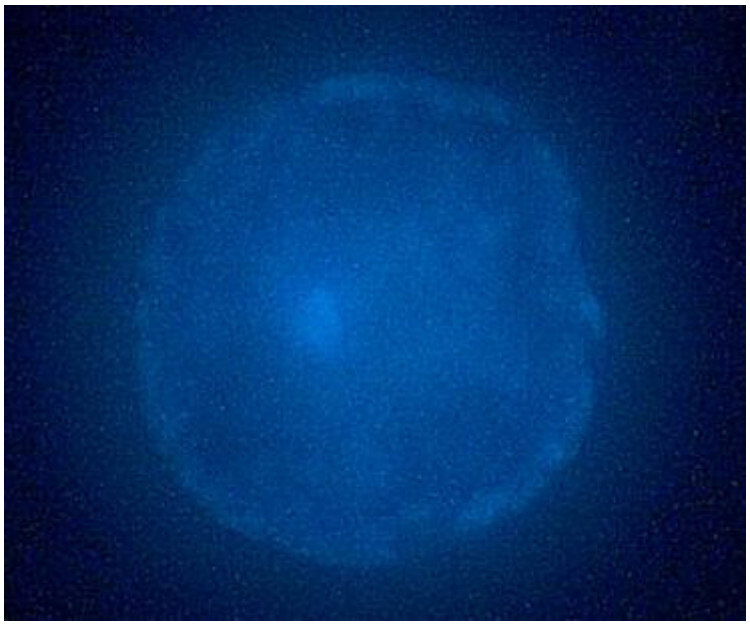


Tablo 3. Mayotik süreci başlatılan ve aktive olan, GVBD, MI ve MII'ye ulaşan oosit oranları

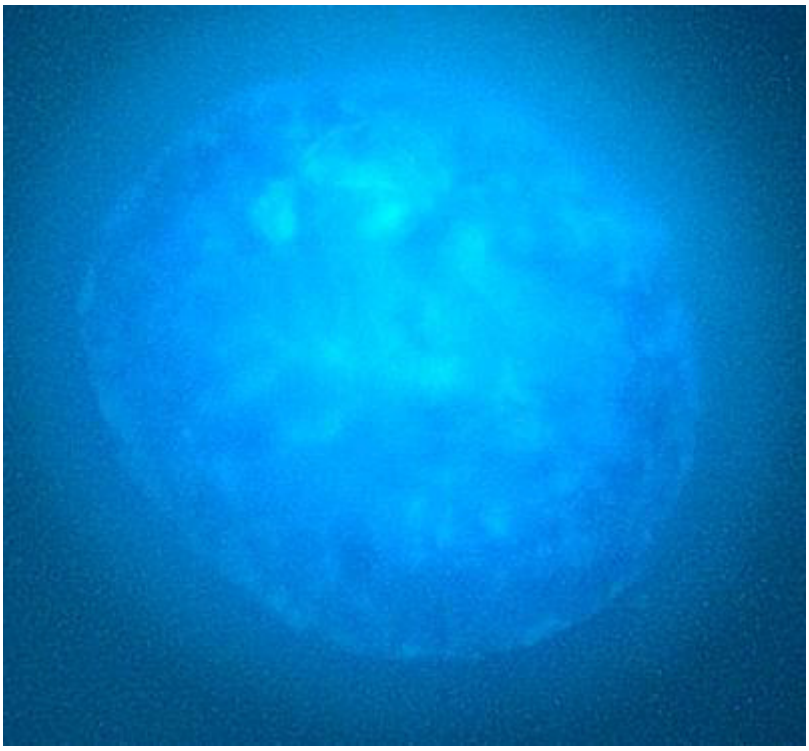
Taze Oosit (TO) Grubu	Vitrifiye Oosit (VO) Grubu
223 oosit (%86,77)	207 oosit (%80,54)

Tablo 4. Mayotik süreci başlatılan ve aktive olan, MI ve MII'ye ulaşan oosit oranları

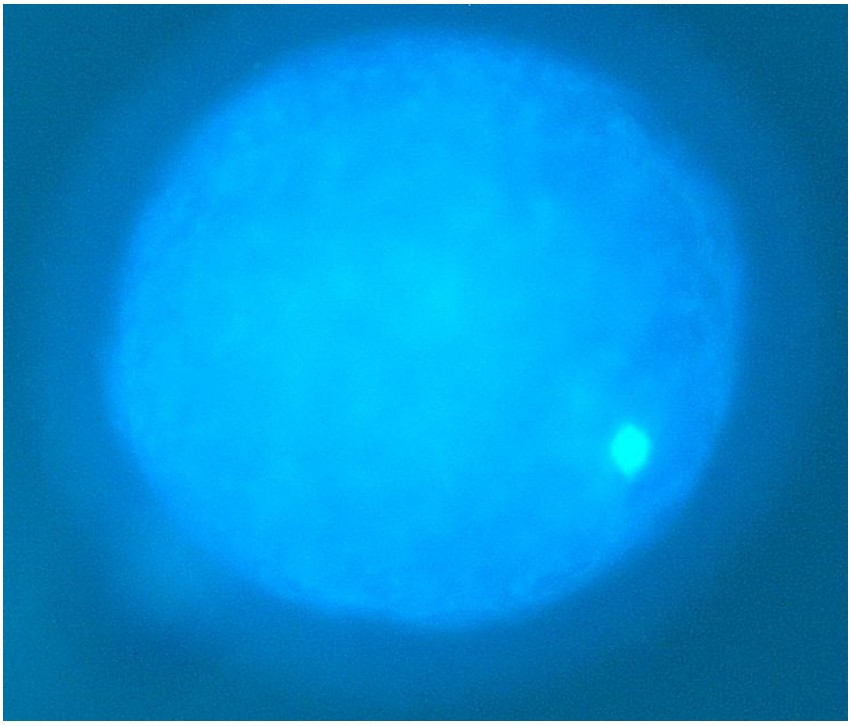
Taze Oosit (TO) Grubu	Vitrifiye Oosit (VO) Grubu
11 oosit (% 4,28)	14 oosit (% 5,44)



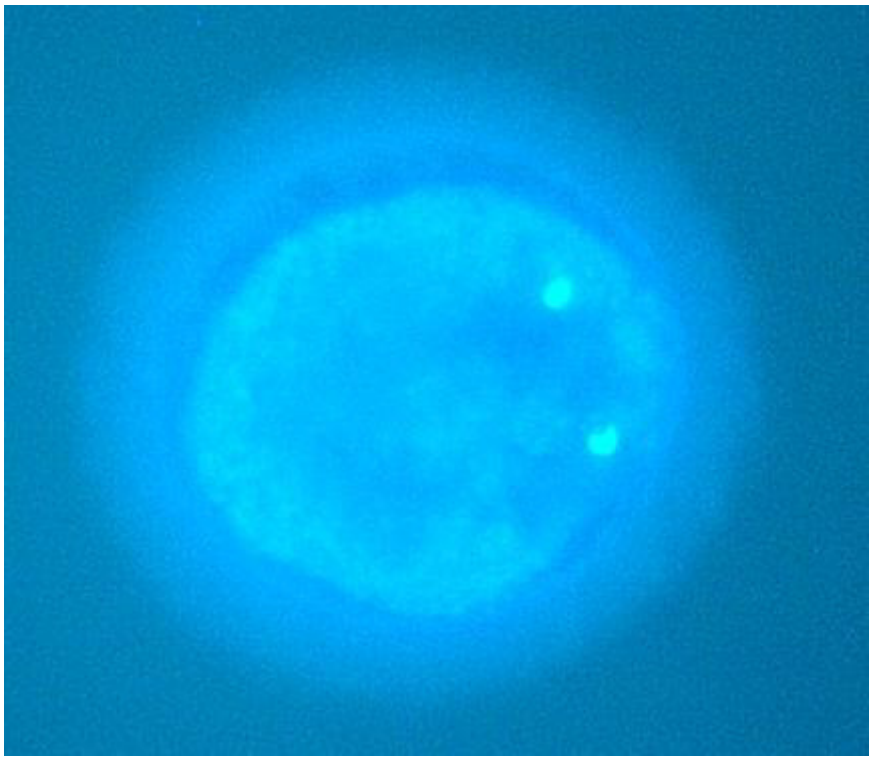
Fotoğraf 5. Germinal vezikül (GV) aşamasındaki oosit görüntüsü



Fotoğraf 6. Germinal Vezikül Break Down (GVBD) aşamasındaki oosit görüntüsü



Fotoğraf 7. Metafaz II (MI) aşamasındaki oosit görüntüsü



Fotoğraf 8. Metafaz II (MI) aşamasındaki oosit görüntüsü

5. TARTIŞMA

Köpek türlerinin in vitro embriyo üretim çalışmalarında ana sorunun *in vitro* maturasyon süreci olduğu belirlenmiştir. Problemin çözümsüz kalmasınının nedeni, köpek reprodüktif fonksiyonları ve oosit maturasyonundan gelişimine kadar ki tüm aşamaların tamamen anlaşılamaması olarak açıklanmaktadır. *İn vitro* maturasyonunun başarısının düşük olmasından dolayı, *in vitro* embriyo üretimi, kriyopreservasyon ya da nükleus transferi çalışmaları da sınırlı olarak devam etmektedir (Luvoni ve ark., 2005). *İn vitro* maturasyonu geliştirme çalışmaları devam ederken, reprodüktif biyoteknolojinin vazgeçilmez bir parçası olan oosit kriyoprezervasyonuna ilişkin çalışmalar da hız kazanmıştır. Bu çalışmada oositlerin *in vitro* maturasyon ve vitrifikasyonundan sonra, partenogenetik aktivasyona alınan köpek oositlerinin nükleus maturasyonu değerlendirilmiştir.

Çalışmada toplanan oositlerin tamamı *in vitro* maturasyon sürecine alınmıştır. Bu oositlerin bir kısmı vitrifikasyondan sonra 7-10 gün içinde çözdürülerek partenogenetik aktivasyona prosedürüne maruz bırakılmıştır. Bu grubun oositleri (VO-vitrifiye oosit) olarak tanımlanmış ve 8 çalışma paketinde toplam 257 oosit değerlendirmeye alınmıştır. Diğer grubun oositleri ise *in vitro* maturasyondan sonra partenogenetik aktivasyona bırakılmıştır. Bu grubun oositleri taze oosit (TO) olarak tanımlanmış ve 6 çalışma paketinde toplam 257 oosit değerlendirmeye alınmıştır. Partenogenetik aktivasyondan sonra mayotik başlamayı hiç gerçekleştirememiş GV aşamasındaki oosit oranları ve mayotik sürece giren oositler (GVBD) bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Yine MI ve MII verilerinde ise, gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptanamamıştır. Vitrifikasyonun iki şekilde yapılabileceği bildirilmiştir. İlki oositlerin toplanmasının ardından GV aşamasında dondurulup, çözdürüldükten sonra maturasyona alınıp kullanılmasıdır. İkinci uygulama ise, maturasyon aşamasını takiben dondurulup çözdürüldükten sonra kullanılmasıdır (Luvoni, 2013). Çalışmamızda ikinci metot kullanılarak, maturasyon aşamasından sonra vitrifiye edilmiş oositler aktivasyonda kullanılmıştır. Aktivasyon sonunda (VO) oositlerinin %75,10'u (193 adet) GVBD, %5,06'sı (13 adet) MI ve %0,39'u (1adet) MII aşamalarına girmiştir; %19,46'sı (50 adet) ise GV aşamasında kalmıştır. Kontrol grubunun (TO) oositlerinin %82,49'u

(212 adet) GVBD, %3,50'si (9 adet) MI ve %0,78'i (2 adet) MII aşamalarına girmiştir; %13.23'üyse (34 adet) GV aşamasında kalmıştır.

Çalışmada partenogenetik aktivasyon ionomisin ve sikloheksimid ile yapılmıştır. Ionomisin intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunu artırarak oosit aktivasyonunu başlatmak için kullanılır (Funahashi ve ark., 1994). Sikloheksimid glutaramid antibiyotik olup, protein sentez inhibitörü olarak GVBD ve oosit maturasyonu ile protein sentez inhibisyonu yoluyla oosit aktivasyonuna olumlu etkilerinden dolayı kullanılmaktadır (Fulka ve ark., 1986; Fulka ve ark., 1991; Yang ve ark. 1994; Liu ve ark., 1998). Basitçe MPF'nin siklin B alt birimini degrade etmek için kullanılmaktadır (Watanabe ve ark.,1989). Köpek oositleri ionomisin ve sikloheksimidin birlikte kullanımıyla partenogenetik aktivasyon sonrası değerlendirilmiştir. Ionomisinin tek kullanımının, kombinasyondan daha başarılı sonuç verdiği ve GVBD, MI, MII aşamalarındaki oositlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir (Song ve ark., 2010). Ionomisin uygulanan toplam 121 oositten 27'si GVBD, 41'i MI ve 24 tanesi MII aşamasında belirlenmiştir. Ionomisin ve sikloheksimid kombinasyonunda ise toplam 112 oositten 45 tanesi GVBD, 19 tanesi MI ve 13 tanesi MII düzeyinde kalmıştır (Song ve ark., 2010). Yüzde oranlarıyla karşılaştırıldığında, çalışmada alınan sonuçların, tezde alınan sonuçlara göre oldukça yüksek olduğu söylenebilir. Çalışmanın *in vitro* maturasyon aşamasında, maturasyon kültüre katılan büyüme faktörlerinin bu farkı yarattığı düşünülmektedir. Tez çalışmasında, GVBD aşamasına giren oosit oranı, Song ve ark.'larının (2010) çalışmasına göre yüksek bulunmasına rağmen, MI ve MII aşamasına ulaşanların oranındaki farklılık dikkati çekmektedir. Ancak tez çalışmasının düşük MI ve MII oranlarına rağmen, gruplar arasında anlamlı fark olmaması, vitrifikasyonun nükleer maturasyona olumsuz etki yaratmadığını düşündürtmektedir. İnek oositlerinde sikloheksimidin mayozu durdurduğu bilgisine paralel olarak, köpek oositlerinde de benzer etki olabileceği belirtilmiştir ve çalışma sonuçlarımız da bu sonucu desteklemektedir (Song ve ark., 2010; Saeki ve ark., 1998). Oositlerin GV aşamasında vitrifiye edilmesinden sonra, maturasyona bırakılarak nükleus maturasyonu değerlendirilmiş ve sonuçlar, vitrifikasyonun mayotik maturasyona başlamada olumsuz etkileri olduğu ileri sürülmüştür. Ancak MI ve MII aşamalarına ulaşan oosit sayısı arasında istatistiksel fark bulunamamıştır.

Transmission elektron mikroskop ile vitrifiye oositler incelendiğinde mayozun başlatılmasında önemli olan kortikal granüller, mitokondri, düz endoplazmik retikulum gibi yapıların zarar gördüğü belirtilmiştir (Turathum ve ark., 2010). Oosit dondurmada en etkili yöntemi oluşturabilmek için yeni gelişme protokollerinin hazırlanmasının önemi vurgulanmıştır (Turathum ve ark., 2010). Çalışmamızda maturasyon sonrası vitrifikasyon yapıldığından ve konu ile ilgili başka literatür bulunamadığından sonuçlar karşılaştırılamamaktadır. Ancak, gonadotropinlerle hazırlanmış maturasyon medyumları kullanılarak yapılan bu tezde, maturasyon öncesi ve sonrasında oositlerin vitrifiye edilmesi, takibinde meydana gelen değişikliklerin moleküler düzeyde değerlendirilmesinin yararlı olabileceği kanısındayız.

Başka bir araştırmada ise, Ca-EDTA ile yapılan oosit aktivasyonu %8 oranında başarılı olmuş ve başka türlerle yapılan karşılaştırmalara göre çok düşük oranda bulunmuştur. Çalışmanın başarısının olumsuz etkilenmesi ise maturasyon oranının düşük olmasına bağlanmıştır (Lee ve ark., 2007).

Ionomisin ve sikloheksimid ile yapılan çalışmalarda *in vitro* maturasyon oranlarının yüksek olduğu dikkati çekmektedir (Song ve ark., 2010). Çalışmamızda alınan düşük oranların bu sonuçlarla paralel değerlendirilmesi gerektiği kanısındayız. Tezde *in vitro* maturasyonun değerlendirilmesi yapılmadan aktivasyon yapılmıştır. Muhtemelen diğer çalışmalardan farklı olarak, sadece hormon katkıları köpek oositleri için yeterli olamamıştır. Gonadotropik hormonların *in vitro* maturasyona önemli katkısı olduğu bildirilmiştir. Nükleer maturasyonun tamamlanmasında cAMP konsantrasyonundaki değişimler MPF'nin aktivitesini kontrol etmektedir. cAMP'nin artması FSH ve LH'ya cevap olarak mayotik başlangıcı belirlemektedir (Sirard ve First, 1988; Luciano ve ark., 2004; Mehlmann 2005a; Smitz ve ark., 2011). FSH'nın aynı zamanda mayotik yeterliliğin önemli bir parametresi olarak kabul edilen kumulus hücre ekspansiyonuna pozitif etkileri vardır (Sutovsky ve ark., 1993). FSH ve LH'nın tek başına ve birlikte kullanılan medyumlarla yapılan çalışmalardan mayoz başlangıç oranı en yüksek %59 oranıyla en yüksek FSH+LH kombinasyonundan elde edilmiştir (Luvoni ve ark., 2003). Ancak çalışma sonuçlarımızdan da anlaşılabileceği gibi, gonadotropik hormon katkılarının tek başına yeterli olmadığı görülmektedir. Büyüme faktörleri ve antioksidanlar gibi katkı

maddeleri katılarak maturasyona bırakılan oositlerin aktivasyona alınmaları sonucunda daha başarılı oranlara ulaşılabileceği kanısındayız.

Oosit maturasyonunda uygun biyokimyasal ortamın hazırlanması ve optimal maturasyon süresinin belirlenmesi, başarı oranının artırılmasında önemlidir. Kültür medyumunda kullanılan üç farklı solüsyon [(Modifiye Krebs Ringer Bikarbonat (mKRB), Sentetik Oviduktal Sıvı (SOF), TCM-199)] hormon, antioksidan, büyüme faktörleri, protein ve enerji katkılarıyla zenginleştirilebilir (Otoi ve ark., 1999; Luvoni ve ark., 2005; Oh ve ark., 2005). TCM 199'un MII aşamasında en iyi sonucu verdiği bildirilirken (Cinone ve ark., 1992), SOF ve TCM-199'un karşılaştırıldığı bir çalışmada, GVBD aşamasına giren oositlerin oranı sırasıyla %56,9 ve 68,6% olarak bulunmuş ve oranlar arasında fark olmadığı saptanmıştır (Rota ve Cabianca, 2004). Diğer yandan bazı araştırıcılar, oositlerin maturasyon ve fertilizasyon süreçlerini tamamlayamadığından, SOF'un köpek oositleri için uygun ve başarılı bir medyum olmadığını ileri sürmüşlerdir (Hewitt ve England, 1999; Machado, 2007). Çalışmamızda hem *in vitro* maturasyon medyumu hem de aktivasyon sonrası maturasyon medyumunda TCM 199 kullanılmıştır. Tezde TO grubuna ait oositlerin GVBD aşamasına girme oranı %82,49 olarak bulunmuş olup, bu sonuçlar diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Temelde TCM 199 medyumu kullanılarak farklı katkı maddelerin sonuçlar arasında farklılıklara sebep olduğu bildirilmiştir. Alınan başarılı sonuçların büyük oranda sentetik oviduktal sıvı katkısıyla artırılabildiği ileri sürülmüştür (Hewitt ve England, 1999; Fathi ve ark., 2018). Çalışmamızda TCM 199 medyumunda LH, FSH, fetal calf serum (FCS) ve antibiyotik katkılı maturasyon medyumu kullanılmıştır ve mayoz başlama oranı yüksek bulunmuştur (%86,77). Ancak aradaki farkın bu oranda yüksek olması, diğer çalışmada ortalama değerlere dejenere oosit oranlarının katılmasından kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmektedir. Tezde GV, GVBD, MI ve MII'ye giren oositler değerlendirilmiş olup, dejenere oositler değerlendirme dışında tutulmuştur.

Gamet hücrelerinin uzun süre saklanabilmesine olanak sağlayan dondurma teknolojisi ilk kez sprema ile başlatılmıştır (Leibo ve Brandley, 1999). Kryoprotektanların donma esnasında gelişen soğuk şokuna karşı koruma sağladığı ve kryoprotektanların optimum katım oranlarının türe özgü olduğu bildirilmiştir (Bucak ve Tekin, 2007). Oosit ve embriyonun başarılı kriyoprezervasyonu, dondurma-

çözdürme süreçlerinde meydana gelen kriyoinjuri oranına bağlıdır. Sitoplazmadaki yüksek lipid içeriğinin işlemler esnasında inek, domuz ve özellikle diğer türlere göre çok yüksek lipid içeren köpek embriyolarında geri dönüşsüz probleme neden olduğu bildirilmiştir (Abe ve ark., 2008a).

Köpek oosit vitrifikasyonu için ya ovaryum dokusu yada GV aşamasındaki oositlerin kriyoprezervasyonu tercih edilmiştir (Abe ve ark., 2008b; Abe ve ark., 2010; Turathum ve ark., 2010; Fujihara ve ark., 2019). GV aşamasında yapılmış iyi dondurma ve saklama süreçlerinin köpek üretiminde daha avantajlı olduğu, köpek oositlerinin fizyolojik farklılıkları ve *in vitro* maturasyon oranlarının düşük olmasından dolayı, bu uygulamanın daha iyi sonuçlar verebileceği dikkati çekmektedir. Aynı vitrifikasyon metodunun oosit içeren ovaryum dokularının kullanılmasında yine aynı avantaja sahip olduğu bildirilmiştir (Abe ve ark., 2010). İnek ve domuz oositlerinde, kromozomları tutan iğ iplikçiklerinin depolimerizasyonu, MII aşamasında dondurma sürecinde geri dönüşsüz oluşmuştur (Shaw ve ark., 2000; Kasai 2002). Köpek oositlerinde ise böyle bir patoloji bildirilmemiştir. Çalışmamızda yukarıdaki bilgilerin aksine maturasyon sonrası oositler vitrifiye edilmiştir. Kedilerde maturasyon sonrası vitrifiye oositler ile çalışmalar bulunmaktadır; ancak, köpek oositleriyle yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır (Murakami ve ark., 2004; Merlo ve ark., 2008). Çalışmamızda vitrifikasyonun, taze oosit oranlarıyla karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı görülmüştür. Ancak, maturasyon sonrası muhtemel kriyoinjuriye ait bilgilere ulaşılabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

Abe Y, Suwa Y, Ueta YY et al (2008 a) Preimplantation development in Labrador retrievers. J Reprod Dev: 54, 135–137.

Abe Y, Lee DS, Kim SK et al (2008 b) Vitrification of canine oocytes. J Mamm Ova Res: 25, 32-36.

Abe Y, Asano T, Ali M et al (2010) Vitrification of canine cumulus–oocyte complexes in DAP213 with a cryotop holder. Reprod Med Biol: 9, 115–120.

Abe Y, Suwa Y, Asano T et al (2011) Cryopreservation of canine embryos. Biology of Reproduction: 84, 363–368.

Aktas H, Leibfried-Rutledge L, First NL (2003) Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP, cumulus, and granulosa. Mol Reprod Dev: 65, 336-343.

Andersen AC, Simpson ME (1973) The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). Geron-X Inc., Los Altos, USA.

Ashkenazi H, Cao X, Motola S et al (2005) Epidermal Growth Factor Family Members: Endogenous Mediators of the Ovulatory Response. Endocrinology: 146, 77-84.

Ataman MB (1998) Koyun embriyosunun dondurulması. Hayvancılık Araştırma Dergisi: 8(1-2), 38-39.

Barber MR, Lee SM, Steffens WL et al (2001) Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. Theriogenology: 55, 1705–1717.

Beijerink NJ, Kooistra HS, Dieleman SJ et al (2004) Serotonin antagonist-induced lowering of prolactin secretion does not affect the pattern of pulsatile secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in the bitch. Reproduction: 128, 181–188.

Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL et al (1996) Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. Endocr Rev: 17, 639-669.

Blackmore DG, Baillie LR, Holt JE et al (2004) Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. Biol Reprod: 71, 661–668.

Bolamba D, Borden-Russ KD, Durrant BS (1998) İn vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. Theriogenology: 49, 933–942.

Bolamba D, Russ KD, Olson MA et al (2002) İn vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicle in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. Theriogenology: 58, 1689–1703.

Bolamba D, Russ KD, Harper SA et al (2006) Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro . Theriogenology: 65, 1037–1047.

Borman SM, Chaffin CL, Schwinof KM et al (2004) Progesterone Promotes Oocyte Maturation, but Not Ovulation, in Nonhuman Primate Follicles Without a Gonadotropin Surge. Biol Reprod: 71, 366-373.

Bucak MN, Tekin N (2007) Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. Ankara Üniv Vet Fak Derg: 54, 67-72.

Bukowska D, Kempisty B, Piotrowska H et al (2012) The in vitro culture supplements and selected aspects of canine oocytes maturation. Pol J Vet Sci: 15(1), 199-205.

Campbell KD, Reed WA, White KL (2000) Ability of integrins to mediate fertilization, intracellular calcium release, and parthenogenetic development in bovine oocytes. Bio Reprod: 62, 1702–9 e.

Chakraborty PK (1987) Reproductive hormone concentrations during estrus, pregnancy, and pseudopregnancy in the Labrador bitch. Theriogenology: 27, 827–840.

Chastant-Maillard S, Viaris de Lesegno C, Chebrout M et al (2011) The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation. Reproduction Fertility and Development: 23, 391–402.

Chian RC, Niwa K, Nakahara H (1992) Effect of sperm penetration in vitro on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. Journal of Reproduction and Fertility: 96, 73–78.

Cinone M, Ghneim A, Caira M et al (1992) Collection and maturation of oocytes in the bitch. Proc 12th Int Congr Anim Reprod: 4, 1767–1769

Concannon PW, Weigand N, Wilson S et al (1979) Sexual behavior in ovariectomized bitches in response to estrogen and progesterone treatments. Biol Reprod: 20, 799-809.

Concannon PW, McCann JP, Temple M (1989) Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy, and parturition in the dog. J Reprod. Fertil: 39, 3–25.

Concannon PW (1993) Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. J Reprod Fertil Suppl: 47, 3–27.

Concannon P, Tsutsui T, Shille V (2001) Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. J Reprod Fertil: 57, 169–179.

Concannon PW (2011) Reproductive cycles of the domestic bitch. Animal Reproduction Science: 124, 200-210.

Conti M, Andersen CB, Richard F et al (2002) Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. Mol Cell Endo: 187, 153-159.

Conti M, Hsieh M, Park J-Y et al (2006) Role of EGF network in ovarian follicles. Mol Endocrinl: 715–723.

Commin L, Buff S, Rosset E et al (2012) Follicle development in cryopreserved bitch ovarian tissue grafted to immunodeficient mouse. Reprod Fertil Dev: 24, 461–471.

Dekel N (1995) Molecular control of meiosis. Trends Endocrinol Metab: 6, 165-169.

Durrant BS, Pratt NC, Russ KD et al (1998) Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. Theriogenology: 49, 917–932.

Edry I, Sela-Abramovich S, Dekel N (2006) Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. Mol Cell Endo: 252, 102-106.

England GC, Allen WE (1989) Ultrasonographic and histological appearance of the canine ovary. The Veterinary Record: 125, 555–556.

Eppig JJ, Viveiros M, Bivens C et al (2004) Regulation of mammalian oocyte maturation. Chapter 7. The Ovary. Second Edition. Editors: Peter C.K. Leung & Eli Y. Adashi, 113-129.

Fair T, Carter F, Park S et al (2007) Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. Theriogenology: 68, 91-97.

Farstad W, Hyttel P, Grøndahl C et al (1993) Fertilization and early embryonic development in the blue fox (Alopex lagopus). Mol Reprod Dev: 36, 331–337.

Farstad W, Mondain-Monval M, Hyttel P et al (1989) Periovulatory endocrinology and oocyte maturation in unmated mature blue fox vixens. Acta Vet Scand: 30, 313-319.

Farstad W (2000) Assisted reproductive technology in canid species Theriogenology: 53, 175–186.

Fathi M, Salama A, Badr MR (2018) Improvement of the developmental competence of canine oocyte using caffeine supplementation during IVM at different maturation time. Zygote: 26, 162–167.

Feldman EC, Nelson RW (2004) Ovarian cycle and vaginal cytology. In Kersey R and LeMelledo D, editors. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction 3rd ed. St. Louis, MO: W.B. Saunders Company p 752-773

Feldman E, Nelson R (1996) Canine and feline endocrinology and ed:2 Philadelphia

Firmani L (2018) The G protein-coupled receptor, GPR3, promotes the acquisition of oocyte meiotic competence. Doktota Tezi, https://opencommons.uconn.edu/ dissertations/1694

Freudzon L, Norris RP, Hand AR et al (2005) Regulation of meiotic prophase arrest in mouse oocytes by GPR3, a constitutive activator of the Gs G protein. J Cell Bio: 171, 255-265.

Fujii M, Otoi T, Murakami M et al (2000) The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. J Vet Med Sci: 62, 305–307.

Fujihara M, Kaneko T, Inoue-Murayama M (2019). Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles. Scientific Reports: 9, 3970.

Fulka JJ, Motlik J, Fulka J et al (1986) Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocyte. J Reprod Fertil: 77, 281–285.

Fulka JJ, Leibfried-Rutledge ML, First NL (1991) Effect of 6-dimethyl-aminopurine on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes. Mol Reprod Dev: 29, 379–384.

Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT et al (1994) İn vitro development of in vitro matured porcine oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. Biol Reprod: 50, 1072–1077.

Funahashi H, Cantley TC, Day BN (1997) Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. Biol Reprod: 57, 49–53.

Gall L, Ruffini S, Le Bourhis D et al (2002) Cdc25C expression in meiotically competent and incompetent goat oocytes. Mol Reprod Dev: 62, 4-12.

Gall L, Boulesteix C, Ruffini S et al (2005) EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat cumulus cells during in vitro maturation. Mol Reprod Dev: 71, 489–494.

Gill A, Jamnongjit M, Hammes SR (2004) Androgens Promote Maturation and Signaling in Mouse Oocytes Independent of Transcription: A Release of Inhibition Model for Mammalian Oocyte Meiosis. Mol Endocrinol: 18, 97-104.

Gobello C, Concannon PW, Verstegen J (2002) Canine peudopregnancy: a review. In: Concannon P, England G, Verstegen J, editors. Recent advances in small animal reproduction. International Veterinary Information Service (www.ivis.org).

Gordon I (1994) Laboratory production of cattle embryos. Wallingford: Cab International.

Grazul-Bilska A, Reynolds LP, Redmer DA (1997) Gap junctions in the ovaries. Biol Reprod: 57, 947–957.

Gudermuth DF, Concannon PW, Daels PF et al (1998) Pregnancy-specific elevations in fecal concentrations of estradiol, testosterone and progesterone in the domestic dog (Canis familiaris). Theriogenology: 50, 237–248.

Guraya SS (1995) A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog. J Exp Zool: 160, 123–136.

Hashimoto N, Kishimoto T, Nagahama Y (1988) Inhibition of LH-induced and spontaneous meiotic maturation in mouse oocytes by N alpha-tosyl-L-lysine chloromethylketone. J Exp Zool: 247, 177–182.

Hagen DR, Prather RS, First NL (1991) Response of porcine oocytes to electrical and chemical activation during maturation in vitro . Mol Reprod Dev: 28, 70-73.

Hashimoto S, Kimura K, Iwata H et al (2003) Oocyte transport and developmental competence of bovine oocytes arrested at germinal vesicle stage by cycloheximide under air. J Reprod Dev: 49, 61-66.

Heape W (1897) Artificial insemination of mammals and the subsequent fertilisation or İmpregnation of their ova. Proc Royal Soc: 61, 52-63.

Hewitt DA, Watson PF, England GCW (1998) Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. Theriogenology: 49, 1083–1128.

Hewitt DA, England GCW (1999) Synthetic oviductal fluid and oviductal cell co-culture for canine oocyte maturation in vitro . Anim Reprod Sci: 55, 63–75.

Hinckley M, Vaccari S, Horner K et al (2005) The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. Dev Biol: 287, 249-261.

Hoffmann B, Höveler R, Hasan SH et al (1992) Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. J Reprod Fertil: 96(2), 837-845.

Hoffmann B, Hoveler R, Nohr B et al (1994) Investigations on hormonal changes around parturition in the dog and the occurrence of pregnancy-specific non conjugated oestrogens. Exp Clin Endocrinol: 102, 185–189.

Hoffmann B, Busges F, Engel E et al (2004) Regulation of corpus luteum-function in the bitch. Reprod Domest Anim 39, 232–240.

Holst PA, Phemister RD (1971) The prenatal development of the dog: preimplantation events. Biol Reprod: 5, 194-206.

Hsieh M, Lee D, Panigone S et al (2005) Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network id essential for ovulation. Molecular and Cellular Biology: 27, 1914-1924.

Hyttel P, Flair T, Avery B et al (1999) Transcriptional activity and ultrastructure in bovine oocytes. Reprod Domest Anim: 34, 247–254.

Ishijima T, Kobayashi Y, Lee DS et al (2006) Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. J Reprod Dev: 52, 293–299.

Jamnongjit M, Gill A, Hammes S (2005) Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. Proc Natl Acad Sci USA: 102, 16257-16262.

Johnston S, Kustritz M, Olson P (2001) Canine and Feline Theriogenology, 2nd edn, W. B. Saunders Company

Jones K T (2004) Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. Mol Hum Reprod: 10, 1-5.

Kalinowski RR, Berlot CH, Jones TL et al (2004) Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. Dev Biol: 267, 1-13.

Kasai M (1997). Vitrification: refined strategy for the cryopreservation of mammalian embryos. Journal of Mammalian Ova Research: 14(1), 17-28

Kasai M (2002) Advaces in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. Reprod Med Biol: 1, 1-9.

Kaufman MH (1983) The experimental induction of parthenogenesis in the mouse. In: Malls M, Wild AE (eds), Early Development of Mammals. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25–44.

Keynaud K, Fontbonne A, Marseloo N et al (2005) In vivo meiotic resumption, fertilization and eraly embryonic development in the bitch. Reproduction: 130, 193-201.

Kim N-H, Simerly C, Funahashi H et al (1996) Microtubule organization in porcine oocytes during fertilization and parthenogenesis. Biol Reprod: 54, 1397-1404.

Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ et al (2005) Effects of estradiol-17β and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. Theriogenology: 63, 1342–1353.

Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Froehlich C et al (1999) Canine preprorelaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta. Biol Reprod: 60, 551–557.

Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM et al (1999) Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in Beagle bitches. Biol Reprod: 60, 65–71.

Kooistra HS, Okkens AC (2001) Role of changes in the pulsatile secretion pattern of FSH in initiation of ovarian folliculogenesis in bitches. J Reprod Fertil: 57, 11–14.

Kowalewski MP, Schuler G, Taubert A et al (2006) Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. Theriogenology: 66(6-7), 1423-1430.

Kowalewski MP, Gram A, Kautz E et al (2015) The Dog: Nonconformist, Not Only in Maternal Recognition Signaling. In: Geisert R., Bazer F. (eds) Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, vol 216. Springer, Cham

Kubelka M, Motlik J, Schultz RM et al (2000) Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. Biol Reprod: 62, 292-302.

Laufer N, Botero-Ruiz W, DeCherney AH et al (1984) Gonadotropin and prolactin levels in follicular fluid of human ova successfully fertilized in vitro . J Clin Endocrinol Metab: 58, 430-434.

Lee JW, Tian XC, Yang X (2004) Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. Mol Reprod Dev: 68, 51–57.

Lee SR, Kim JW, Kim BS et al (2007) The parthenogenetic activation of canine oocytes with Ca-EDTA by various culture periods and concentrations. Theriogenology: 67, 698–703.

Leibo SP, Brandley L (1999) Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. 502-515. In: C Gagnon (Ed), The Male Gamet. Cache River Press, St Louis.

Li M, Ai JS, Xu BZ et al (2008) Testosterone Potentially Triggers Meiotic Resumption by Activation of Intra-Oocyte SRC and MAPK in Porcine Oocytes. Biol Reprod: 79, 897-905.

Liu L, Ju J, Yang X (1998) Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. Mol Reprod Dev: 49, 498–507.

Loi P, Ledda S, Fulka Jr J et al (1998) Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. Biol Reprod: 58(5), 1177–1187.

Luciano AM, Modina S, Vassena R et al (2004) Role of intracellular cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells cummunications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovine oocyte. Biol Reprod: 70, 465-472.

Lopes CA, Alves AM, Jewgenow K et al (2016) Cryopreservation of canine ovarian cortex using DMSO or 1,3-propanediol. Theriogenology: 86(5), 1165-1174.

Lutz LB, Cole LM, Gupta MK et al (2001) Evidence that androgens are the primary steroids produced by Xenopus laevis ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. Proc Natl Acad Sci USA: 98, 13728-13733.

Luvoni GC, Luciano AM, Modina S et al (2001) Influence of different stages of the estrous cycle on cumulus–oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of in vitro maturation. J Reprod Fertil Suppl: 57, 141–146.

Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E et al (2005). Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. Theriogenology: 63, 41–59.

Luvoni GC (2013) Cryobanking of Oocytes and Ovarian Tissue in Cats and Dogs World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings.

Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E et al (2003) Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. Reprod Domest Anim: 38, 410–414.

Machado MA (2007) Efeito do fator de crescimento IGF-I sobre a maturação in vitro de oócitos caninos (canis familiares): avaliação da maturação nuclear e citoplasmática [in Portuguese]. Jaboticabal, SP: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. 76 pp. Thesis.

Machaty Z, Funahashi H, Mayes MA et al (1996) Effects of injecting calcium chloride into in vitro -matured porcine oocytes. Biol Reprod 54, 316-322.

Markides CSA, Roy D, Liehr JG (1998) Concentration dependence of pro-oxidant and antioxidant properties of catecholestrogens. Arch Biochem Biophys: 360, 105-112.

Masui Y (1991) Roles of protein synthesis in the control of chromosome behavior during egg maturation and activation. Bull Assoc Anat (Nancy): 75, 81–83.

Mayes MA, Stogsdill PL, Prather RS (1995) Parthenogenic activation of pig oocytes by protein kinase inhibition. Biol Reprod: 53, 270-275.

Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S et al (2004) The Gs-Linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. Science: 306, 1947-1950.

Mehlmann LM (2005) Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. Reproduction: 130, 791-799. A

Mehlmann LM (2005) Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. Dev Biol: 288, 397-404. B

Mehlmann LM, Kalinowski RR, Ross LF et al (2006) Meiotic resumption in response to luteinizing hormone is independent of a Gi family G protein or calcium in the mouse oocyte. Dev Biol: 299, 345-355.

Meinecke B (2000) Endokrinologie. Physiologie der Haustiere. Stuttgart:Enke Verlag.

Meinecke B, Janaus U, Podhajsky E et al (2001) Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. Reprod Domest Anim: 36, 183-188.

Meo SC, Leal CL, Garcia JM (2004) Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. Anim Reprod Sci: 81, 35-46

Merlo B, Iacono E, Regazzini M et al (2008) Cat blastocysts produced *in vitro* from oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved electroejaculated semen. Theriogenology: 70, 126–130.

Metcalfe SS (1999) Assisted reproduction in the bitch. Melbourne Australia: Monash University. 160 pp. Thesis.

Murakami MK, Otoi T, Karja NWK et al (2004) Blastocysts derived from *in vitro* - fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. Cryobiology: 48, 341–348.

Ning G, Ouyang H, Wang S et al (2008) 3',5'Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding Protein Up-Regulated Cytochrome P450 Lanosterol 14{alpha}-Demethylase Expression Involved in Follicle-Stimulating HormoneInduced Mouse Oocyte Maturation. Mol Endocrinol: 22, 1682-1694.

Nussbaum DJ, Prather RS (1995) Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. Mol Reprod Dev: 41, 70–75.

Oh HJ, Fibrianto YH, Kim MK et al (2005) Effects of canine serum collected from dogs at different estrous cycle stages on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. Zygote: 13, 227-232.

Otoi T, Fujii M, Tanaka M et al (1999) Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. Reprod Fertil Dev: 11, 387-390.

Otoi T, Fujii M, Tanaka M et al (2000) Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. Theriogenology: 54, 535–542.

Park JY, Su YQ, Ariga M (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory folicle. Science: 303, 682-684.

Pavlok A, Kanka J, Motlik J et al (2000) Culture of bovine oocytes from small antral follicles in meiosisinhibiting medium with butyrolactone I: RNA synthesis, nucleolar morphology and meiotic competence. Anim Reprod Sci: 64, 1–11.

Prochazka R, Kalab P, Nagyova E (2003) Epidermal Growth Factor-Receptor Tyrosine Kinase Activity Regulates Expansion of Porcine Oocyte-Cumulus Cell Complexes İn vitro . Biol Reprod: 68, 797-803.

Renton JP, Boyd JS, Eckersall PD et al (1991) Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). J Reprod Fertil: 93, 221-231.

Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N (2006) In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. Theriogenology: 66, 1685–1693.

Ribeiro APC, Pires EA, Apparício M et al (2010) Maturação in vitro de oócitos caninos: aspectos fisiológicos e sua relação com a evolução da técnica. Rev Bras Reprod Anim: 34, 50-57.

Rodrigues BA, Rodrigues JL (2010) *İn vitro* maturation of canine oocytes: a unique conundrum. Anim Reprod: 7, 3-15.

Rota A, Cabianca G (2004) İn vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. Reprod Nutr Dev: 44, 105–109.

Saeki K, Nagao Y, Kishi M et al (1998) Timing of completion of the first meiotic division in bovine oocytes after maintenance of meiotic arrest with cycloheximide and their subsequent development. J Vet Med Sci: 60, 523–526.

Saint-Dizier M, Renard JP, Chastant-Maillard S (2001a) Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. Reproduction: 121, 97-105.

Saint-Dizier M, Salomon JF, Petit C et al (2001) *İn vitro* maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. J Reprod Fertil: 57, 147-150.

Sanfins A, Plancha CE, Overstrom EW et al (2004) Meiotic spindle morphogenesis in in vivo and in vitro matured mouse oocytes: insights into the relationship between nuclear and cytoplasmic quality. Hum Reprod: 19, 2889-2899.

Santos RR, Amorim C, Cecconi S et al (2010) Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. Anim Reprod Sci: 122, 151–163.

Sato K, Yoshida M, Miyoshi K (2005) Utility of ultrasound stimulation for activation of pig oocytes matured in vitro . Mol Reprod Dev: 72, 396–403.

Sen A, Caiazza F (2013). Oocyte Maturation: A story of arrest and release. Front Biosci: 5, 451-477.

Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO (2000) Fundamental cryobiology of mammalian ooctes and ovarian tissue. Theriogenology: 53, 59-72.

Smitz JE, Thompson JG, Gilchrist RB (2011) The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation. Semin Reprod Med: 29, 24-37.

Sirard MA, First NL (1998) İn vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. Biol Reprod: 39(2), 229-234.

Sirard MA (2001) Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. Theriogenology: 55, 1241–1254.

Song H-J, Kang E-J, Kim M-J et al (2010) Influence of parthenogenetic activation on nuclear maturation of canine oocytes. J Vet Med Sci: 72(7), 887-892.

Songsasen N, Yu I, Gomez M et al (2003b) Effects of meiosis-inhibiting agents and equine chorionic gonadotropin on nuclear maturation of canine oocytes. Mol Reprod Dev: 65, 435–445.

Songsasen N, Wildt DE (2005) Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocyte. Mol Reprod Dev: 72, 113–119.

Songsasen N, Wildt DE (2007) Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. Anim Reprod Sci: 98, 2-22.

Šutovskỳ P, Flèchon JE, Flèchon B et al (1993) Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. Biol Reprod: 49, 1277–1287.

Suzuki H, Ishijima T, Maruyama S et al (2008) Beneficial effect of desialylated erythropoietin administration on the frozen-thawed canine ovarian xenotransplantation. J Assist Reprod Genet: 25, 571–575.

Tesoriero JV (1981) Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. J Morphol: 168, 171–179.

Tesoriero JV (1982) A morphologic, cytochemical, and chromatographic analysis of lipid yolk formation in the oocytes of the dog. Gamete Res: 6, 267–279.

Tosti E (2006) Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. Reprod Biol Endocrinol: 4, 26.

Tripathi A, Kumar KV, Chaube SK (2010) Meiotic cell ceycle arrest in mammalian oocytes. J Cell Physiol: 223, 592-600.

Tsafriri A, Dekel N (1994) Molecular mechanisms in ovulation. Academic Press San Diego: 207-258.

Tsutsui T (1989) Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. J Reprod Fertil: 39, 269–275.

Turathum B, Saikhun K, Sangsuwan P et al (2010) Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes Reproductive Biology and Endocrinology: 8, 70.

Van Blerkom J, Davis PW, Merriam J (1994) The developmental ability of human oocytes penetrated at the germinal vesicle stage after insemination in vitro . Human Reproduction: 9, 697–708.

Van der Stricht O (1923) Etude comparè des ovules des mamifères aux diffèrentes pe´riodes de l'ovogene`se. Arch Biol: 33, 229–300.

Van Soom A, Vandaele L, Goossens K (2007) Gamete origin in relation to early embryo development. Theriogenology: 68, 131-137.

von Baer KE (1927) De ovi mammalium et hominis genesi. 1827

Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y et al (1989) Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain upon fertilization of Xenopus eggs. Nature: 342, 505–511.

Wildt DE, Levinson CJ, Seager WJ (1977) Laparoscopic exposure and sequential observation of the ovary of the cycling bitch. Anat Rec: 189, 443–450.

Wildt DE, Chakraborty PK, Panko WB et al (1978) Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch Biol. Reprod: 18, 561-570.

Wildt DE, Panko WB, Chakraborty P et al (1979) Relationship of serum estrone, estradiol-17β and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. Biol Reprod: 20, 648–658.

Willingham-Rocky LA, Hinrichs K, Westhusin ME et al (2003) Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes in vitro . Reproduction: 126, 501–508.

Wu GM, Sun QY, Mao J et al (2002) High developmental competence of pig oocytes after meiotic inhibition with a specific M-phase promoting factor kinase inhibitor, butyrolactone. Biol Reprod: 67, 170-177.

Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y et al (1993) İn vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. J Reprod Fertil: 47, 227–229.

Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H et al (1992) Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro . Biol Reprod: 46, 853-858.

Yanagimachi R, Bhattacharyya A (1988) Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. J Exp Zool: 248, 354–360.

Yang X, Presicce GA, Moraghan L et al (1994) Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. Theriogenology: 41, 395–403.

Yang WH, Hammes SR (2005) Xenopus laevis CYP17 regulates androgen biosynthesis independent of the cofactor cytochrome b5. J Biol Chem: 280, 10196-10201.

Zhang M, Ouyang H, Xia G (2009) The signal pathway of gonadotropins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. Mol Hum Reprod: 15, 399-409.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

cAMP	Siklik adenozin monofosfat
MI	Metafaz I
MII	Metafaz II
GV	Germinal Vezikül
GVBD	Germinal Vezikül Break Down
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandin F2 alfa
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
RNA	Ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
GPR3	G-protein coupled receptor 3
GPR12	G-protein coupled receptor 12
MPF	maturasyon promoting faktör
CDK1	Cyclin Dependent Kinase
cdc2	CDK1gen ürünü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
(PKC/PKAII)	Protein kinaz C/protein kinaz AII
PI3K/AKT(PKB)	fosfoinositid-3-kinaz–protein kinaz B/Akt yolağı
(PDE-3A)	fosfodiesteraz-3A
StAR	Steroidogenic acut regulatory protein
CYP17	17-α hidroksilaz C17/20 liyaz
CSF	Sitostatik faktör
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
eCG	Kısrak Koryonik Gonadotropin

(IGF)	Insülin benzeri büyüme faktörünün
Ca-EDTA	Kalsiyum etilendiamintetraasetik asit
OHE	Ovaryohisterektomi
TL-HEPES	Tyrode's Laktat HEPES
HEPES	hidroksietil piperazinetansulfonik asit
IU	Uluslararası ünite
VS1	Vitrifikasyon solüsyonu 1
VS2	Vitrifikasyon solüsyonu 2
VS3	Vitrifikasyon solüsyonu 3
CO_2	Karbondioksit
TO	Taze Oosit
VO	Vitrfiye Oosit
mKRB	Modifiye Krebs Ringer Bikarbonat
SOF	Sentetik Oviduktal Sıvı

8. TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA'ya çok teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım süresince teknik desteği başta olmak üzere, yardımlarından dolayı hocam sayın Prof.Dr.Zekariya NUR'a; çalışmamın tüm aşamalarına aktif katkı sağlayan çalışma arkadaşım, kardeşim, hocam sayın Doç.Dr.Burcu ÜSTÜNER'e; tez izleme komitemde bulunarak bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım hocalarım sayın Prof.Dr.M.Kemal SOYLU'ya ve Prof.Dr.Yavuz NAK'a; acil çözüm planlarıyla çalışmama verdikleri destekten dolayı hocam sayın Doç.Dr.Selim ALÇAY'a, doktora kardeşim sevgili Ahmet AKTAR'a ve doktora öğrencim, asitanım, evladım sevgili Özge BARİ'ye; tezin istatistiksel analiz ve düzeltmeleri dahil olmak üzere manevi desteğini her zaman gördüğüm ve yetiştirmekten onur ve gurur duyduğum doktora öğrencim, evladım Dr.Ahmet YAVUZ'a ve Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı tüm öğretim üye ve elemanlarına teşekkür ederim. Tezimin materyalini sağlamamda desteğini esirgemeyen, Yıldırım Belediyesi Sahipsiz Hayvan Tedavi ve Rehabilitasyon Merkezi Müdürü sayın Mehmet ALTUNTAŞ ve adı geçen merkezde fedakarca hizmet veren meslektaşlarım, kardeşlerim Veteriner Hekim Aslı KARKI ve Veteriner Hekim Bülent ÇİFTÇİ'ye ve merkezde çalışan herkese destek, nezaket ve güleryüzleri için teşekkür ederim.

Eylül 2000 yılında Dölerme ve Suni Tohumlama'da doktora eğitimime başlamama çok sevinen, tezimi bitirdiğimi çok uzaklardan bildiğine emin olduğum ve kulağıma yer etmiş sözüyle 'Ebedi güç sadece bilgiyle olur' diyerek, hayatıma hep ışık olmaya devam eden rahmetli babam Yıldırım ÖZALP'e ve hep yanımda, her zaman yanımda, hiç yanımdan ayrılmayan biricik annem, varlığım Seyide ÖZALP'e teşekkürü borç bilirim.

9. ÖZGEÇMİŞ

Pasinler/Erzurum'da 1976 yılında doğmuştur. İlk, orta ve lise öğrenimini Bursa'da tamamlamıştır. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2000 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başlamıştır. Ekim 2001 döneminde, Alman Bilimsel Araştırmalar Kurumu (Deutsche Forschungsgemeinschaft-DFG) bursuyla, Graduiertenkolleg Molekulare Veterinärmedizin'in ilk Türk doktora öğrencisi olarak doktora çalışmasına başlamıştır. Prof.Dr.Dr.Bernd Hoffmann danışmanlığında 'Lokalization der 17α-Hydroxlase-C17,20 Lyase (P450c17), 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase-Δ4/5 Isomerase (3β-HSD) und Aromatase ($P450_{arom}$) in der plazenta beim Rind im Verlauf der Gravidität' adlı doktora çalışmasını, Justus-Liebig-Üniversitesi-Giessen Doğuma Yardım, Jinekoloji ve Androloji Kliniği ve Enstitüsü'nde 2005 yılında tamamlamıştır. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda 2006 yılında Dr.Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başlamıştır. Mayıs 2014 yılında çıkan öğrenci affından yararlanarak, Dölerme ve Suni Tohumlama'da yarım kalan doktora eğitimine geri dönmüştür. Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda 2008, 2012 ve 2018 yıllarında, sırasıyla Yardımcı Doçent, Doçent ve Profesör kadrosuna atanmıştır. Halen aynı anabilim dalında öğretim üyesi olarak çalışmaya devam etmektedir.