



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



**+4 °C ve +38 °C TAŞIMA VE DEPOLAMA SICAKLIKLARINDA
KÖPEK OOSİTLERİNİN IN VİTRO OLGUNLAŞMASINA BSA ve
FCS'NİN ETKİLERİ**

MEHMET ÇETİNKAYA

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2020





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



**+4 °C ve +38 °C TAŞIMA VE DEPOLAMA SICAKLIKLARINDA
KÖPEK OOSİTLERİNİN IN VİTRO OLGUNLAŞMASINA BSA ve
FCS'NİN ETKİLERİ**

MEHMET ÇETİNKAYA

(DOKTORA TEZİ)

**DANIŞMAN:
Prof.Dr. Hakan SAĞIRKAYA**

BURSA-2020

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum

“+4°C ve +38°C Taşıma ve Depolama Sıcaklıklarında Köpek Oositlerinin In Vitro Olgunlaşmasına BSA ve FCS'nin Etkileri ” 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.

10/07/2020


MEHMET ÇETİNKAYA

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

10/07/2020

Adı Soyadı: MEHMET ÇETİNKAYA
Anabilim Dalı: Dölerme ve Suni Tohumlama
Tez Konusu: +4°C ve +38°C Taşıma ve Depolama Sıcaklıklarında Köpek Oositlerinin In Vitro Olgunlaşmasına BSA ve FCS'nin Etkileri

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA

İmza:

İç Kapak	I
ETİK BAYANI	II
KABUL ONAYI	III
TEZ KONTROL VE BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Köpeklerde Reprodüksiyon.....	4
2.1.1. Reprodüktif Organlar ve Pubertaya Ulaşma Yaşı.....	4
2.1.1.1. Ovaryum.....	4
2.1.1.2. Ovidukt.....	4
2.1.1.3. Uterus.....	5
2.1.1.4. Vajina.....	5
2.1.1.5. Vestibulum.....	6
2.1.1.6. Vulva.....	6
2.1.2. Pubertas.....	6
2.2. Dişi Köpeklerin Üreme Özellikleri.....	7
2.3. Köpeklerde Östrus Siklusu ve Evreleri.....	7
2.3.1. Proöstrüs.....	7
2.3.2. Östrüs.....	8
2.3.3. Diöstrüs.....	9
2.3.4. Anöstrüs.....	10
2.4. Köpeklerde Oogenesis.....	10
2.4.1. Ovaryan Folikül Oluşumu.....	10
2.5. Köpeklerde Oosit Maturasyonu.....	11
2.6. Köpeklerde Oosit Elde Edilmesi Ve İn Vitro Maturasyon.....	14
2.6.1. Köpeklerden Oosit Elde Edilmesi.....	14
2.6.2. İn Vitro Maturasyon.....	14
2.7. İn Vitro Maturasyona Etki Eden Faktörler.....	16

2.7.1. Köpeğin Yaşı ve Irkı.....	16
2.7.2. Üreme Siklusunun Safhası ve Folikül Büyüklüğü.....	16
2.7.3. Kullanılan Kültür Medyumu.....	19
2.7.4. Kültür Süresi.....	19
2.7.5. Protein ve Hormon Seviyesi.....	19
2.7.6. Kumulus/Granuloza Hücreleri.....	21
2.8 Ovaryumların Taşınma Sıcaklığının Etkileri.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Dişi Köpek Seçimi.....	23
3.2. Operasyon Yöntemi	23
3.3. Ovaryumların Labaratuvara Getirilmesi	24
3.4. Oositlerin Elde Edilmesi.....	25
3.5. In Vitro Maturasyon.....	25
3.6 Maturasyon Sonrası Oositlerin Boyanması ve Değerlendirilmesi.....	26
3.7. Sonuçların İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi.....	26
3.8. Çalışmada Kullanılan Medyum Solüsyonlar.....	26
3.8.1. Taşımada kullanılan Phosphate Buffered Saline (PBS) solüsyonu.....	26
3.8.2. Maturasyon medyumu.....	27
3.8.3. Hoechst Boyasının Hazırlanması ve Kullanımı.....	27
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA.....	34
6. KAYNAKLAR.....	41
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	55
8. TEŞEKKÜR.....	57
9. ÖZGEÇMİŞ.....	58

ÖZET

Bu çalışma iki temel bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde ovariohisterektomi yöntemiyle elde edilen köpek ovaryumlarının +4°C ve +38°C taşıma sıcaklığında transportunun maturasyona üzerine etkilerinin neler olduğu hedeflenmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde ise köpek oositlerinin in vitro olgunlaştırılması için medyumuna katılan %0,3 BSA ve % 5 FCS protein kaynaklarının etkilerinin karşılaştırılması amacıyla planlanmıştır.

Ovario-histerektomi yapılmış köpeklerden alınan ovaryum çiftlerinden biri +4°C'da diğeri +38°C'da antibiyotik katkılı (Gentamisin Sülfat, 50 mg/ml) PBS solüsyonunu içeren iki farklı kab içerisinde 2 saat süresinde laboratuvar ortamına getirilmiştir. Ovaryumlar çevresindeki fazla yağ ve dokudan arındırıldıktan sonra yıkayıp (+38 °C) PBS içine konuldu. Slicing yöntemiyle elde edilen oositler yıkama petrilere aktarıldı. In vitro olgunlaştırma için ayrılacak oositlerin seçiminde sağlam bir zona pellusida, en az 3-4 sıra kumulus hücresi, homojen ve zona içini dolduran koyu renkli vitellüs varlığı kriterleri göz önünde bulunarak oosit seçimleri yapıldı.

Her iki ısı derecesi içinde üçerli çalışma grupları en az iki saat öncesinden hazırlanmış, üzeri mineral yağ (Sigma) ile örtülmüş, antibiyotik katılmış (Gentamisin Sülfat, 50 mg/ml) +38 °C ve %5 CO₂ 'liinkübatör ortamında bekletilmiş bulunan altı farklı olgunlaşma medyumuna (Hepes Modifikasyonlu TCM 199, Sigma M-2520) aktarılmıştır.

+4 °C Taşıma Sıcaklığı İçin;

1. Grup (Kontrol):TCM 199+2,2 gr/lit NaHCO₃+0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmalite:288 mOsmol),
2. Grup (BSA):TCM199+% 0,3 BSA (Fraction V, Sigma A8806)+ 2,2 gr/lit NaHCO₃+0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmalite:288 mOsmol),
3. Grup(FCS):TCM199+%5 FCS (Fetal Calf Serum Biochrom S 0115)+ 2,2 gr/lit NaHCO₃+0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmalite:288 mOsmol)

+38°C Taşıma Sıcaklığı İçin;

4. Grup (Kontrol):TCM 199+2,2 gr/lt NaHCO₃+0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmalite:288 mOsmol),

5. Grup (BSA):TCM199+% 0,3 BSA (Fraction V ,Sigma A8806)+ 2,2 gr/lt NaHCO₃+0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmalite:288 mOsmol),

6. Grup (FCS):TCM199+%5 FCS (Fetal Calf Serum Biochrom S 0115)+ 2,2 gr/lt NaHCO₃+0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmalite:288 mOsmol)

Daha sonra oositler Germinal Vezikül (GV) aşamasından MII aşamasına gelebilmesi için % 5 CO₂ ve % 100'e yakın nemin sağlandığı +38,5 °C'lık inkübatör ortamında 72 saat olgunlaştırıldı. Olgunlaşma süresinin sonunda oositlerin kumulüs hücreleri vorteks kullanılarak mekanik olarak uzaklaştırıldı. Ardından % 0,7 lik KCl solüsyonunda 4-5 dakika bekletildikten sonra lam-lamel arasında sıkıştırılarak sabitlendi. Hoechst 33258 solüsyonu ile boyandı. Oositlerin değerlendirilmesinde Ki Kare testi kullanıldı. P<0,05 düzeyinin istatistiksel fark bakımından önemli olduğu kabul edildi. Gruplar arasında bir tek (M II) aşamasını tamamlamış olanların istatistiksel karşılaştırılmasında; +4 °C'da ki BSA grubu diğer kontrol gruplarından +4 °C ve +38 °C daki FCS gruplarından daha üstün olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

Sonuç olarak, yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda, köpek oositlerinin in vitro olgunlaşma çalışmalarında medyum proteininin katılmasının gerekli olduğu; olgunlaşmayı destekleyici olarak protein kaynağı olarak % 0,3 BSA'nın, % 5 FCS' a göre ve +4°C 'deki taşıma sıcaklığının + 38°C 'da kinden daha etkili olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Dişi köpek, Oosit, In vitro Olgunlaşma, BSA, FCS, Taşıma sıcaklıkları

SUMMARY

This study consists of two basic parts. In the first chapter, it is aimed to determine the effects of transport of ovaries obtained by ovariectomy method on maturation at transport temperature of +4°C and +38°C. In the second part of the study, it was planned to compare the effects of 0.3% BSA and 5% FCS protein sources, which are added to the medium for in vitro maturation of dog oocytes.

One of the ovarian pairs taken from ovario-hysterectomized dogs was brought to the laboratory environment in two different containers containing antibiotics (Gentamicin Sulfate, 50 mg / ml) PBS solution at +4 °C and the other at +38°C. After removing the excess oil and tissue around the ovaries, they were washed (+38°C) and placed in PBS. Oocytes obtained by slicing method were transferred to washing petri dishes. In the selection of oocytes to be separated for in vitro maturation, oocyte selections were made considering a solid shingles pellucida, at least 3-4 rows of sandulus cells, homogeneous and dark colored vitellus presence filling the shingles.

Within two temperatures, three working groups were prepared at least two hours before, covered with mineral oil (Sigma), added antibiotics (Gentamycin Sulfate, 50 mg / ml) +38°C and 5% CO₂ in a liincurator environment. transferred to ripening medium (TCM 199 with Hepes Modification, Sigma M-2520).

For +4 °C Transport Temperature;

1st Group (Control): TCM 199 + 2,2 gr / lt NaHCO₃ + 0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7.3; Osmality: 288 mOsmol),

2nd Group (BSA): TCM199 + 0.3% BSA (Fraction V, Sigma A8806) + 2.2 gr / lt NaHCO₃ + 0.23 mM Na Pyruvate (pH: 7.3; Osmality: 288 mOsmol),

Group 3 (FCS): TCM199 + 5% FCS (Fetal Calf Serum Biochrom S 0115) + 2.2 gr / lt NaHCO₃ + 0.23 mM Na Pyruvate (pH: 7.3; Osmality: 288 mOsmol)

For +38°C Transport Temperature;

Group 4 (Control): TCM 199 + 2,2 gr / lt NaHCO₃ + 0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7.3; Osmality: 288 mOsmol),

5. Group (BSA): TCM199 + 0.3% BSA (Fraction V, Sigma A8806) + 2.2 gr / lt NaHCO₃ + 0.23 mM Na Pyruvate (pH: 7.3; Osmality: 288 mOsmol),

Group 6 (FCS): TCM199 + 5% FCS (Fetal Calf Serum Biochrom S 0115) + 2.2 g / lt NaHCO₃ + 0.23 mM Na Pyruvate (pH: 7.3; Osmality: 288 mOsmol)

Then, oocytes were matured for 72 hours in a +38,5°C incubator environment where 5% CO₂ and 100% humidity was provided in order to reach the MII stage from the Germinal Vesicle (GV) stage. At the end of the maturation period, the sand cells of the oocytes were mechanically removed using vortex. Then it was immersed in 0.7% KCl solution for 4-5 minutes and then it was fixed by squeezing between the coverslip. It was stained with Hoechst 33258 solution. Chi Square test was used to evaluate oocytes. P <0.05 level was accepted to be important in terms of statistical difference.

In statistical comparison of those who completed a single (M II) stage between the groups; The BSA group at +4°C was determined to be superior to the other control groups than the FCS groups at +4°C and +38°C (p <0.05). In conclusion, in line with the results obtained in the study, it is necessary to add the medium protein in the in vitro maturation studies of dog oocytes; It can be said that 0.3% BSA as protein source as a supplement to maturation is more effective than + 38°C compared to 5% FCS and transportation temperature at +4 ° C.

Keywords: Female dog, Oocyte, In vitro Maturation, BSA, FCS, Transport temperatures

1. GİRİŞ

Hayvan yetiştiriciliğinde yardımcı üreme tekniklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar, son yıllarda özellikle nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya bulunan cinslerin artışı sağlamak ve tümüyle yok olmalarının önüne geçmek için hücre, sperma ve embriyolarının dondurularak saklanması, üst düzeyde yüksek verim özelliklerine sahip damızlıklardan maksimum düzeyde yararlanmak amacıyla artış göstermektedir. Bu teknikler, in vitro embriyo üretimi, hücrelerin, spermanın, oositlerin ve embriyoların dondurulması, sperma ve embriyoda cinsiyet tayini, suni tohumlama uygulamaları, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu, seksüel siklusların senkronizasyonu, kök hücre, transgenik ve klonlama çalışmaları olarak sıralanabilir (Sağırkaya ve Bağış, 2003). Reprodüktif biyoteknoloji alanında çalışma yapılabilmesi için çok sayıda embriyo ve oosite ihtiyaç bulunmaktadır (Smidt ve Niemann, 1999; Thibier ve Guerin, 2000). Embriyo transferi için ihtiyaç duyulan embriyolar in vitro ve in vivo teknikler kullanılarak üretilebilmektedir. Aynı yöntemler nesli tükenmekte olan hayvanların korunması amacıyla da kullanılmaktadır (Wilmot ve ark., 2002).

Biyoteknoloji alanında geçen yüzyılın ortalarında başlayan çalışmalar son yıllarda büyük ölçüde hız kazanmıştır. Bu gelişmeler doğrultusunda köpeklerde yardımcı üreme tekniklerinin nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya bulunan köpekgiller için de iyi model oluşturabileceği tespit edilmiş ve evcil köpekler üzerinde konuyla ilgili daha da yoğunlaşmıştır (Fuji ve ark., 2000; Otoi ve ark., 2000; Polge ve ark., 1949).

Köpeklerde ilk başarılı embriyo transferi 1980 yılında, in vivo ortamda fertilize edilen embriyoların annelere transferiyle gerçekleşmiştir (Tsutsui ve ark., 1989). Ardından ilk olarak 1988 yılında in vivo olarak olgunlaştırılan oositlerin, in vitro fertilizasyonu ile geliştirilen köpeklerin embriyolarının ovudakta transferi yoluyla köpek yavruları elde edilmiştir (Goodrowe ve ark., 2000). Son yıllarda hastalıktan, vahşi doğa şartlarından dolayı ölen veya kısırlaştırılan köpek ovaryumlarından embriyo elde etmek, in vitro fertilizasyon teknikleri ile mümkün hale gelmiştir (Goodrowe ve ark., 2000). Diğer memelilerden farklı olarak, dişi köpeklerde oositler germinal vezikül (GV) döneminde ovule olmaktadır. Ovule olan oositlerin fertilize olabilmeleri için ovidukta geçen 72 saatlik bir olgunlaşma sürecine ihtiyaç duyarlar

(Hafez ve ark., 1987; Saint-Dizier ve ark.,2001a; Wassarman ve Albertini, 1994). İn vitro maturasyon sürecinde memeli oositlerinin proteine olan gereksinimleri bilinmektedir (Hafez ve ark., 1987; Hogan ve ark., 1994; Wassarman ve Albertini, 1994).

İN vitro maturasyon çalışmalarında memeli oositlerinin medyumlarına çeşitli oranlarda ve tiplerde protein kaynaklarının katıldığı ve değişik sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Birler ve ark., 1999; Goodrowe ve ark., 2000; Hewitt ve ark., 1998; Nickson ve ark., 1993; Pabuççuoğlu, 2001). Köpek oositlerinin in vitro maturasyonunda olgunlaştırma medyumlarına protein katılmasının önemi üzerinde araştırmacılar fikir birliğine varmışlardır. Fakat, halen hangi kaynaktan ne miktarda kullanılırsa en iyi sonucun alınabileceği konusunda çalışmalar yapılmaya devam etmektedir (Evecen ve ark., 2002; Hewitt ve ark., 1998; Hewitt ve ark., 1999; Otoi ve ark., 1999; Rodrigues ve Rodrigues, 2003; Cui ve ark., 2006).

İN vitro embriyo üretiminde en önemli sorunlardan biri de uzun mesafelerden laboratuvara ovaryumların ulaştırılmasıdır. Etçil oositler in vitro ortamlardan kolayca etkilenebilmektedir (Rodrigues ve Rodrigues, 2003; Songsasen ve ark., 2002). Ovaryumların depolama, ulaştırma süresi ve özellikle taşıma sırasında kullanılan ortam sıcaklığı oositlerin olgunlaşmasını etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır (Nakao ve Nakatsuji, 1992). Ovaryumların +35-38°C'de uzun süre taşınması sırasında hücrel otoliz oluşabilmektedir (Holt ve Picard, 1999). Germinal vezikül (GV) safhasındaki olgun olmayan ve olgun oositler soğuğa maruz kaldığında oositin nükleer yapısında iç iplikleri geri dönüşümsüz olarak bozulmaya uğrar (Smitz ve ark., 2004). Düşük sıcaklıklarda hücrelerin metabolik aktiviteleri, insan ya da hayvan olsun, yavaşlar veya tamamen durur. İn vitro olgunlaşma üzerine etobur ovaryumlarında taşıma ve depolama sıcaklığının etkisi net olarak bilinmemektedir. Fakat +4°C'da taşınan dişi köpek ovaryumlarından elde edilen oositlerin +35-38 °C'de taşınan oositlerden daha yüksek maturasyon oranına sahip olduğu gösterilmiştir ($p<0.001$) (Taş ve ark., 2006).

Köpek oositlerinin in vitro olgunlaştırılması çalışmalardan istenilen düzeyde başarı elde edilememesi ve bu konuyla ilgili standart bir prosedürün halen geliştirilememiş olması sebebiyle bu alandaki çalışmaların sürdürülmesi

gerekmektedir (Bolamba ve ark., 1998; Goodrowe ve ark., 2000; Hewitt ve England, 1998; Otoi ve ark., 1999). Sunulan alışma iki temel bölümden oluşmaktadı. İlk bölümde ovariohisterektomi yöntemiyle elde edilen köpek ovaryumlarının +4°C ve +38°C taşıma sıcaklığında transportunun oosit maturasyonu üzerine etkilerinin neler olduğunun araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise köpek oositlerinin in vitro olgunlaştırılması için medyumuna katılan protein kaynaklarının (Bovine Serum Albumin (BSA) ve Fetal Calf Serum (FCS)) etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Köpeklerde Reprodüksiyon

2.1.1. Reprodüktif Organlar ve Pubertaya Ulaşma Yaşı

Köpeklerde reprodüktif organlar kranialden kaudale doğru; ovaryumlar, ovidukt, kornu uteriler, korpus uteri, cervix uteri, vajina, vestibulum ve vulva olarak sıralanmaktadır.

2.1.1.1. Ovaryum

Dişi gonadları oluşturan ovaryumlar, abdominal boşlukta böbreklerin kaudalinde yer alırlar ve oval görümlü bir yapıya sahiptirler. Multiparu köpeklerde sol ve sağ ovaryumlar ventrale ve kaudala doğru yöneldiler de sol ovaryum her zaman böbrek hizasında yer alır (Johnston, 2001; Schummer ve Nichel, 1979). Köpeklerde ovaryumlar 0,3 gram ağırlığında 0,7-1,5 cm genişliğinde, 1,5-2 cm uzunluğunda ve yaklaşık 0,5 cm kalınlığındadır. Bununla birlikte özelliğine ve büyüklüğüne göre ovaryum ölçüleri değişebilmektedir (Chistensen, 1965; Schummer ve Nichel, 1979). 6-9 aylık yaşından önceki köpeklerde ve ilk östüsten önce, ovaryum yüzeyleri pürüzsüzdür (Chistensen, 1965). Fakat siklik aktivitesi başlamış olan köpeklerde ovaryumun yüzeyi korpus luteum ve birden fazla folikül sebebiyle çıkıntılı bir görünüme sahiptir (Chistensen, 1965; Schummer ve Nichel, 1979).

2.1.1.2. Ovidukt

Her iki ovaryum ile uterusun bağlantısını sağlayan kanallardır, köpeklerde ovidukt 6-10 cm uzunluğunda, 1-3 mm çapındadır. Başlangıç noktası, bursa ovarikanın girişinin ventralinde infundibulumun fimbriyası ile birlikte yer alır. Infundibulumda abdominal ostiyum adı verilen küçük bir açıklık bulunur. Bu açıklık ovulasyondan sonra oositin uterusu doğru yönlendirilmesini sağlar. Her bir ovidukt mezosalpinksin peritoneal tabakaları arasında konumlanarak, peritoneal kaviteyi uterusu bağlar. Oosit oviduktan aşağıya doğru peristaltik hareketlerle iner. Fertilizasyon normalde infundibulumda gerçekleşir (Christensen, 1965; Johnston 2001).

2.1.1.3. Uterus

Embriyonun yerleştiği beslenip geliştiği organdır. Uterus serviks uteri, korpus uteri ve iki kornu uteriden oluşmaktadır. Uterusun büyüklüğü yaşa, hayvanın büyüklüğüne, ırka, doğum yapıp yapmadığına ve siklusun dönemine göre değişiklik göstermektedir (Christensen, 1965; Johnston, 2001). Kornu uteriler çapları eşit ve oldukça uzun dorsoventral olarak karın duvarına asılan ve korpus uteride birleşen muskulo membranöz yapıdaki tüplerdir, genellikle sağ kornu uteri soldan biraz daha uzundur. Doğum yapmamış orta büyüklükteki bir köpekte yaklaşık 10-14 cm uzunluğunda 0,5-1 cm çapındadır (Christensen, 1965; Schummer ve Nichel, 1979). Korpus uteri 1,4-3 cm uzunluğunda ve 0,8-1 cm çapındadır (Christensen, 1965). Genellikle, hem pelvik hem de abdominal boşlukta yer alır. Korpus uteri kornu uterilerin birleştiği noktadan servikse doğru uzanır. Kornu uteriler korpusun 1 cm kadar içine girerek internal muskulomembran yapıdaki bir oluşumla ayrılır (Christensen, 1965). Korpus uteri ve vajina arasındaki sert doku serviks uteri olarak adlandırılır. Serviks bir kanal ve beyaz kas liflerinden meydana gelir (Christensen, 1965). Ortalama uzunluğu 1-2 cm kadardır ve vajinal bölüme yarı silindirik yapıda ve vajinanın dorseline doğru 0,5-1 cm'lik çıkıntı verir, gebelik süresince mukoz bir tıpayla kapanır (Johnston, 2001; Schummer ve Nichel, 1979). Bu nedenle internal ve eksternal orifisyumlar birbirine oldukça yakındır (Schummer ve Nichel, 1979). Proöstrus evresinde hipertrofi nedeniyle kıvrımlar artar, östrus evresinde en büyük halini alır ve diöstrus ile küçülmeye başlar (Johnston, 2001).

2.1.1.4. Vajina

Vajina, serviks ile vestibulum arasında genişleme yeteneğine sahip muskulomembranöz yapıdaki organdır (Christensen, 1965; Johnston, 2001). Köpeklerde oldukça uzun bir yapıya sahiptir (Schummer ve Nichel, 1979). Ağırlığı 11-12 kg olan bir köpekte vajinanın ortalama uzunluğu 10-14 cm kadardır. Gebelik ve doğum sürecinde vajinanın çapı ve uzunluğu artar. Vajinal mukozada bulunan longitudinal kıvrımlar vajinanın çapının artmasına olanak sağlar (Christensen, 1965). Vajinal duvarlar içte mukozal kat, ortada beyaz kaslar ve en dışta bağ doku ve kraniyalde peritoneal katla sarıdır. Tunika mukazada bez bulunmaz ve çok katlı

yassı epitel hücrelerle kaplıdır. Östrüs siklusu boyunca epitel katta önemli değişiklikler meydana gelir (Christensen, 1965; Schummer ve Nichel, 1979).

2.1.1.5. Vestibulum

Köpeklerde vajina ve vulva arasında kalan kanalın kaudal kısmına vestibulum adı verilir (Johnston, 2001). Vestibuler duvara çok sayıda bez açılır, bu bezlerden üretilen mukoz salgı çiftleşme ve doğum sırasında bölgenin kayganlığını sağlar (Dyce ve ark., 1987). Dişi köpekler bu değişiklikler olmadan çiftleşmeye izin vermezler (Johnston, 2001).

2.1.1.6. Vulva

Vulva, labia ve bunların kommissuraları ile rima vulvadan meydana gelmiştir (Johnston, 2001). Bireye göre değişen renk pigmenti ve az miktarda kılla kaplıdır, labiyası yuvarlak yapıdadır (Christensen, 1965; Schummer ve Nichel, 1979). Gebe olmayan orta büyüklükteki bir köpekte 3 cm kadar vulva açıklığı mevcuttur. Labiya tubuler ve yağ bezlerine sahiptir (Christensen, 1965).

2.1.2. Pubertas

İlk proöstrus belirtilerinin görülmesi dişi köpeklerde pubertas olarak kabul edilir. Dişi köpekler ortalama olarak 6-14 aylık yaşlarda pubertaya ulaşırlar. Irk özellikleri, stres, bakım şartları, beslenme ve hastalıklar gibi faktörler pubertasa ulaşma yaşını etkiler. Köpeklerde pubertaya ulaşma yaşı üzerinde etkili olan en önemli faktör cüsse büyüklüğü farkıdır.

Küçük ırklarda kızgınlık 6-10 aylıkken görülmesine karşın, büyük cüsseli ırklarda 18-20 aylara kadar uzadığı gözlemlenmiştir. Çiftleşme için en uygun yaş aralığı ırka göre değişse de, 2-6 yaş arasındadır (Correa, 2008; Concannon, 2011; Davidson, 2006; Edens ve Health, 2003; England, 1998; Johnston ve ark., 2001; Noakes ve ark., 2008; Kustritz, 2012; Linde-Forsberg, 2001; Pineda, 2003).

2.2. Dişi Köpeklerin Üreme Özellikleri

Köpekler monoöstrik hayvanlardır. Tüm monoöstrik hayvanlarda olduğu gibi östrus siklusunun içerisinde yer alan uzun bir anöstrus evresine sahiptirler. İki östrus arasındaki süre ırklar arasında değişiklik gösterirken aynı ırkın içinde bile farklılıklar gösterebilir. İki östrus arasındaki sürenin 11 aydan uzun ve 4 aydan kısa olması infertilite nedenidir. Siklus aralığının ırkın büyüklüğü ile bir ilişkisi yoktur (Aspinall ve O'Reilly, 2005; Aydın ve ark., 2011; Davidson, 2006; Davidson ve Baker, 2009; Fendman ve Nelson, 2004; Health, 2008; Johnston ve ark., 2001; Kustritz, 2012; Senger, 2005). Köpek ovaryumları diğer evcil hayvanlardan farklı olarak doğum sırasında primordiyal folikülleri içermez, primordiyal foliküller doğum sonrası 17-22. gün civarında görülmeye başlar. Köpeklerde her seferinde çok sayıda folikül ovule olur ve yaş ilerledikçe bu sayı düşer (Haşegan ve ark., 2012; Pineda, 2003). Ovaryumların etkinliği 6 yaşından itibaren azalmaya başlar ve çoğu köpekte 10 yaşında tamamen biter (Pineda, 2003).

2.3. Köpeklerde Östrus Siklusu ve Evreleri

Köpeklerin seksüel siklusları dört evrede incelenir.

2.3.1. Proöstrus

Proöstrus köpeklerde seksüel aktivitenin başladığı evredir. Foliküler etkinlik anöstrusun sonlarında yavaş yavaş oluşur. Kanlı vajinal akıntı, vulvada şişme ve ödemle birlikte proöstrus başlar. Endometriyumdaki kan damarlarından uterus lümenine kanın sızması sonucu şekillenir (Correa, 2008). Proöstrusun ilk günü kanlı vajinal akıntının başladığı ilk gün olarak kabul edilir (Jeffcoate, 2004). Proöstrus boyunca sıvı birikimine bağlı olarak şekillenen ödem nedeniyle vulva genişlemiştir. Oluşan ödem çiftleşmeye engel olur. Proöstrustan östrusa girildiği zaman vulva yumuşar ve bu engel ortadan kalkar (Feldman ve Nelson, 2004). Proöstrus evresinde anal kese salgıları ve idrar yoğun bir şekilde feromon içerir. Bu durum erkek köpekleri cezbeder fakat dişi saldırganlık gösterir ve çiftleşmeyi kabul etmez. Proöstrusun ilerleyen dönemlerinde bu saldırganlık azalır. Proöstrusun ilk devresinden dişi köpeğin çiftleşmeyi kabul ettiği döneme kadar geçen süre ortalama 9 gündür (Aspinall ve O'Reilly, 2005; Concannon, 2011; Correa, 2008; Davidson, 2006; Edens ve Health,

2003; England, 1998; Feldman ve Nelson, 2004; Gotwals, 2000; Health, 2008; Haşegan ve ark., 2012; Jeffcoate, 2004; Kalkan ve Horoz, 2007; Linde-Forsberg, 2001; Noakes ve ark., 2008; Pineda, 2003).

Köpeklerdeki siklik değişiklikler hipotalamus, hipofiz ve ovaryumlar tarafından kontrol edilir. Hipotalamustan salgılanan GnRH tarafından, hipofiz gonadotropinleri olan FSH ve LH uyarılır. LH ve FSH ovaryum fonksiyonlarını düzenlerken, ovaryum steroidleri olan progesteron ve östrojen de üreme kanalındaki değişiklikleri, meme bezlerini ve seksüel davranışları kontrol eder (Concannon, 2011; Correa, 2008; England, 1998; Jeffcoate, 2004; Kalkan ve Horoz, 2007). Salınan FSH folliküllerin gelişimini uyarır. Ortalama olarak her bir ovaryumda 3 mm büyüklüğünde 2-8 adet folikül oluşur. Östrojen bu foliküllerden salgılanır, östrojenin artmasıyla dış seksüel belirtiler şekillenir. Proöstrus boyunca östrojen miktarında bir artış meydana gelir. Bu artış östrusun başlamasına kadar devam eder ve sonra hızla düşer. Östrojen seviyesinin artması, inhibin aracılığıyla FSH'yı baskımlarken, LH salgısını başlatır. Son yıllarda LH salgısı pikinin şekillendiği gün ile fizyolojik olarak proöstrusun sona erdiği kabul edilmektedir (Concannon, 2011; Davidson, 2006; Health, 2008; Kustritz, 2012).

2.3.2. Östrus

Dişi köpeğin çiftleşmeyi kabul etmesiyle östrus evresi başlar ve ortalama 9 gün sürer. Bu evre dişi köpeğin çiftleşmeyi kabul etmemesi ile son bulur. Vajinal mukozada krenülasyonların gözlenmesi östrüs evresinin başladığını gösteren önemli bir bulgudur (Johnston ve ark., 2001). LH pikiyle oluşan östrojen progesteron oranındaki ani değişimlere bağlı olarak bu farklılaşma gözlenir. Vajinadaki bu değişimler ovulasyon ve oositlerin olgunlaşmasıyla aynı zamana denk gelir (Davidson ve Barker, 2009). Östrus progesteron seviyesinin 2 ng/ml çıkmasıyla kendini gösterir ve bu artışı izleyen 2 gün içerisinde ovulasyon gerçekleşir. Östrus evresinde vulvanın ödemi artar, çiftleşme döneminde maksimum seviyeye ulaşır. Fakat vulva proöstrus evresine göre daha yumuşak yapıdadır (Johnston ve ark., 2001).

Östrus evresinin ileri dönemlerinde progesteronun yükselmesi ve östrojenin düşüşüne bağlı olarak vulva ve vajinada ödem azalır ve kanlı akıntı 3 güne kadar daha

devam edebilir (Aspinall ve O'Reilly, 2005; Concannon, 2011; Correa, 2008; Davidson, 2006; Davidson ve Barker, 2009; Edens ve Heath, 2003; Feldman ve Nelson, 2004; Johnston ve ark., 2001; Kustritz, 2012; Linde-Forsberg, 2001; Pineda, 2003). Diğer hayvanlardan farklı olarak köpeklerde östrus evresinde östrojen hızla düşerken, progesteron hızla artar ve buna bağlı olarak östürüs ile ilgili belirtiler progesteron etkisi altında görülür (Davidson, 2006; Davidson ve Barker, 2009). Progesteron seviyesi ovulasyon sonrası da artmaya devam eder ve korpus luteumun şekillenmesiyle diöstrusta zirveye ulaşır (Concannon, 2011; Correa, 2008; Davidson, 2006; Davidson ve Barker, 2009; England, 1998; Johnston ve ark., 2001; Kustritz, 2012; Pineda, 2003).

Östrusun başlangıcından sonra, 5 gün içerisinde ovulasyon gerçekleşir. Yani ovulasyon LH pikinden 2-3 gün sonra gerçekleşir. Bütün oositler LH artışından sonra ortalama 24-50 saat içerisinde ovule olur (Davidson, 2006; Davidson ve Barker, 2009; Haşagan ve ark., 2012; Jeffcoate, 2004; Pineda, 2003). Köpeklerde ovulasyon sonrası oositler fertilize olma yeteneğinde değildir, fertilize olma yeteneğini kazanabilmeleri için ovidukta 2-3 gün bekleyerek mayoz bölünme süreçlerini tamamlamaları gerekir (Haşagan ve ark., 2012; Hutchison, 2001; Jeffcoate, 2004; Johnston ve ark., 2001; Pineda, 2003). Ovule olmayan foliküller atreziye olur (Correa, 2008; Davidson ve Barker, 2009; England, 1998; Gotwals, 2000).

2.3.3. Diöstrus

Diöstrus evresinde dişi köpek erkek köpek için hala çekicidir. Ancak, diöstrus dişi köpeğin çiftleşmeyi kabul etmediği dönemle başlar. Köpeklerde metöstrus ve diöstrus farklı şekillerde yorumlanır. Bazı araştırmacılar ovulasyonun östrus içinde yer alması, korpus luteumun östrus evresi içerisinde şekillenmeye başlaması sebebiyle metöstrus, östrus sonrası anöstrusa kadar geçen dönemi de diöstrus olarak kabul ederler. Bazı araştırmacılar da korpus luteumun şekillenip progesteron salgılandığı döneme kadar metöstrus, anöstrusa kadar geçen evreyide diöstrus olarak kabul ederler. Ovulasyondan yaklaşık 6 gün sonra kornifiye vajinal epitel hücreleri eski haline döner. Bu durum diöstrus evresinin bir belgesi niteliğindedir (Concannon, 2011).

Östrus evresinin sona ermesinden, anöstrüse kadar geçen süre gebelik yoksa 55-90 gündür, fakat gebelik şekillenmişse diöstrüs 56-58 gün kadar sürer ve sonrası

laktasyon başlar (Aspinall ve O'Reilly, 2005; Concannon, 2011; Correa, 2008; Davidson, 2006; Davidson ve Barker, 2009; England, 1998; Jeffcoate, 2004; Kustritz, 2012; Linde-Forsberg, 2001; Pineda, 2003). Diöstrusun ve gebeliğin hormonal mekanizması benzerlik gösterir ve progesteron etkisi altındadır (Kalkan ve Horoz, 2007; Schillo, 2009; Vestegen-Onclin ve Verstegen, 2008). Dişi köpek fertil dönem bittip diöstrusa girince vajinal duvar pembe renge döner. Diöstrus evresinde vajinal kıvrımlar düz ve yuvarlak bir şekil alır ve vulvada tekrar eski halini döner (Concannon, 2011; Davidson ve Barker, 2009; England, 1998; Johnston ve ark., 2001; Jeffcoate, 2004; Kustritz, 2012).

2.3.4. Anöstrus

Anöstrus evresi seksüel dinlenme evresidir. Bu evre diöstrüs veya gebelik sonu ile gelecek proöstrüsün başlangıcına kadar geçen süredir. Bu evrede dişi köpek erkek köpeği reddeder (Davidson ve Barker, 2009). Gebe olan köpeklerde anöstrüs evresinde uterus involusyonu (Kustritz, 2012) ve endometriyum onarımı gerçekleşir (Davidson ve Barker, 2009; Edens ve Health, 2003). Gebe olmayan köpeklerde uterus involusyonu, ovaryum inaktivitesi ve endometriyum yenilenmesi gözlenir. Köpeklerde geçen bu süre anöstrusun minimum süresidir (Kustritz, 2012). Gebe olmayanlarda diöstrusun bitimi ile anöstrusun başlangıcı klinik olarak kolaylıkla ayırt edilmez (Kustritz, 2012).

2.4. Köpeklerde Oogenesis

2.4.1. Ovaryan Folikül Oluşumu

Köpek fetusunda oogonyumun oluşumu, yaklaşık olarak koitus sonrası 42 gün sonra belirlenebilmektedir (Andersen ve Simpson,1973). Köpek folikülleri, foliküler sıvının mevcudiyeti, folikül hücre tabakası ve türü, büyüklüğü ve morfolojisine bağlı olarak beş sınıfa ayrılabilir. Doğumdan sonraki 17 ila 54 günlerde tek katlı yassı hücre tabakası ile kaplı 25 µm çapındaki küçük bir oositten oluşan primordial foliküller şekillenir. (Andersen ve Simpson,1973; Blackmore ve ark., 2004; Tesoriero,1981). Fakat bu aşamada zona pellusida (zp) oluşmamıştır (Blackmore ve ark., 2004; Durrant ve ark., 1998). Primer foliküller doğumdan sonraki yaklaşık 120. günde oluşur. Bu

primer foliküller ortada 78 ± 1 μm çapında küçük ve soluk oositler etraflarında belirgin bir zona pellusida ve en dışta ise tek katlı kuboidal hücrelerden oluşan bir granuloza katını içerirler (Baber ve ark., 2001; Durrant ve ark., 1998).

Primer foliküllerin büyüklüğü birbirlerinden çok farklı değildir, fakat folikül hücrelerinin diferensiyonu ve proliferasyonu sebebiyle ikinci ve üçüncü evreye geçiş esnasında büyüklüklerinde önemli bir artış görülür. Aynı zamanda zp ve oosit de önemli ölçüde büyür (Barber ve ark., 2001). Sekonder folliküller iki veya daha fazla granuloza katı içerirler (Songsasen ve ark., 2009). Sekonder foliküller sitoplazmik lipid nedeniyle koyu renk almış tamamen büyümüş oositler içerirler (Baber ve ark., 2001; Durrant ark., 1998). Foliküler sıvı sentezinin doğumdan 120 ila 160 gün sonra tersiyer aşamada olduğu bilinmektedir (Andersen ve Simpson, 1973; Baber ve ark., 2001; Durrant ark., 1998). Bu nedenle prepubertal dişi köpeklerde primodial foliküllerin tersiyer foliküllere dönüşümü için geçen süre yaklaşık 70 ila 150. gün arasındadır (Andersen ve Simpson, 1973), ki buda yetişkin köpekler için gerekli olan 110 güne denk düşer (Spanel-Borowski ve Calvo, 1982). Gelişmiş tersiyer foliküller (bunlar, çapı 2 mm'den büyük olan gelişmiş antral folliküllerdir ve aynı zamanda graaf follikülü olarak isimlendirilirler) proöstrustan kısa süre önce 6 aylık kadar genç yaştaki köpeklerde bulunmaktadır (Concannon ve ark., 1989).

LH'nin ani yükselişi sonucu gelişmiş tersiyer foliküller hızlıca genişleyerek preovulatör foliküllere dönüşürler ve yaklaşık 48 saat sonra ovule olurlar (Concannon ve ark., 1989; England ve Allen, 1989; Wildt ve ark., 1979). Büyümekte olan birçok folikül preovulatör aşamaya ulaşmadan atreziye olur. Sekonder foliküllerde (ya da ileri preantral foliküllerde) 2 tip gerileme modeli görülür. Tip A'da dejenerasyon, oositler ve zp'deki nekrotik değişiklikler ile karakterize olurken, Tip B'de ise granuloza hücresi nekrozu görülür (Spanel-Borowski, 1981). Tip B dejenerasyonu tersiyer folikülde bulunan benzer bir yapı olan pseudoantrum gelişimi ile sonuçlanır (Spanel- Borowski, 1981).

2.5. Köpeklerde Oosit Maturasyonu

Ovulasyon köpeklerde östrusun 2. gününden 7. gününe kadar olan bir zaman aralığı şekillenebilir (Holst ve Phemister, 1971; Phemister ve ark., 1973; Tsutsui, 1989). Köpek üremesindeki en ayırt edici özellik oositlerin ilk mayotik bölünmenin

germinal vezikül (GV) safhasının başlangıcında ovule olmasıdır. Preovulatör foliküller (4-13 mm çapında), oositleri (118-135 µm çapında) germinal vezikül break down (GVBD)'nin 48 saat içinde meydana geldiği yumurta kanalına gönderir (Farstad ve ark., 1989; Holst ve Phemister 1971; Renton ve ark., 1991; Reynaud ve ark., 2005; Tsutsui, 1989). Dişi köpeklerde tür ve de yaş oosit maturasyonunun gelişimini etkilemez (Reynaud ve ark., 2005).

Oosit yumurta kanalının orta kısmına ulaştığında, nükleer maturasyon yüksek progesteron sirkülasyonunun oluşumu (Concannon ve ark., 1989; Reynaud ve ark., 2005; Wildt ve ark., 1978) sırasında ovulasyon sonrasındaki 48 ila 72 saat içerisinde tamamlanır (Tsutsui, 1989). Oositler ve embriyolar üzerine yapılan ayrıntılı bir çalışmadan elde edilen sonuca göre, yumurtlama sonrasındaki 17 ila 138. saat arasında oositlerin ovule olmasını izleyen 54 saat içinde ilk mature oosit (MII) gözlemlenmiştir (Reynaud ve ark., 2005). Oositlerin ovidukt içinde olgunlaşmasıyla kumulus hücrelerinde genleşme görülmüştür. Fakat korona radiata'nın zp tarafındaki en alt kısmı fertilizasyondan morula safhasına kadar embriyonun gelişimi süresince oositten ayrılmamaktadır (Renton ve ark., 1991; Tsutsui, 1989).

Fertilize olmuş köpek oositleri 9 ila 10 gün boyunca ovidukta tutulur ve sonrasında kediler (Swanson ve ark., 1994), inekler (Gordon, 1994) ve fareler (Hogan ve ark., 1986) için belirtilen günlerden 3-5 gün daha fazla süren morula safhasında iken uterusu geçerler (Songsasen ve Wildt, 2007).

Çiftleşme ovulasyondan (Renton ve ark., 1991) 3 gün kadar daha önce meydana gelebileceği için immature köpek oositi ve sperm hücresi ovudakta bir araya gelir ve sperm penetrasyonu nükleer maturasyonun devamına ve mayoz bölünmenin sürdürülmesine neden olur (Saint-Dizier ve ark., 2001a; 2001b). Fakat in vivo çalışmalarda oositin nükleer maturasyonunu tamamlamasının ardından ovulasyondan sonraki 44 ila 120. saate kadar fertilizasyonun gerçekleşmeyebileceği gösterilmiştir (Badinand ve ark., 1993; Reynaud ve ark., 2005; Tsutsui, 1989). In vivo koşullarda yapılan bu gözlemler in vitro koşullarda yapılanlarla çelişmektedir. Örneğin köpeklerdeki oosit maturasyonunun, zp'ye nüfuz eden ve nükleer yoğunlaşmaya maruz kalan sperm hücresi için bir önkoşul olmadığını gösterilmiştir (Songsasen ve Wildt, 2007). Buna ek olarak yakın zamanda, in vitro koşullarda spermatozoonun nüfuz ettiği köpek oositlerinin mayoz bölünmeyi sürdürdüğünü ve spermatozoon

bulunmayanlardan daha büyük oranda maturasyonu tamamladıkları gösterilmiştir. Bu zamana kadar in vivo ya da in vitro gözlemler arasındaki çelişkiye dair net bir açıklama yapılamamıştır (Saint-Dizier ve ark., 2001a; Saint-Dizier ve ark., 2001b).

Ovidukt hücrelerinin spermatozoon kapasitasyonuna maruz kalmasını önleyen kalsiyum geçişini engelleyerek köpek sperm hücresinin uzun ömürlülüğünü devam ettirebileceği bilinmektedir (Kawakami ve ark., 2001). Dahası, köpek spermatozoası çiftleşmeden sonraki 11 gün kadar uzun bir süre in vivo ortamda yaşayabilmektedir. Bu gözlemlere dayanarak in vivo ve in vitro çalışmalar arasındaki çelişkinin, fertilize olacak oositlerin fertilizasyon kapasitesinin yetersizliği yerine, oviduktaki sperm kapasitasyonunun gecikmesi ile ilişkilendirilmesi daha mantıklıdır (Songsasen ve Wildt, 2007).

Köpeğin oosit maturasyonu sırasında oluşan yapısal ve biyokimyasal değişikliklere ilişkin bazı çalışmalar bulunmaktadır. Mayoz bölünme sırasında köpek oositlerinin diğer memeli türlerde de gözlemlenen değişimlere benzer olarak hücre iskeleti ile ilgili değişikliklere maruz kaldığı bildirilmiştir (Dedieu ve ark., 1996; Kim ve ark., 1996; Veilla ve ark., 2005; Verlhac ve ark., 1994). Germinal vezikül safhasındaki oositler, subkortikal mikrotübüller ile perinükleer tubulinlerin geniş çaplı sıralanışını kapsamaktadır. Ancak iyi ayarlanmış hiçbir mikrotübüler ağa bu gelişimsel safhada rastlanılmamıştır (Saint-Dizier ve ark., 2004). GVBD aşamasındaki oositlerde mikrotübüller arasında net bir ağ bulunmaktadır ve küçük tubulin hücreleri ooplazma boyunca gözlenmektedir. Kromozomlar MI safhasında fazlasıyla sıkıştırılmış ve mikrotübüller, mayotik iğsi lifler ile sınırlandırılmıştır. MI safhasındaki oositlerin mikrotübül organizasyonu MII oositlerinki ile aynı ama daha küçüktür (Saint-Dizier ve ark., 2004).

Köpeklerde oositlerin hücre siklusu kontrolüne dair bilgi yetersizliği bulunmaktadır. Fakat maturasyonu destekleyen faktörün (Maturation Promoting Factor, MPF) ve mitojenle etkileşen protein kinazının aktivasyonlarının (Mitogen-Activated protein Kinase, MAPK) mayotik safhaya bağlı olduğu bildirilmiştir (Saint-Dizier ve ark., 2004). Kinaz aktiviteleri GV ve GVBD oositlerinde minimal düzeyde iken, MI ve MII safhalarına geçildiğinde önemli derecede artmaktadır. Kumulus hücreleri MAPK aktivasyonunu ve oositlerin fosforilasyonunu kontrol etmektedir. Birkaç sıra kumulus hücresi katmanı ile tamamen çevrelenen oositler sadece korona

radiata ile çevrelenen oositlerden daha yüksek MAPK aktivitesi göstermektedir (Kalab ve ark., 1997). Bu durum kumulus hücrelerinin köpek oositlerinin gelişimini ve maturasyonunu düzenleme konusunda önemli bir role sahip olduklarını doğrulamaktadır (Songsasen ve Wildt, 2007).

2.6. Köpeklerde Oosit Elde Edilmesi ve İn Vitro Maturasyon (İVM)

2.6.1. Köpeklerde Oosit Elde Edilmesi

İn vitro embriyo üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biriside oosit elde etme yöntemidir (Katska-Ksiazkiewicz ve ark., 2007). Kullanılan oosit toplama yönteminin amacı her ovaryumdan çok sayıda ve kaliteli oosit elde etmektir (Wani ve ark., 2000). Oositin gelişim evresi gelişim yeteneğini ve kalitesini belirler, donörün yaşı, oosit büyüklüğü, nükleer ve kumulus hücre morfolojisi ivm oranını etkiler (Hewitt ve England, 1998a; Krisher , 2004; Srsen ve ark.,1998). İvm uygulamaları için kullanılan köpek oositleri genellikle ovario-histerektomi ameliyatı geçirmiş köpeklerden toplanmaktadır.

Oositlerin elde edilmesi, ovaryumların ovario-histerektomi ile toplanması laboratuvara getirilmesi, ovaryumların yıkandıktan sonra artık dokularından arındırılması ve foliküllerden silicing ve punksiyon yöntemi ile oosit elde edilmesi, kumulus hücrelerine göre oositlerin seçilmesi ve yıkama aşamalarından oluşur (Wani ve ark., 1999). Ovaryumların taşıma sıcaklığı (Lee ve ark., 2007 ; Taş ve ark., 2006), dişi donör yaşı (Hewitt ve England, 1998), oosit çapı ve oosit kültür yoğunluğu (Otoi ve ark., 2002) in vitro olgunlaşmayı etkileyen hususlardır.

İn vitro maturasyon için immature oositlerin seçilmeleri oositlerin morfolojik özelliklerine göre yapılmaktadır (Songsasen ve Wildt, 2007) Seçilen kaliteli oositler in vitro maturasyon ortamına aktarılarak mature edilirler.

2.6.2. İn Vitro Maturasyon

Köpek oositlerinin in vitro fertilizasyonunda tartışmalı iki farklı görüş bulunmaktadır. Bir grup araştırmacı (Cinone ve ark., 1992; Rodriguez ve Rodriguez, 2006) maturasyon medyumuna içerisine gonadotropinlerin, steroidlerin, büyüme faktörlerinin ve çeşitli protein kaynaklarının ilave edilmesinin başarıda önemli rol

oynadığını bildirirken, diğerleri (Bolamba ve ark., 2002; Rodriguez ve Rodriguez, 2006; Songsasen ve ark., 2002,) maturasyon medyumuna içerisine protein ya da çeşitli protein kaynaklarının katılmasından da in vitro maturasyonun şekillenebileceğini öne sürmüştür. Kullanılan medyumun olabildiğince basit olması test edilecek maddelerin oositleri ne oranda etkilediğini belirlemek açısından önemlidir. Ancak, medyuma katılacak serumun medyumdaki bazı toksik unsurların bertaraf edilmesindeki rolünün olduğu da unutulmamalıdır. Kullanılan serum oksidatif stres ürünlerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırır ve ortamın pH'sını dengede tutmaya yardımcı olur. Ayrıca, kullanılan serum zona pellusidanın sertleşmesini de önlemektedir (Rodriguez ve Rodriguez, 2006). Böylece, maturasyon sonrasında dolaylı yoldan in vitro fertilizasyon ve gelişime de katkıda bulunmaktadır.

Gonadotropinler ile steroid hormonların da köpek oositlerinin in vitro maturasyonu üzerindeki etkileri tartışmalıdır. Yapılan bazı çalışmalarda in vitro maturasyon başarısını olumlu etkilediği bildirilirken, bazı çalışmalarda da başarıyı etkilemediği belirlenmiştir. Bu durumda anılan maddelerin elde edildiği kaynakların farklı olmasından ve in vitro maturasyon medyumlarındaki değişen düzeylerde bulunmasından kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Rodriguez ve Rodriguez, 2006).

In vitro maturasyon sürecinde oositleri kuşatan kumulus hücrelerinin varlığının önemli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Rodriguez ve Rodriguez, 2006; Sirard ve ark., 2002; Tange ve ark., 2002). Kumulus hücreleri oosit içerisindeki metabolitlerin hücreden geçişlerini kontrol etmede rol oynamaktadır (Cetica ve ark., 2002; Rodriguez ve Rodriguez, 2006). Diğer memelilerden farklı olarak köpeklerde kumulus hücreleri embriyo morula aşamasına ulaşana kadar oositle bağlantılarını koparmamaktadır. Dolayısıyla, kumulus hücrelerinin köpeklerde erken embriyonik gelişim döneminde önemli düzenleyici fonksiyonlara sahip olduğu değerlendirilmektedir (Rodriguez ve Rodriguez, 2006).

Köpeklerde in vitro maturasyona tabi tutulan köpek oositlerinin mayotik cevabı hala tahmin edilebilir değildir. Diğer türlere nazaran daha uzun süre gerektiren in vitro maturasyon sürecinde, medyumdaki bileşenlerin yetersizliklerini, hangi maddelerin zararlı veya baskılayıcı olduklarını ya da konsantrasyona bağlı indükleyici etkinin hangi konsantrasyonda olduğunu belirlemek büyük zorluklar taşımaktadır. Ayrıca,

oositlerin elde edildiği köpekten kaynaklanan bireysel farklılıklarda bu konuda büyük önem taşımaktadır (Rodriguez ve Rodriguez, 2006; Rodrigues ve ark.,2004).

2.7. İn Vitro Maturasyona Etki Eden Faktörler

Oositlerin elde edildiği köpeğin yaşı, ırkı, üreme siklusunun safhası ve folikül büyüklüğü, kullanılan kültür medyumunu, kültür süresi, protein ve hormon takviyesi ile kumulus/granuloza hücreleri oositlerin in vitro maturasyon oranlarını etkilemektedir.

2.7.1. Köpeğin Yaşı ve ırkı

Köpeğin yaşı in vitro maturasyon çalışmalarında ovaryumdan alınan oosit sayısını etkilemektedir. Daha genç bireyler (12 aydan daha küçük) veya daha yaşlı bireyler (7 yaşında ya da daha büyük) ile karşılaştırıldığında, 1-6 yaş arasındaki dişi köpeklerde folikül ve oosit üretiminin daha fazla olduğunu gösterilmiştir (Ström ve ark., 2001). Prepubertal dişi köpeklerden alınan intraovaryan oositlerinin (4-6 aylık) mayoz bölünmeyi başlatmada ve tamamlamada yetersiz olduğu bildirilmiştir. Köpeğin yaşam döngüsünün bu safhasında kumulus ve etrafındaki granuloza hücreleri ya da direkt oosit arasında az sayıda hücreli bağlantı bulunduğu görülmektedir. Prepubertal dişi köpeklerden alınan oositlerde düşük protein sentezine rağmen, yüksek metabolik ve transkripsiyon aktiviteleri hücrelerin tamamen gelişimsel yeterlilik kazanamadığını göstermektedir (Haenisch ve ark., 2003). Aksine, dişi köpekler 6 aylık (prepubertal) ila 7 yaş (olgun) arasındayken, oosit mayotik yeterliliğinde donörün yaşının hiçbir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Hewitt ve England, 1998a; Songsasen ve ark., 2002). Ancak oositin gelişimsel yeterliliği ileri yaşlarında olan dişi köpeklerde önemli derecede azalmaktadır (Hewitt ve England, 1998a). Mevcut verilerin sınırlı olmasına rağmen, dişi köpeklerde ırkın, her ne kadar melez donörlerden safkan donörlere oranla daha fazla ovaryan folikül elde edilse de, in vitro nükleer maturasyon yeterliliğini etkilemediği bildirilmiştir (Durrant ve ark.,1998).

2.7.2. Üreme Siklusunun Safhası ve Folikül Büyüklüğü

Üreme siklusunun safhası ve oositin mayotik yeterliliği arasındaki ilişki üzerine yayınlanan çalışmalar çelişkili sonuçlar bildirmektedir. Bazı araştırmacılar siklus safhası ve mayotik yeterlik arasında bir ilişki bulunmadığını ifade ederlerken (Cinone

ve ark., 1992; Hewitt ve England, 1997; Otoi et al.,2002; Rodrigues ve Rodrigues, 2003b; Songsasen ve Wildt, 2005), diğerleri üreme siklusunun safhasının oositin gelişimsel yeterliliğini önemli derecede etkilediğini bildirmiştir (Kim ve ark., 2004; Luvoni ve ark., 2001; Otoi ve ark., 2001; Willingham-Rocky ve ark., 2003; Rodrigues ve ark., 2004). Preovulatör folikülden ve foliküler (östrus/proöstrus) evredeki köpeklerden elde edilen oositlerin diğer üreme evresinde elde edilen oositlerden daha yüksek oranda nükleer maturasyonu tamamladığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2004; Otoi ve ark.,2001; Yamada ve ark.,1993; Willingham-Rocky ve ark., 2003). Benzer bir şekilde östrus safhasındaki dişi köpeklerden elde edilen oositlerin proöstrus ve anestrus dönemdeki dişi köpeklerden alınan oositlere kıyasla daha yüksek oranda mature oldukları da gösterilmiştir. Fakat diostrus safhasındaki dişi köpeklerden alınan oositlerin östrus safhasındaki dişilerden alınan oositlerle benzer biçimde MII aşamasına geliştiği de gösterilmiştir. Luteal veya anestrus safhalara kıyasla foliküler evredeki dişi köpeklerden alınan intraovaryan oositlerde pronükleus oluşumu daha sık gözlemlendiği için üreme siklusu safhasının fertilizasyon kapasitesini etkilediği de bildirilmiştir (Rodrigues ve ark., 2004).

Üreme siklusu safhası boyunca oositlerin mayotik yeterliliğindeki farklılıklar büyük olasılıkla oositlerin elde edildiği safhadaki folikül ve oositlerin büyüklüklerindeki dağılımdan kaynaklanmaktadır. Östrus, diöstrus ve anestrus sırasında gelişen foliküllerin ortalama çapları (sırasıyla 119,2, 107,7 ve 103,6 µm) arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca, 120 µm çapından daha büyük olan oositler diğer üreme safhalarından ziyade foliküler safhada elde edilmiştir.

Oositlerin mayoz bölünmeyi devam ettirebilmesi için çaplarının en az 100-120 µm olması gerektiğini ve nükleer maturasyonun daha küçük boyutlarla kıyaslandığında 120 µm'lik oositlerde arttığının bilinmesinden dolayı bu durum önemlidir. İn vitro maturasyonda oosit boyutu önemli olsa da, IVM başarısını sınırlayan tek faktör olarak sınırlandırıcı değildir. Büyük oositlerin (çapı 120 µm'den daha büyük) sadece %20 kadarı in vitro şartlarda nükleer olgunlaşmayı tamamlamaktadır (Otoi ve ark., 2000, 2001; Songsasen ve Wildt, 2007).

Folikül boyutunun köpek oositinin gelişimsel yeterliliğini önemli derecede etkilediği gösterilmiştir (Songsasen ve Wildt, 2005). Daha küçük çaplı foliküllerden (0,5 - < 2 mm) elde edilen oositlerin sadece %16-38'i in vitro koşullarda nükleer

maturasyonu tamamlarken, 2 mm çapından büyük foliküllerden elde edilen oositlerin %80'i kadarı in vitro koşullarda nükleer maturasyonu tamamlamaktadır (Songsasen ve Wildt, 2005). Buna ek olarak, üreme siklusu safhaları ile farklı boyutlardaki foliküllerin dağılımı arasında da bir ilişki olduğu fark edilmiştir. Örneğin, 2 mm'den büyük foliküller proöstrus veya östrus safhalarında daha çok gözlemlenirken, anestrus ve diöstrus safhasındaki dişi köpeklerin ovaryumlarında 0,5 mm çapından daha küçük foliküller bulunmaktadır (Songsasen ve Wildt, 2005). Buna rağmen, proöstrus safhasındaki dişi köpeklerin ovaryumlarında bazı küçük foliküller gözlemlenebilir ve diöstrus safhasındaki bireylerde de birkaç büyük folikül bulunabilir. Üreme siklusu temel alındığında, gruplar arasında mayotik maturasyonu tamamlayan oositlerin oranları arasında ciddi farklılıklar yoktur (Songsasen ve Wildt, 2005). Bu yüzden, folikül boyutunun köpek oositinin gelişimsel yeterliliğini etkileyen önemli bir faktör olduğu çok açıktır. Köpek oositleri rasgele dilimleme yöntemi ile toplanmaktadır. Dolayısıyla, elde edilen farklı gelişim aşamasındaki heterojen oosit popülasyonunda nükleer maturasyonun tamamlanmasında büyük değişikliklerin gözlenmesi kaçınılmazdır (Luvoni ve ark., 2005).

Anöstrus safhasındaki dişi köpeklerde ooplazm ve kumulus hücreleri arasında iletişimde eksikliğin var olduğu bildirilmiştir (Luvoni ve ark., 2001) ve bu durum anöstrus safhasında elde edilen oositlerin siklusun diğer evrelerinde elde edilen oositlerden farklı kültür şartlarını gerektirebileceği öngörülmektedir (Songsasen ve Wildt, 2007). Örneğin, kültür yoğunluğu in vitro nükleer maturasyonu tamamlamak için anöstrus safhasında alınan oositlerin yetisini önemli derecede etkilemektedir (Otoi ve ark.,2002). Yüksek yoğunlukta oosit (20 oosit/100µl maturasyon medyumu) kullanıldığında, diöstrus safhasında elde edilen oositlerin sadece %50'si germinal vezikül aşamasında bloke olurken, anöstrus safhasında elde edilen oositlerin %80 gibi büyük çoğunluğunun germinal vezikül aşamasında bloke olduğu bildirilmiştir. Kültür yoğunluğu 10 oosit/100 µl maturasyon medyumu düzeyine düşürüldüğünde ise, anöstrus safhasında elde edilen daha fazla sayıda oosit mayoz bölünmeye devam etmekte ve nükleer maturasyonu tamamlamaktadır. Oysa, diöstrus safhasında elde edilen oositlerden elde edilen sonuçlar arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Böylelikle anestrus ve diöstrus safhasındaki dişi köpeklerden elde edilen oositler

arasındaki mayotik yeterlilikteki farklılıkların ideal kültür yoğunluğu kullanılarak giderilmesi söz konusu olabilmektedir (Otoi ve ark.,2002; Songsasen ve Wildt, 2007).

2.7.3. Kullanılan Kültür Medyumu

Köpek oositlerinin in vitro maturasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılan 3 farklı maturasyon medyumu kullanılmıştır: Bunlar TCM-199, Synthetic Oviductal Fluid (SOF) ve CMRL 1066 medyumlarıdır. Yapılan ilk çalışmalarda kompleks medyum TCM-199 ile basit medyum SOF kullanımında aralarında fark olmadığını bildirilmiş olmasına rağmen, daha sonra yapılan bir çalışmada TCM-199'un daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (Rota ve Cabianca, 2004). Yapılan başka bir çalışmada ise iki kompleks medyum, TCM-199 ve CMRL 1066, karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda TCM-199 medyumundan daha başarılı sonuç elde edilmiştir. Bu duruma TCM-199 medyumunun CMRL 1066 medyumuna kıyasla daha çok vitamin ve daha yüksek konsantrasyonda sistein ve askorbik asite sahip olması gösterilmiştir (Songsasen ve ark., 2002). Oositlerin in vitro maturasyonu için kullanılan medyum içerisine antioksidan β -merkaptetanol ilavesi yapılmış ve oksidatif strese duyarlı yüksek miktardaki hücre içi yağ içeren köpek oositlerinin in vitro maturasyonu için β -merkaptetanol ilavesinin önemli olduğu saptanmıştır (Kim ve ark., 2004).

2.7.4. Kültür süresi

Köpek oositleri ovidukt içerisinde in vivo nükleer maturasyonu tamamlamak için 48-72 saate gereksinim duyarlar (Reynaud ve ark., 2005). Normal şartlarda köpek oositlerinin in vitro maturasyonu için bildirilen optimum süreç in vitro fertilizasyon sonrası embriyonik gelişim baz alındığında 48 saattir. Ancak, yapılan bir çalışmada 72 saat süre ile in vitro mature edilen köpek oositlerinin 48 saat süre ile mature edilenlerden daha yüksek oranda nükleer maturasyonu tamamladığı bildirilmiştir (Otoi ve ark., 2004).

2.7.5. Protein ve Hormon Takviyesi

Köpek oositlerinin in vitro maturasyonunda kullanılan çeşitli protein takviyelerinin kullanılması yoğun olarak çalışılmış olmasına rağmen, elde edilen sonuçlarda tutarsızlık görülmektedir (Bolamba ve ark., 2002; Evecen ve ark., 2002;

Otoi ve ark., 1999; Rodrigues ve Rodrigues, 2003a; Songsagen ve ark., 2002). Köpek oositlerinin in vitro maturasyonu amacıyla TCM-199 medyumunu kullanıldığında, %0,3 bovine serum albümin (BSA) ya da %10-20 oranında fetal calf serum (FCS) takviyesinin optimum sonuç almada etkin olduğu bildirilmiştir (Songsasen ve Wildt, 2007). Basit medyum SOF kullanıldığında ise, BSA'nın yararlı etkisinden faydalanabilmek için daha yüksek konsantrasyonuna (%4) gereksinim duyulmaktadır (Hewitt ve England, 1999b). Ancak, başka bir çalışmada ise, SOF medyumuna yapılan protein takviyesinin köpek oositlerinin in vitro nükleer maturasyonunda gerekli olmadığı da bildirilmiştir (Bolamba ve ark., 2002).

Maturasyon medyumuna serumun ilave edilmesi sonucunda maturasyon sürecinden sonra ayırt edilemez nükleer organizasyonlu oosit oranında artış olduğu bildirilmiştir (Songsasen ve Wildt, 2007). Serum takviye edilmiş maturasyon medyumuna BSA'nın ilave edilmesiyle yalnızca serum takviyesi yapılan gruba göre daha az dejenere oosit elde edildiği gösterilmiştir (Bolamba ve ark., 2002). Ancak, günümüze kadar birçok çalışmada serumun protein kaynağı olarak kullanılmasına rağmen, elde edilen sonuçların çok büyük değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, maturasyon medyumuna %20 oranında östrustaki inek serumu (estrus cow serum, ECS), östrustaki dişi köpek serumu (estrus bitch serum, EBS) ya da fetal buzağı serumu (fetal calf serum, FCS) ilave edilmiştir ve çalışma sonucunda FCS kullanılan grupta daha yüksek oranda MI/MII aşamasına ulaştığı bildirilmiştir (Robertson ve ark., 1992).

Köpek oositlerinin in vitro maturasyonunda maturasyon medyumuna 17β -östradiolün ilave edilmesinin özellikle foliküler safhada bulunan köpeklerden elde edilen oositlerin maturasyon oranlarını artırdığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2005). Progesteronun tek başına ya da östradiolle kombinasyonunun kullanılmasının da foliküler fazda bulunan köpeklerden elde edilen oositlerin nükleer maturasyonuna olumlu katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2005). Bu durumun aksine, progesteronun üreme siklusunun herhangi bir döneminde bulunan köpeklerden elde edilen oositlerin nükleer maturasyonu üzerinde etkili olmadığı da bildirilmiştir (Willingham-Rocky ve ark., 2003).

Diğer hayvan türlerinde yaygın olarak kullanılan gonadotropinler (folikül sitümüle eden hormon, FSH ve luteinleştirici hormon, LH) köpek oositlerinin

maturasyonunda kullanılmamaktadır. Gonadotropinlerin maturasyon medyumu içerisine ilave edilmesinin köpek oositlerinin mayotik maturasyonunu desteklemede başarısız kaldığı bildirilmiştir (Hewitt ve England, 1999a). Ayrıca, maturasyon medyumu içerisine tüm kültür süreci boyunca LH ilave edilmesinin MII aşamasına gelişen oositlerin oranını düşürmekte olduğu gösterilmiştir (Songsasen ve ark., 2002). Kültür periyodu boyunca gonadotropinlerin maturasyon başarısını olumsuz etkilemesine rağmen, oositlerin kısa süreliğine geçici bir süre LH ve FSH hormonlarına maruz bırakılmasının nükleer maturasyonu destekleyebileceği bildirilmiştir (Songsasen ve Wildt, 2007). Yapılan rutin çalışmalarda çoğunlukla gonadotropinler kullanılmamaktadır.

2.7.6. Kumulus/Granuloza Hücreleri

Köpek oositlerinin in vitro maturasyonu ile ilgili birçok çalışmada, kumulus genişmesi ve kumulus granuloza hücreleri ile oosit arasındaki ilişki detaylı bir şekilde tartışılmamıştır. En az iki sıra kumulus hücrelerine sahip oositlerde kumulus genişmesi gözlenirken, tek sıralı kumulus hücrelerine sahip oositlerin 48 saatlik kültüründen sonra dejenere oldukları bildirilmiştir. Bu çalışmada kutup hücresi atılımı da sadece en az iki sıra kumulus hücrelerine sahip oositlerde gözlenmiş ve sonuç olarak kumulus hücrelerinin varlığının köpek oositlerinin IVM'u için önemli rol oynadığı saptanmıştır (Nickson ve ark., 1993).

2.8. Ovaryumların Taşınma Sıcaklığının Etkileri

Biyoteknolojik çalışmalar, hem evcil hem de nesli tükenmekte olan türler için genetik materyalleri korumaya yönelik yöntemleri araştırmaya devam etmektedir. En önemli sorunlardan birisi de oositlerin elde edileceği yumurtalıkların uzun mesafelerden laboratuvara taşınmasıdır (Evecen ve ark., 2010). Karnivor oositler in vitro koşullarda kolayca bozulabilmektedir (Roodrigues ve Rodrigues, 2003b; Songsasen ve ark., 2002). Oositlerde hücresel otolizler uzun süre boyunca +35-38°C'de taşınma sürecinde meydana gelmektedir. (Holt ve Picard,1999). Oosit proteinleri, mitojenle aktive olan protein kinaz, maturasyonu destekleyici faktör (Maturation promoting factor, MPF) ve cdc2-kinaz oosit olgunlaşmasına izin veren faktörlerden bazılarıdır (Fissore ve ark., 1996; Smitz ve ark., 2004). Bu türlere spesifik

proteinlerin miktarları farklılık göstermektedir. Vücut sıcaklığından daha düşük sıcaklıklarda hücre metabolizması yavaşlar ve bu spesifik proteinlerin etkileri bastırılır (Smitz ve ark., 2004). Her ne kadar kediler ve sığırlar gibi bazı memeli türlerinde +4°C’de taşınan ve depolanan yumurtalıklar ile başarılı oosit maturasyon sonuçları bildirilmiş olmasına rağmen, bu oranlarda koyunlarda +32°C’den daha düşük oranda maturasyon oranları elde edilmiştir (Özdaş ve ark., 2005). Maturasyon medyumu içerisinde hangi bileşenlerin yetersiz olduğunun ya da hangi unsurların zararlı veya baskılayıcı olduğunun belirlenmesinin güç olmasından dolayı, in vitro maturasyona tabi tutulan köpek oositlerinin mayotik tepkisi henüz tam olarak önceden kestirilememektedir. (Rodrigues ve Rodrigues, 2006). İVM deneylerinde kullanılan oositlerin farklı ırk ve yaştan köpeklerden elde edilmesinden ve bu oositlerin farklı kültür sistem ve medyumlarında kültür edilmesi nedeniyle köpek oositlerinin mayoz bölünmeyi tamamlama oranları değişkenlik göstermektedir (Farstad, 2000). Yukarıda da ifade edildiği üzere, kültüre alınan oositlerin sayısı, yumurtalıkların taşınma sıcaklığı, köpeğin yaşı ve oositlerin çapı in vitro olgunlaşmayı etkilemektedir (Evecen ve ark., 2010; Evecen ve ark., 2018; Hewitt ve England, 1998; Lee ve ark., 2006; Otoi ve ark., 2002; Taş ve ark., 2006).

Östrus siklus evresine bakılmaksızın +4°C’de taşınan ovaryumlardan elde edilen oositlerin maturasyon oranları +35-38°C’de taşınanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak, bu çalışmada östrus siklus aşamasının maturasyon üzerinde etkili olup olmadığı net olarak belirlenmemiştir (Taş ve ark., 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sunulan tez çalışması Uludağ Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 04/02/2014 tarih ve 2014 -03/05 nolu etik kurul kararı onayı ile gerçekleştirilmiştir. Araştırmada, hayvan materyeli olarak Bursa Nilüfer Belediyesi hayvan barınağı ameliyathanesinden ovario-histeroktomi işlemi yapılan sokak köpeklerinin ovaryumları kullanılmıştır.

3.1. Dişi Köpek Seçimi

Dişi köpeklerin seçiminde operasyona alınacak köpeklerin öncelikle pubertaya ulaşmaları bakımından 1-5 yaş arasındaki dişi köpekler seçilmiştir. Dış bakıda vücut kondisyonlarının iyi olmasına dikkat edilmiştir. Aşırı şişman veya kaşektik köpekler çalışma için kullanılmayıp elenmiştir. Son aşama olarak çalışmada kullanılacak köpeklerin genel muayeneleri yapılmıştır. Yapılan muayeneler de solunum sistemi ve ürogenital sistem üzerine yoğunlaşmıştır. Bu kriterleri sağlayan köpekler çalışma için kullanılmıştır.

3.2. Operasyon Yöntemi

Çalışmada kullanılacak ovaryumlar ovario-histeroktomi uygulamasını takiben dışarı alınan genital organlardan alınmıştır. Dişi köpeklerde operasyon en ideal kızgınlık başladıktan 2 ay sonra olduğu için, genellikle anöstrus dönemindeki dişi köpekler kullanılmıştır. Operasyona alınacak köpeklerin operasyon öncesi genel muayeneleri yapılmıştır. Sağlık sorunu olmayan, genel muayenelerinde olumsuzluk bulunmayan köpekler operasyona alınmıştır. Operasyona alınacak dişi köpeklerin anesteziye alınmadan önce yem ve suları uzaklaştırılmıştır. Anesteziye alınan dişi köpekler median hattın operasyon yapılacağı için operasyon masasına dorsal pozisyonda yatırılmıştır.

Anesteziye alınan köpekler operasyon bölgesinin kılları temizlendikten sonra, uygun cilt temizleyicileri ile temizlenip bölgenin antiseptik solüsyonlarla aseptisi sağlanmıştır. Uygun olan steril serviyetler ile ensizyon bölgesi sınırlandırılıp operasyona başlanmıştır. Ensizyon hattı linea alba hattından umblikal bölgenin 1 cm'den fazla kaudalinden başlayıp linea alba hattından devam ederek pubis kemiğinin

2-3 cm önünde sonlandırılmıştır. Oluşan ensizyon hattı yaklaşık 2-3 cm kadardır. Yapılan ensizyon yerinden cilt altındaki bağ ve yağ dokular küt bir makasla diseke edilir, böylece linea albanın daha rahat görülmesi sağlanmıştır. Linea alba ortasından dişli bir pensle çekilerek, önce küt bir makasla diseksiyonla delinmiştir. Daha sonra linea alba ensize edilerek bir kanül aracılığıyla periton delinmiştir. Sonrasında ensizyon hattı genişletilmiş ve genital organlara daha rahat ulaşabilmek için idrar kesesi yana çekilerek kornu uteriler ve bifurkasyo uterinin kolayca görülmesi sağlanmıştır. Kornulardan biri ovaryohisterektomi kancası ile dışarı alınıp, ligamentum suspensoryum ovari üzerine ligatür konulmuştur. Ovaryum ile ligatür arasına hemostatik pens yerleştirilmiştir. Ovaryum pediküline ensizyon yapıp ayırdıktan sonra, kanama olup olmadığı kontrol edilip kalan parça karın boşluğunun içine bırakılmıştır.

Ovaryumun alınmasından sonra, kornuyu asan ligamentum latum uteri diseke edilmiş ve sonrasında ayrılan kornu bifurkasyo uteriye doğru takip edilip diğer ovaryum tespit edilmiştir. Aynı işlem diğer ovaaryum için de uygulanmıştır. Her iki ovaryum ligatür edilip alındıktan sonra, korpus uteriye ulaşılmıştır. Her iki kornu uteri pelvise doğru çekilerek uterusun arter ve venlerinin görülmesi sağlandıktan sonra, arter ve venleri içine alacak şekilde ligatür uygulanmıştır. İlk ligaturün kraniyaline ikinci ligatür atılmıştır. Bu iki ligatür arasından ensizyon yapılmıştır. Daha sonra, peritonun ardından kas tabakası kapatılıp, deri altı bağ doku ve deri kapatılmıştır. Ovario-histerektomi yöntemiyle alınan ovaryumlar taşıma için kullanılan termostaki antibiyotik katkılı (Gentamisin Sülfat, 50 mg/ml) PBS solüsyonuna kanla temasını minimuma indirmek için iki uçtan ligatüre edilmiş ve termoslar içerisine konulmuştur.

3.3. Ovaryumların Labaratuvara Getirilmesi

Her bir dışiden çıkan bir çift ovaryumun bir tanesi antibiyotik katkılı (Gentamisin Sülfat, 50 mg/ml) PBS solüsyonunu içeren +4 °C derecede ki termos; diğeri ise antibiyotik katkılı (Gentamisin Sülfat, 50 mg/ml) PBS solüsyonunu içeren +38°C'deki taşıma kabına konmuştur. Beş dakika aralıklarla taşıma kaplarının sıcaklıkları ölçülmüş, şayet sıcaklıklarda bir değişim gözlenirse önceden hazırlanmış ısılarına uygun antibiyotik katkılı (Gentamisin Sülfat, 50 mg/ml) PBS solüsyonu ile sıcaklıkların korunması sağlanmıştır. Böylece, laboratuvara gidene kadar kapların

sıcaklıklarının sabit olması sağlanmıştır. Termos kapları en geç iki saat içerisinde laboratuvar ortamına götürülmüştür. Ovaryumlar maksimum 2 saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir.

3.4. Oositlerin Elde Edilmesi

Ovaryumlar çevrelerindeki fazla doku ve yağlardan arındırıldıktan sonra, üç kez +38°C'deki PBS ile yıkanmıştır. Oositler toplanana kadar +38°C'deki PBS içinde bekletildi. Ovaryum yüzeyinde görülen follüküller bir bistüri yardımıyla kesildi ve insülin iğnesi takılmış 10 ml'lik enjektördeki oosit yıkama medyumunu (Tablo-1) ile plastik petri kutuları içerisinde yıkandı. Stereo mikroskop (Nikon SMZ 1000) x10-20 büyütme altında en az 2 sıra kumulus hücresi tarafından sıkı bir şekilde sarılmış, uygun çapta ve vitellusları homojen ve koyu renkli görünen (vakuol, yer yer yoğunlaşma vb. farklılıklar olmayanlar) oositler (comulus oocyte complexes, COCs) seçildi.

3.5. İn Vitro Maturasyon

Maturasyon için dörtlü petri kapları (Nunc 176740) kullanılmıştır. Maturasyon için her bir kuyucukta 500 µl maturasyon medyumunu bulunan, üzeri mineral yağla kaplı ve en az 2 saat inkübatörde (HERA cell) bekletilen petriler önceden hazırlanmıştır. Elde edilen oositler üç kez oosit yıkama medyumundan geçirildikten sonra, bir kez de maturasyon medyumundan (Tablo 2) geçirilerek iyice yıkanmıştır. Çalışmada +4 ve +38°C taşıma sıcaklıkları için birer tanesi kontrol olmak üzere toplam 6 grup aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

+4°C taşıma sıcaklığı için

- 1. Grup (Kontrol):** TCM 199 + 2,2 gr/lit NaHCO₃ + 0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmolarite: 288 mOsmol),
- 2. Grup (BSA):** TCM199 + % 0,3 BSA (Fraction V, Sigma A8806) + 2,2 gr/lit NaHCO₃ + 0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmolarite: 288 mOsmol),
- 3. Grup(FCS):** TCM199 + %5 FCS (Fetal Calf Serum, Biochrom S 0115) + 2,2 gr/lit NaHCO₃ + 0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmolarite: 288 mOsmol)

+38°C taşıma sıcaklığı için

4. Grup (Kontrol): TCM 199 + 2,2 gr/lt NaHCO₃ + 0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmolarite: 288 mOsmol),

5. Grup (BSA): TCM199 + % 0,3 BSA (Fraction V, Sigma A8806) + 2,2 gr/lt NaHCO₃ + 0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmolarite: 288 mOsmol),

6. Grup (FCS): TCM199 + %5 FCS (Fetal Calf Serum Biochrom S 0115) + 2,2 gr/lt NaHCO₃ + 0,23 mM Na Pyruvate (pH: 7,3; Ozmolarite: 288 mOsmol)

Kazanılan oositler 6 farklı maturasyon medyumuna aktarılmıştır. Her bir kuyucuğa 30 oosit aktarılmıştır. Daha sonra, oositler Germinal Vezikül (GV) aşamasından MII aşamasına gelebilmesi için %5 CO₂ ve %100'e yakın nemin sağlandığı +38,5°C'lık inkübatör ortamında 72 saat süreyle in vitro maturasyona bırakılmıştır.

3.6. Maturasyon Sonrası Oositlerin Boyanması ve Değerlendirilmesi

Olgunlaşma süresinin sonunda oositlerin kumulus hücreleri vorteks kullanılarak mekanik olarak uzaklaştırılmıştır. Ardından % 0,7 lik KCl solüsyonunda 4-5 dakika bekletildikten sonra, lam-lamel arasında sıkıştırılarak sabitlenmiş ve sonrasında Hoechst 33258 solüsyonu ile boyanmıştır. Karanlık odada mikroskop altında oositlerin kromozom yapılarına göre maturasyon durumları incelenmiştir.

3.7. Sonuçların İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 23 programından yararlanılmıştır. Oositlerin değerlendirilmesinde ki kare testi kullanılmıştır. Çalışmada P<0,05 düzeyinin istatistiksel fark bakımından önemli olduğu kabul edilmiştir.

3.8. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

3.8.1. Taşımada kullanılan Phosphate Buffered Saline (PBS) solüsyonu

Tablo-1. Phosphate Buffered Saline (PBS) / 200 ml

Malzeme	Miktar
PBS tablet (Sigma P4417)	1 adet
Distile su	200 ml
Gentamisin	2 ml

3.8.2. Maturasyon medyumu

Maturasyon amacıyla TCM-199 medyumu kullanılmıştır. Öncelikle Tablo 2’de görülen TCM-199 stok medyum hazırlanmış, 0,22 µm çaplı filtreden geçirildikten sonra 2 ay süreyle buzdolabında muhafaza edilmiştir. Günlük kullanımda da Tablo 3’te görülen ilaveler yapılarak gruplara göre yıkama ve in vitro maturasyon amacıyla kullanılmıştır.

Tablo 2. TCM-199 Stok Solüsyonu Hazırlanması

Malzeme	Miktar
TCM-199 Sigma M5017	950 mg
NaHCO ₃	220 mg
Distile Su	100 ml

Tablo 3. Maturasyon Medyumu

Malzeme	Miktar/Grup 1 ve 4	Miktar/Grup 2 ve 5	Miktar/Grup 3 ve 6
TCM-199 Stok	10 ml	10 ml	9,5 ml
Na pyruvate	3,3 mg	3,3 mg	3,3 mg
Gentamisin	5,5 mg	5,5 mg	5,5 mg
BSA	-	300 mg	-
FCS	-	-	0,5 ml

3.8.3. Hoechst Boyasının Hazırlanması ve Kullanımı

Boyanın hazırlanmasında proteinden ari HSOF medyumu kullanılmıştır. Medyumun formülasyonu Tablo 4’te verilmiştir. Daha sonra hazırlanan solüsyon kullanılarak 1 mg/ml olacak biçimde sulandırılarak Hoechst boyası karanlıkta hazırlanmış ve filtre edilmiştir. Hazırlanan boya 5 µl’lik miktarlara bölünerek uygun tüpler içerisinde -20°C’de 3 ay saklanıp bu süreçte kullanılmıştır. 5 µl Hoechst üzerine 995 µl CB’li HSOF konularak boyamada kullanılmıştır.

Tablo 4. HSOF Medyumunun Hazırlanması

Malzeme	Miktar
NaCl	629,4mg
KCL	53,4 mg
NaH ₂ PO ₄	5,4mg
Na HEPES	274 mg
Herpes (free acid)	252 mg
NaHCO ₃	33,6 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	40,32 mg
MgCl ₂ 6H ₂ O	10 mg
Glukoz	43,2 mg
Penisilin G	7,5 mg
Streptomisin sülfat	5 mg
Kanamisin	7,6 mg
Na pirüvat	3,6 mg
Glutamin	14,6 mg
Fenol red	yaklaşık 1 mg (biraz renk verse yeter)
Na laktat	47 µl
Embriyo tested su	100 ml

0,22 µm çaplı filtre ile filtre edilir. pH 7,2- 7,4 Ozmolarite: 283 ±10 Osm/kg

Tablo 5. Oosit Yıkama Solüsyonu

Milli Q-water	500 ml
TCM 199	4950 mg
Na HEPES	1365 mg
HEPES	1260mg
Na ₂ HCO ₃	168 mg
Kanamisin	38 mg
Heparin	5mg
pH: 7,2-7,4	Ozmolarite: 283±10 mosmol

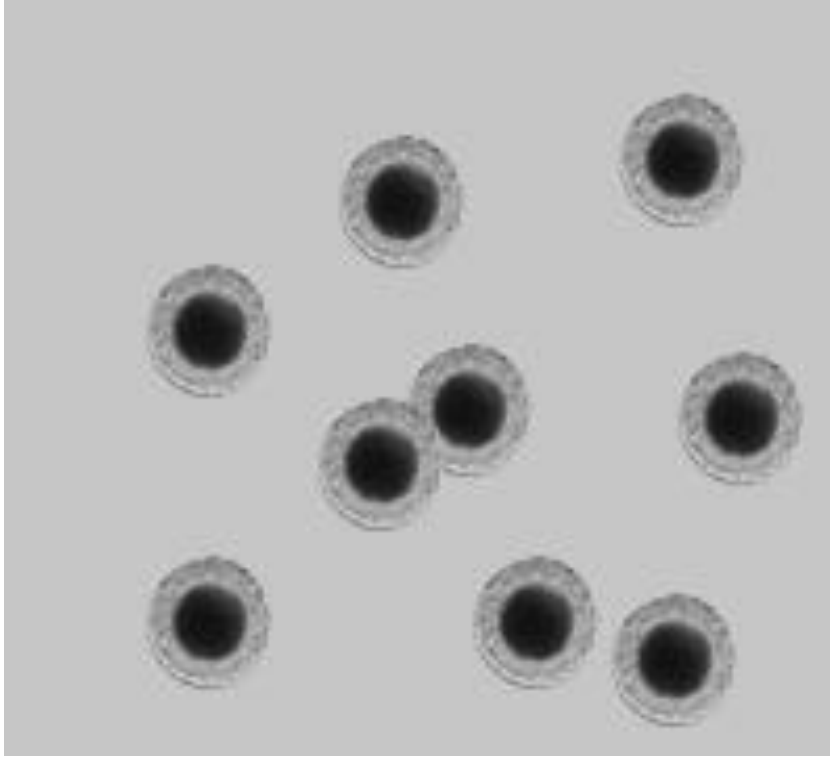
4.BULGULAR

Çalışma boyunca 11 kez tekrarlanan deneysel süreçlerde 20 adet dişi köpekten, toplam 1721 adet oosit toplanmıştır. Mikroskop altında yapılan değerlendirme sonucu uygun bulunan Germinal Vezikül aşamasındaki (Şekil 1-2) 1224 oositin olgunlaştırıldığı +4°C ve +38°C daki gruplarda, Germinal Vezikül Break Down (Şekil 3), Metafaz I (Şekil 4), Metafaz II (Şekil 5), tanımlanamayan nükleer yapı (Undetermined Nuclear Materyal: UDNM) ve dejenere oosit sayı ve oranları Tablo 6'da verilmiştir.

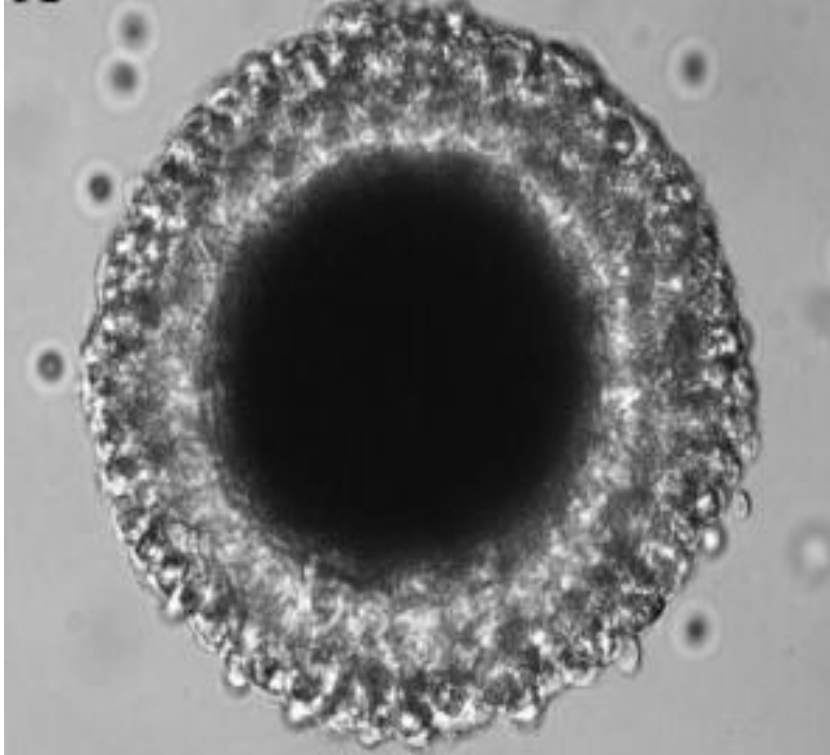
Oosit grupları arasında +4°C ve +38°C taşıma sıcaklığındaki ve TCM 199 , %0,3 BSA , %5 FCS protein eklenen gruplarda GV, GVBD, MI, UDMN ve dejenere aşamasına ulaşan oosit sayılarının arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Mayotik sürece giren MII aşamasına ulaşmış +4°C taşıma sıcaklığındaki %0,3 BSA proteini eklenen grupta Grup 5, Grup 2 ve Grup 6 hariç diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo-6. Köpek Oositlerinin 72 Saatlik In Vitro Olgunlaştırma Sonrası Ulaştıkları Gelişim Safhaları ve Oranları

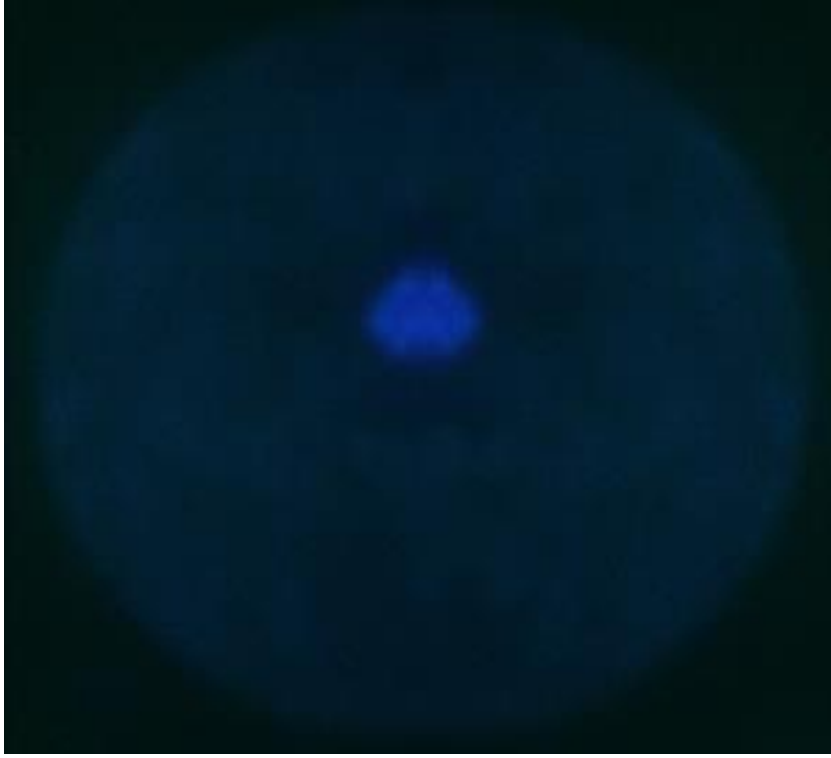
	GRUPLAR	GV	GVBD	MI	MII	UDMN	DEJ.
+38°C	Grup 1 (kontrol) TCM 199 (n=211)	128 (%60,66) ^a	16 (%7,58) ^a	1 (%0,47) ^a	0 (%0,0) ^a	26 (%12,32) ^a	40 (%18,95) ^a
	Grup 2 TCM 199 + %0.3 BSA (n=200)	123 (%61,5) ^a	13 (%6,5) ^a	4 (%2,0) ^a	4 (%2,00) ^{ab}	23 (%11,5) ^a	33 (%16,5) ^a
	Grup 3 TCM 199 + %5 FCS (n=201)	120 (%59,70) ^a	17 (%8,45) ^a	4 (%1,99) ^a	2 (%0,99) ^a	15 (%7,46) ^a	43 (%21,39) ^a
+4°C	Grup 4 (kontrol) TCM 199 (n= 211)	125 (%59,24) ^a	17 (%8,05) ^a	4 (%1,89) ^a	0 (%0) ^a	27 (%12,79) ^a	38 (%18,00) ^a
	Grup 5 TCM 199 + %0.3 BSA (n= 200)	118 (%59,00) ^a	17 (%8,5) ^a	8 (%4,0) ^a	9 (%4,5) ^b	17 (%8,5) ^a	31 (%15,5) ^a
	Grup 6 TCM 199 + %5 FCS (n=201)	122 (%60,69) ^a	12 (%5,97) ^a	6 (%2,98) ^a	4 (%1,99) ^{ab}	17 (%8,45) ^a	40 (%19,90) ^a



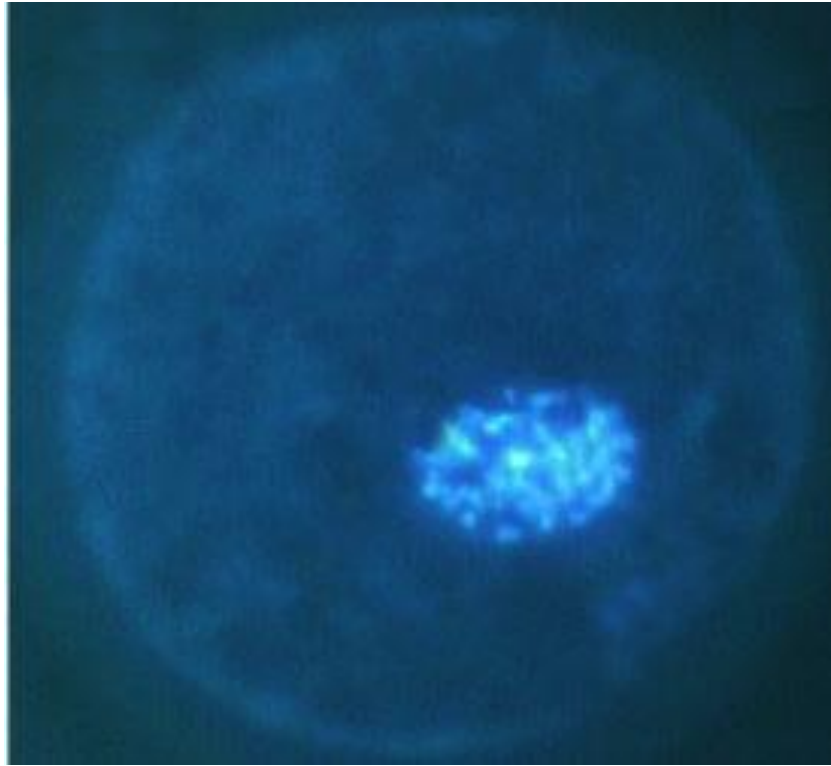
Şekil 1. Olgunlaştırmaya Alınmak Üzere Seçilen Primer oositler



Şekil 2. Primer oosit



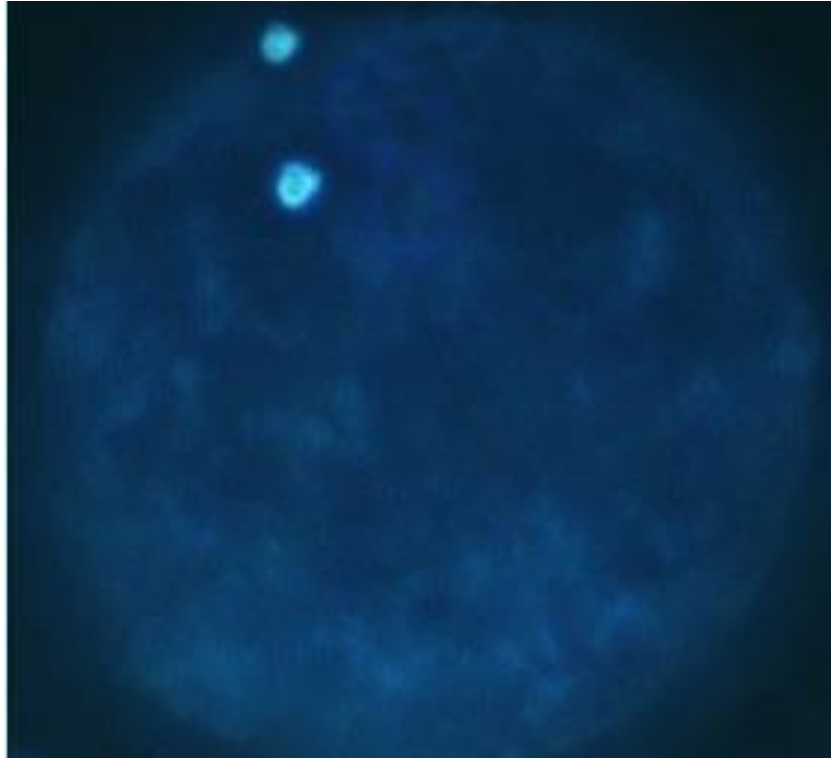
Şekil 3. Germinal Vezikül (GV) Aşamasındaki Oosit



Şekil 4. Germinal Vezikül Break Down (GVBD) Aşamasındaki Oosit



Şekil 4. Metafaz I (MI) Aşamasındaki Oosit



Şekil 5. Metafaz II (MII) Aşamasındaki Oosit

5.TARTIŞMA

Çalışmada iki farklı protein kaynağının (BSA ve FCS) ve iki farklı ovaryum taşıma sıcaklığının (+4°C ve 38°C) köpek oositlerinin in vitro maturasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan literatür taramasında köpek oositlerinin in vitro maturasyon üzerinde farklı taşıma sıcaklık (+4 ve 38°C) ve protein (BSA ve FCS) takviyelerinin birlikte karşılaştırıldığı çalışma bulunmamaktadır. Çalışma sonucunda, %0,3 oranında BSA ile takviye edilip +4°C’de taşıma sıcaklığının uygulandığı çalışma grubunda köpek oositlerinin in vitro maturasyonunun diğer gruplardan daha iyi olduğu bulunmuştur.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda medyumun içerisine protein kaynaklarının katılmasına ilişkin tutarsız sonuçlar bildirilmiştir (Bolamba ve ark., 2002; Hewitt ve ark., 1998; Hu ve ark., 2020; Lopes ve ark., 2011; Rodrigues ve Rodrigues, 2003; Songsasen ve ark., 2002;). Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların aksine SOF medyumunu içerisinde in vitro mature edilen köpek oositlerinin nükleer maturasyonu için protein takviyesinin gerekmediği bildirilmiştir (Bolamba ve ark., 2002). Benzer biçimde proteinden arı maturasyon ortamında daha yüksek oranda MII aşamasına ulaşan oositlerin bildirildiği çalışmalarda bulunmaktadır (Songsasen ve ark., 2002; Songsasen ve ark. 2003; Songsasen ve Wildt 2005).

Yapılan bir çalışmada TCM-199 medyumuna ilave edilen %0,3 BSA ile %10-20 FCS’nin köpek oositlerinin in vitro maturasyonunda ideal sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Hewitt ve ark., 1998). Sunulan çalışmada BSA %0,3 ve FCS %5 oranında TCM-199 medyumunu içerisine katılmıştır. MII aşamasına ulaşan oosit oranı bakımından en iyi sonuçlar sırasıyla %0,3 oranında BSA katılan, +4°C (%4,5) ve 38°C (%2) sıcaklıklarda taşınan ovaryumlardan elde edilen oositlerden elde edilmiştir. MII aşamasına ulaşan oosit oranı bakımından ikinci derece iyi sonuçlar ise sırasıyla, %5 oranında FCS katılan, +4°C (%1,99) ve 38°C (%0,99) sıcaklıklarda taşınan ovaryumlardan elde edilen oositlerden elde edilmiştir. Protein ilavesi yapılmayan kontrol gruplarında ise MII aşamasına hiçbir oosit ulaşamamıştır. Sunulan çalışma bu yönüyle protein kaynağı olarak kullanılan BSA ve FCS’nin köpek oositlerinin in vitro

maturasyonunu olumlu yönde etkilediğini göstermiştir ve Hewitt ve ark.'nın (1998) bildirdiği çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Günümüze değin yapılan çalışmalarda köpek oositlerinin in vitro maturasyon ortamına sığır ya da köpekten elde edilen serumların eklenmesini yaygın bir şekilde kullanıldığı görülmektedir. Ancak, yapılan bu çalışmalarda yüksek oranda tanımlanamayan nükleer yapıya sahip oositler elde edildiği bildirilmiştir. Serum kanın pıhtılaşması sonucu oluşmakta ve bu oluşum sürecinde oositler üzerinde zararlı etkilere neden olabilecek kimyasal bazı değişimler meydana gelebilmektedir (Lopes ve ark., 2011). Sığırlarda yapılan bir çalışmada erken embriyonik gelişim safhasında serumda bulunan tanımlanmamış faktörlerin apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (Lopes ve ark., 2011). Bu nedenle serumun ısıyla inaktivite edilmiş plazma ile değiştirilmesinin köpek oositlerinin in vitro maturasyonundan daha iyi sonuçlar alınmasına neden olacağı ileri sürülmüştür. Ancak, Lopes ve ark.'nın (2011) yaptığı çalışmada plazma kullanılan grupta oositlerin %60'ından daha fazlasında tanımlanamayan nükleer yapı ile karşılaşmıştır. Bunun aksine, %0,3 BSA ilavesinin kullanılması durumunda ise tanımlanamayan nükleer materyal oranının oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (Lopes ve ark., 2011). Yukarıda sözü edilen makaledeki sonucu destekleyen diğer çalışmalarda mevcuttur (Hewitt ve ark., 1998; Rodrigues ve Rodrigues, 2003). Bizim çalışmamızda ise, tanımlanamayan nükleer yapıya sahip oosit oranları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Özellikle %0,3 BSA katılan +4°C grubundan elde edilen %8,5'lik orana karşın +38°C grubundan elde edilen %11,5'lik orandan daha düşük olmasına rağmen, yukarıda belirtilen çalışma sonuçları ile çelişmektedir.

Yapılan bir çalışmada standart 100 ng/ml epidermal büyüme faktörü (EGF) takviyesine ilaveten %10 FCS ve %0,4 BSA ile de takviye edilen iki farklı in vitro maturasyon grubundan BSA ilave edilen gruptan elde ettikleri MII oosit oranı (%18,5) FCS grubundan elde edilen MII oosit oranından (%7,1) daha yüksek bulunmuştur (Cui ve ark., 2006). Sunulan çalışmada tüm gruplardan elde edilen MII aşamasındaki oosit yüzdesinin bildirilen bu oranlardan daha düşük olduğu bulunmuştur. Sözü edilen çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak kullanılan EGF'ün bu farklılığın oluşmasında rol oynamış olabileceği düşünülmektedir.

SOF ve TCM-199 medyumlarının köpek oositlerinin in vitro maturasyonunda kullanıldığı bir çalışmada, her iki grup içinde %10 FCS ve 3 mg/ml BSA ilaveleri yapılmış ve sonuç olarak MI aşamasından MII aşamasına geçişte yaşanan gelişimsel bloğun serum ya da albümin takviyeleri ile aşılamadığı bildirilmiştir (Enginler ve ark., 2014). Sunulan çalışmada MII aşamasına geçiş söz konusu olsa da elde edilen MII oosit oranı düşük bulunmuştur.

Taşıma sıcaklığı 38,5°C olan oositlerde bizim çalışmamıza benzer oranlarda protein takviyesi yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlar bizim çalışmada elde ettiğimiz sonuçlardan genel anlamda daha yüksek bulunmuş olsa da, çalışma sonucunda varılan %0,3 BSA takviyesinin %5 FCS takviyesinden daha etkin olduğu bildirilmiştir (Evecen ve ark., 2002). Sunulan çalışmanın 38,5°C taşıma sıcaklığı grubunda istatistiksel anlamda fark bulunmasa da %0,3'lük BSA takviyesinin MII aşamasına ulaşan oosit oranı bakımından %5 FCS takviyesinden daha etkin bulunmuştur.

Özellikle uzak mesafelerden ovaryumların taşınmasının söz konusu olduğu durumlarda normal fizyolojik sınırlar içerisinde taşınan ovaryumlarda devam eden metabolik faaliyetler sonucunda ortaya çıkan metabolik atıklar sonucu ovaryum içerisindeki oositler olumsuz etkilenebilmektedir. Bu durumun önüne geçilmesi amacıyla sığırlarda ve koyunlarda (Bohlooli ve ark., 2015; Özdaş ve ark., 2005), domuzlarda (Wongsrikeao ve ark., 2005), kedilerde (Wlodarczyk ve ark., 2009; Evecen ve ark., 2018) ve köpeklerde (Evecen ve ark., 2010; Taş ve ark., 2006) ovaryumların daha düşük sıcaklıklarda (genellikle +4°C) taşınmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Sığırlar için +4 ve +32°C sıcaklıkların her ikisinin de ovaryumların taşınması amacıyla kullanılabileceği bildirilirken, aynı çalışmada koyunlar için +4°C taşıma sıcaklığının uygun olmadığı bildirilmiştir (Özdaş ve ark., 2005) Sığırlarda yapılan diğer bir çalışmada ise serum fizyolojik ve PBS ile Hepes içeren KSOM, CZB ve CR1 kültür medyumları içerisinde +4, +25 ve +38°C taşıma sıcaklıklarında taşınan ovaryumlardan kazanılan oositlerin in vitro maturasyon ve bölünme oranlarının +4°C'de Hepes içeren KSOM, CZB ve CR1 kültür medyumlarında aynı medyumlarda +38°C taşınanlara göre daha yüksek bulunduğu bildirilmiş ve taşıma sıcaklığı olarak

+4°C ve yukarıda anılan kültür medyumlarının kullanılabilceği önerilmiştir (Bohlooli ve ark., 2015).

Domuzlarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre +4°C derece taşıma sıcaklığının domuz oositlerinin maturasyon ve sonrasındaki gelişimleri için uygun olmadığı ortaya konmuştur (Yang ve ark., 2010; Wongsrikeao ve ark., 2005). Bu duruma neden olarak, domuz oositlerinin diğer türlere kıyasla daha fazla yağ içeriğine sahip olması ve hücre mebran yapısının neden olduğu belirlenmiştir (McEvoy ve ark., 2000).

Kedilerde yapılan çalışmalarda ise +4°C taşıma sıcaklığının etkin şekilde kullanılabilceği, ancak sürecin uzaması durumunda oositlerin in vitro maturasyon ve gelişim oranlarının olumsuz etkilendiği bildirilmiştir. +4°C'deki kritik sürecin 6. saatten sonra başladığı rapor edilmiştir (Wolfe ve Wildt, 1996; Wlodarczyk ve ark., 2009; Evecen ve ark., 2018).

Karnivor oositleri in vitro koşullardan kolayca etkilenebilmektedir (Roodrigues ve Rodrigues,2003b; Songsasen ve ark. 2002). Ovaryumların taşınma süresi, saklama sıcaklığı ve özellikle ovaryumların taşınmasında kullanılan solüsyonun sıcaklığı köpek oositlerinin in vitro maturasyonunu etkileyen önemli faktörlerdir. Memeli ovaryumlarının vücut ısısına (yaklaşık 38°C) yakın derecelerde 6 saatlik bir süreçten daha fazla tutulması hücresel otolizin oluşmasına neden olmaktadır (Evecen ve ark., 2010; Holt ve Picard, 1999). Otolizin başlaması sonucunda oositlerin in vitro maturasyon ve in vitro fertilizasyondan sonra embriyonik gelişim oranlarında düşüşler yaşandığı bildirilmiştir (Nakao ve Nakatsuji, 1992). Buna rağmen, memeli oositleri soğuğa ve dondurma işlemine karşı çok duyarlıdır (Massip ve Leibo, 2002; Smitz ve ark., 2004).

Oositlerin soğuğa maruz bırakılması oositler içerisinde yer alan nükleer yapılardaki iđ iplikçiklerinde geri dönüşü olmayan bozulmalara neden olabilmektedir (Smitz ve ark., 2004; Woods ve ark., 2004). Ancak, oositi kuşatan intrafoliküler ortamın oositi soğuğun zararlı etkilerine karşı koruduğu değerlendirilmektedir (Matsushita ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda +4°C'de taşınan ve muhafaza edilen

keci oositlerinin başarıyla in vitro mature oldukları bildirilmiştir (Evecen ve ark., 2018; Wolfe ve Wildt, 1996; Wlodarczyk ve ark., 2009).

Oosit proteinleri, mitojenle aktifleşen protein kinaz, cdc-2 kinaz ve maturasyonu teşvik edici faktör (maturation promoting factor, MPF), oositlerin maturasyonunda rol oynayan önemli faktörlerdir. Bu tür spesifik proteinlerin düzeyleri farklıdır. Hücre metabolizması vücut ısısından daha düşük sıcaklıklarda yavaşlar ve bu tür spesifik proteinlerin aktiviteleri baskılanır (Smitz ve ark., 2004). Aktiviteleri baskılanan bu proteinler uygun şartların sağlandığı ortama aktarıldığında tekrar aktive olurlar. Bu durum +4°C’de taşıma sonucu elde edilen başarılı sonuçların açıklanması bakımından önemlidir. GV aşamasındaki oositlerde mevcut olan MPF’ün soğuğa maruz bırakılması durumunda büyük ölçüde olumsuz etkilenmemesinden ya da MPF metabolizmasının geri dönüşür biçimde yavaşlaması veya durmasından dolayı bu duruma neden olabileceği önerilmiştir (Taş ve ark., 2006)

Sunulan çalışmada protein içermeyen 2 farklı sıcaklıktaki kontrol guruplarında hiçbir oositin MII aşamasına gelememiş olması köpek oositlerinin in vitro ortamda mayotik olgunlaşma için protein kaynağına ihtiyaç duyduklarını bildiren araştırma sonuçlarıyla örtüşmektedir (Hewitt ve England 1997; Robertson ve ark.1992).

Germinal Vezikül (GV) aşamasındaki oosit oranlarının istatistiksel karşılaştırılmasında, +4°C ve 38°C’deki BSA ve FCS grupları arasında fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu çalışmada elde edilen GV aşamasındaki oositlerin oranları %59,0-61,5 arasında bulunmuştur ve bu oranların Evecen ve ark.’nın (2002) buldukları %48,54’lük, Cui ve ark.’nın (2006) %59,7’lik, Hatoya ve ark.’nın (2009) %50’lik ve Rodrigues ve ark.’nın (2003) %49’luk oranlarıyla benzer; Saikhun ve ark.’nın (2008) %25,6’lık, De Los Reyes ve ark.’nın (2013) %26’lık, Salavali ve ark.’nın (2013) %14,7’lik, Lee ve ark.’nın (2007) %15’lik oranlarından yüksek; Fuji ve ark.’nın (2000) buldukları %96’lık oranın altında olduğu saptanmıştır.

Germinal Vezikül Break Down (GVBD) aşamasındaki oosit oranlarının istatistiksel karşılaştırılmasında, +4°C ve 38°C’deki BSA ve FCS grupları arasında fark görülmemiştir ($p>0,05$). Bu çalışmada elde edilen GVBD aşamasındaki oositlerin oranları %5,97-8,50 arasında bulunmuştur ve bu oranların Evecen ve ark.’nın (2002) buldukları %14,14’lük ve De Los Reyes ve ark.’nın (2013) buldukları %10’luk oranlar

ile benzer; Fuji ve ark.'nın (2000) buldukları %47'lik, Cui ve ark.'nın (2006) %40,3'lük, Saikhun ve ark.'nın (2008) %38,6'lık, Hatoya ve ark.'nın (2009) %39,5'lik, Salavali ve ark.'nın (2013) %24,8'lik, Lee ve ark.'nın (2007) %29'luk ve Rodrigues ve ark.'nın (2003) %27'lik oranlarının altında olduğu saptanmıştır.

Metafaz I (MI) aşamasındaki oosit oranlarının istatistiksel karşılaştırılmasında, +4°C ve 38°C'deki BSA ve FCS grupları arasında fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Bu çalışmada elde edilen MI aşamasındaki oositlerin oranları %0,47-4,0 arasında bulunmuştur ve bu oranların Evecen ve ark.'nın (2002) buldukları %16,43'lük, Fuji ve ark.'nın (2000) buldukları %11'lik, Cui ve ark.'nın (2006) %40,3'lük, Saikhun ve ark.'nın (2008) %38,4'lük, De Los Reyes ve ark., (2013) %37'lik ve Rodrigues ve ark.'nın (2003) %12'lik oranlarının altında; Hatoya ve ark.'nın (2009) %8,4'lük, Salavali ve ark.'nın (2013) %9,1'lik ve Lee ve ark.'nın (2007) %8'lik oranlarına yakın olduğu saptanmıştır.

Metafaz II (M II) aşamasındaki oosit oranlarının istatistiksel karşılaştırılmasında, en iyi sonucun alındığı (%4,5) +4°C'deki BSA grubu ile her iki sıcaklıktaki kontrol grupları ve 38°C'deki FCS grubu arasında istatistiksel fark bulunurken ($p<0,05$), +4°C'deki FCS ve 38°C'deki BSA gruplarıyla arasında istatistiksel fark bulunmamıştır ($p<0,05$). Bu çalışmada elde edilen MII aşamasındaki oositlerin oranları %0,0-4,5 arasında bulunmuştur ve bu oranların Hatoya ve ark.'nın (2009) %2,4'lük, , Cui ve ark.'nın (2006) %1,9-3,7'lik, Salavali ve ark.'nın (2013) %4,4'lük ve Lee ve ark.'nın (2007) %3'lük oranlarıyla benzer; Evecen ve ark.'nın (2002) buldukları %9,39'luk, Fuji ve ark.'nın (2000) buldukları %11'lik, Saikhun ve ark.'nın (2008) %18,6'lık, De Los Reyes ve ark.'nın (2013) %16'lık ve Rodrigues ve ark.'nın (2003) %10'luk oranlarından daha düşük olduğu saptanmıştır.

Çalışmalardan elde edilen sonuçların tutarsız çıkmasına birçok etkenin etki edebileceği değerlendirilmektedir. Bunların başında oositlerin elde edildiği köpeğin yaşı, ırkı, üreme siklusunun hangi döneminde olduğu ve ovaryumdaki foliküllerin büyüklüğü in vitro maturasyon oranlarını önemli ölçüde etkilemektedir (Songsasen ve Wildt, 2007). Sunulan çalışmada, yukarıda sıralanan faktörler tam anlamı ile kontrol altında olmadığından, elde edilen sonuçların yukarıda karşılaştırılan çalışma sonuçlarından farklı olmasında etken olabileceği değerlendirilmektedir. Kullanılan in

in vitro maturasyon medyumları ve kültür süreci de farklı sonuçların alınmasında rol oynamaktadır (Kim ve ark., 2004; Reynaud ve ark., 2005; Rota ve Cagianca, 2004; Songsasen ve Wildt, 2007). Sunulan çalışma ile karşılaştırılan çalışmalar arasındaki bahse konu etkenler arasında farklılıklar farklı sonuçların alınmasında etken olmuş olabilir. Medyuma katılan protein kaynakları da karşı görüşlerin bulunmasına rağmen, in vitro maturasyonu sonuçlarını etkileyebilecek bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Songsasen ve Wildt, 2007). Ayrıca, bazı çalışmalarda kullanılan gonadotropik hormonların durumu da tartışmalıdır (Songsasen ve Wildt, 2007). Sunulan çalışmada gonadotropik hormonların kullanılmaması da, kullanılan çalışmalarla karşılaştırıldığında farklı sonuçların alınmasında rol oynamış olabilir.

Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda, köpek oositlerinin in vitro maturasyon çalışmalarında medyumlara protein kaynaklarının katılmasının gerekli olduğu; maturasyonu destekleyici protein kaynağı olarak % 0,3 BSA'nın, %5 FCS'a göre ve +4°C'deki taşıma sıcaklığının +38°C'dekinden daha etkili olduğu kanısına varılmıştır.

Köpeklerde diğer türlerden farklı olan esas unsur, oositlerin mature olmadan ovule olması ve maturasyonu yumurtalıktaki foliküllerin dışında tamamlamasıdır. Dolayısıyla, diğer türlerde kullanılan rutin protokollerden farklı protokollerin geliştirilmesi gereği bulunmaktadır. Bu nedenle köpek oositlerinin in vitro maturasyonu ve fertilizasyonu ile ilgili daha inovatif çalışmaların yapılması, başarılı sonuçların alınması bakımından büyük önem taşımaktadır.

6.KAYNAKLAR

- Andersen AC, Simpson ME (1973) The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). Geron-X Inc. Los Altos, USA.
- Aspinall V, O'Reilly M (2005) Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology. China: Elsevier Limited.
- Aydın İ, Sur E, Ozaydın T, Dinc DA (2011) Determination of the stages of the sexual cycle of the bitch by direct examination. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 15: 1962-1927.
- Badinand F, Fontbonne A, Maurel MC, Siliart B(1993) Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. *Journal of reproduction and fertility* 47: 63–67.
- Barber MR, Lee SM, Steffens WL (2001) Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology* 55: 1705–1717.
- Birler S, Pabuccuoglu S, Alkan S (1999) Effects of serum and hormone additions to maturation media and co-culture with sheep oviductal epithelial cells (SOEC) on in vitro fertilization of sheep oocytes. *Journal of reproduction and fertility*, 23 (abs): 21.
- Birler S, Pabuççuoğlu, S, Ak K, (1999) Effects of serum and hormone additions to maturation medium on in vitro maturation of sheep oocytes. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 25: 75-79.
- Blackmore DG, Baillie LR, Holt JE (2004) Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction* 71: 661–668.
- Bohlooli SH, Bozoğlu Ş, Cedden F, (2015) Heps buffer in ovary-transportation medium influences developmental competence of cattle oocytes. *South African Journal of Animal Science*. 45: 5

- Bolamba D, Borden-Russ KD, Durrant BS (1998) In 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) In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicle in synthetic oviduct fluid medium. *Theriogenology* 58: 1689-1703.
- Cetica P, Pintos L, Dalvit G, et al (2002) Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction* 124: 675-681.
- Christensen GC (1965) Urogenital system and mammary glands. In: Miller ME. (Editor). *Anatomy of the Dog*. Philadelphia: WB Saunders Company pp: 741-807.
- Cinone M, Ghneim A, Caira M et al (1992) Collection and maturation of oocytes in the bitch. *The 12th International Congress in Animal Reproduction* pp.1767–1769.
- Concannon PW (2011) Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science* 124: 200-210.
- Concannon PW, McCann JP, Temple M (1989) Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy, and parturition in the dog. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement 39: 3–25.
- Correa JE (2008) *Cannine Breeding and Reproduction*. Alabama A&M University. UNP-0052.
- Cui XS, Jin YX, Shen XH et al (2006) Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. *Theriogenology* 66: 267-274.
- Davidson A (2006) Current concepts on infertility in the bitch. *Waltham Focus* 16: 13-21.
- Davidson A, Baker T (2009) *Veterinary Healthcare*. Controversies in ovulation timing proceeding; CVC in Baltimore proceedings.

- De los Reyes M, Rojas C, Parraguez VH et al (2013) Expression of growth differentiation factor9 (GDF-9) during in vitro maturation in canine oocytes. *Theriogenology* 80 587-596.
- Dedieu T, Gall L, Crozet N, Sevellec C et al (1996) Mitogen activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and acquisition of meiotic competence. *Molecular Reproduction and Development* 45: 351–358.
- Durrant BS, Pratt NC, Russ KD (1998) Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* 49:917–93
- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG (1987) *Textbook of Veterinary anatomy*. Philadelphia: WB Saunders Company.
- Edens MSD, Heath AM (2003) Breeding Management in the bitch and Queen. In: Kustritz MVR (Editör). *Small Animal Theriogenology (The Practical Veterinarian)*. USA: Elsevier Science pp: 33-60.
- Enginler SÖ, Sandal AI, Özdaş ÖB et al (2014) The effect of oviductal cells on in vitro maturation of canine oocytes in different culture media. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 38: 14-19.
- England GCW (1988) *Allen's Fertility and Obstetrics in the Dog*. 2 nd. Edition. Oxford: Blackwell Science
- England GCW, Allen WE (1989) Real-time ultrasonic imaging of the ovary and uterus of the dog. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement 39: 91–100.
- Evecen M, Baran A, Alkan S ve ark (2002) Köpek Oositlerinin in vitro Olgunlaşmasına BSA ve FCS'nin Etkileri. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* pp: 1453-1458.
- Evecen M, Cirit Ü, Demir K, et al (2010) Effects of estrous cycle stage and transport temperature of ovaries on in vitro maturation of canine oocytes. *Animal Reproduction Science* 117:160-165.

- Evecen M, Demir K, Arıcı R, et al (2018) Effects of ovary transport and storage temperature on in vitro maturation and cumulus cell apoptosis rates in cat oocytes. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 24: 301-306.
- Farstad W (2000) Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53:175–86.
- Farstad W (2000) Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Animal Reproduction Science* 60-61: 375–387.
- Farstad W, Mondain-Monval M, Hyttel P (1989) Periovarian endocrinology and oocyte maturation in unmated mature blue fox vixens. *Acta Veterinaria Scandinavica* 30: 313–319.
- Feldman EC, Nelson RW (2004) *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3rd. Edition. Missouri: Elsevier Science Saunders Company.
- Fissore RA, He CL, Woude GFV (1996) Potential role of mitogen activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 55: 1261–1270.
- Fujii M, Otoi T, Murakami M (2000) The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *Journal of Veterinary Medical Science* 62: 305-307.
- Gilchrist RB, Nayudu PL., Nowshari MA et al (1995) Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biology of Reproduction* 52: 1234 - 1243.
- Goodrowe KL, Walker SL, Ryckman DP (2000) Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. *Animal Reproduction Science* 60-61: 389-403.
- Gordon I (1994) *Laboratory Production of Cattle Embryos*. CAB International, Oxfordshire, United Kingdom.
- Gotwals S (2000) Timing the fertile Period of the Bitch. *Canine Reproduction Semina*. University of Florida pp: 00-3.

- Gupta PSP, Ravindra JP, Girish- Kumar V et al (2005) Stimulation of in vitro oocyte maturation with a novel peptide isolated from follicular fluid of the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Small Ruminant Research*, 59: 33-40.
- Haenisch A, Kolle S, Neumuller C, et al (2003) Morphology of canine cumulus–oocyte complexes in pre-pubertal bitches. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 32: 373–377.
- Hafez ESE (1987) Embryo Transfer, IVF and Genetic Engineering. *Reproduction in Farm Animals*. Lea and Febiger, 535-538.
- Haşegan I, Şonea A, Matei M et al (2012) Current Relevant Knowledge on Dog Reproductive Physiology –A Review. *Anim Sci Biotechnol* 45: 172-180.
- Hatoya S, Sugiyama Y, Nishida H et al (2009) Canine oocyte maturation in culture: Significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. *Theriogenology* 71: 560-567.
- Hay MA (1996) Canine gametes evaluation of oocyte maturation and penetrating potential of spermatozoa pre-freeze and post-thaw. Thesis. The Faculty of Graduate Studies, University of Guelph
- Health K (2008) Canine Estrous Cycle. *Canine Breeder’s Symposium*. Albuquerque, New Mexico: Society for Theriogenology and the American Kennel Club Canine Society for Theriogenology and the American Kennel Club Canine Health Foundation.
- Hewitt D.A, England GCW (1998) The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology* 49: 957-966.
- Hewitt DA, England GCW (1998a) The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology* 49: 957–966.
- Hewitt DA, England GCW (1997) Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *Journal of reproduction and fertility* 51: 83–91.

- Hewitt DA, England GCW (1997) The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Animal Reproduction Science* 50: 123-139.
- Hewitt DA, England GCW (1999a) Influence of gonadotrophin supplementation on the in vitro maturation of bitch oocytes. *Veterinary Record* 144: 237–239.
- Hewitt DA, England GCW (1999b) Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. *Animal Reproduction Science* 55: 63-75.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E (1994) *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 38-39.
- Hogan B, Constantini F, Lacy E (1986) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory pp:332
- Holst PA, Phemister RD (1971) The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biology of Reproduction* 5: 194–206.
- Holt WV, Picard AR, (1999) Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews of Reproduction* 4: 143– 150.
- Hu M, Du Z, Zhou Z et al (2020) Effects of serum and follicular fluid on the in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 143: 10-17
- Hutchison RV (2001) Maximizing Conception rate for Breeders. *Canine Reproduction. Proceedings from a Symposium Presented to Breeders, Handlers and Trainers* pp: 8-12.
- Jeffcoate I (2004) Physiology and endocrinology of the bitch. In: Simpson: G. (Editor). *Manual of small Animal Reproduction and Neonatology*. UK: Dorset, BSAVA
- Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE (1991) Rescue and maturation in vitro of follicular oocytes collected from non domestic felid species. *Biology of Reproduction* 45: 898 - 906.
- Johnston, SD, Kustriz MVR, Olson PNS (2001) *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders

- Kalab P, Farstad W, Krogenaes A (1997) MAP kinase activation and RAF-1 synthesis in blue fox oocytes is controlled by cumulus granulosa cells. *Theriogenology* 47: 400 (Abstract).
- Kalkan C, Horoz H (2007) Pubertas ve seksüel sikluslar. Alaçam E (Editor). *Evcil Hayvanlarda doğum ve İnfertilite*. Ankara: Medisan Yayın Evi sf:33-40.
- Katska-Ksiazkiewicz L, Ooiela J, Rynska B (2007) Effects of oocytes quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastosyst production in goats. *Theriogenology*, 68: 736-744.
- Kawakami E, Kashiwagi C, Hori T, Tsutsui T (2001) Effects of canine oviduct cells on movement and capacitation of homologous spermatozoa in vitro. *Animal Reproduction Science* 68: 121–131.
- Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ et al (2004) Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on in vitro maturation of canine oocyte collected from dogs with different stage of the estrus cycle. *Journal of Veterinary Medical Science* 5: 253–258.
- Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, et al (2005) Effects of estradiol-17 β and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63: 1342–1353.
- Kim NH, Chung HM, Cha KY et al (1996) Microtubule and microfilament organisation in maturing human oocytes. *Hum. Reprod.* 13, 2217–2222.
- Krisher RL (2004) The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82: 14-23.
- Kustritz MVR (2012) Managing the reproductive cycle in the bitch. *Vet Clin N Am-Small* 42: 423-437.
- Lee HS, Yin XJ, Kong IK (2006) Sensitivity of canine oocytes to low temperature. *Theriogenology* 6:1468–1470.
- Lee SR, Kim BS, Kim JB et al (2007) In vitro maturation, in vitro fertilization and embryonic development of canine oocytes. *Zygote* 15 pp. 347-353.

- Linde-Forsberg C (2001) Biology of reproduction and modern reproductive technology. In: Ruvinsky Sampson J. (Editor9). The Genetics of the dog.
- Lopes G, Alves MG, Carvalho RA et al (2011) Dna fragmentation in canine oocytes after in vitro maturation in TCM-199 medium supplemented with different proteins. *Theriogenology* 76: 1304-1312.
- 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, Luciano AM, Modina S et al (2001) Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus–oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of in vitro maturation. *Journal of reproduction and fertility* 57: 141–146.
- Matsushita S, Tani T, Kato Y et al (2004) Effect of low temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after in vitro fertilization, parthogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Animal Reproduction Science* 84: 293–301.
- McEvoy TG, Coull G, Broadbend PJ (2000) Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journel Reproduction and Fertizatilion* 118(1): 163-170.
- Metcalf SS (1999) Assisted reproduction in the bitch. Thesis for the degree of Master of Science, Monash University, Victoria, Austral.
- Nakao H, Nakatsuji N (1992) Effect of storage conditions of bovine ovaries and oocytes on the success rate of in vitro fertilization and culture. *Journal of Reproduction and Development* 38: 11–13.
- Nickson DA, Boyd JS, Eckersall PD (1993) Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation in vitro fertilization in bitches. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 47: 231-240.
- Noakes DE, Parkinson TJ England GCW (2008) Arthur’s Veterinary Reproduction and Obstetrics. China: Elsevier.

- Otoi F, Tanaka M, Suzuki T et al (1999a) Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* 11: 387-390.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M (1999) Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* 11: 387-390.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M (2000) Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* 54: 535-542.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M et al (2000a) Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* 54: 535-542.
- Otoi T, Ook, A, Murakami M et al (2001) Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reprod. Fertil. Dev.* 13: 151-155.
- Otoi T, Shin T, Kraemer DC et al (2004) Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization. *Reproduction Nutrition Development* 44: 631-637.
- Otoi T, Willingham L, Shin T et al (2002) Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction* 124: 775-781
- Otoi T, Willingham L, Shin T et al (2002) Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction* 124: 775-78.
- Özdaş OB, Tas M, Cirit Ü et al (2006) Effect of different transport temperatures of cattle and sheep ovaries on in vitro maturation of oocytes. *Medycyna Weterynaryjna* 62 (2): 162-164.
- Özdaş OB, Taş M, Cirit U et al (2005) Effect of different transport temperatures (+4°C, +32°C) on in vitro maturation of oocytes collected from cattle and sheep ovaries. *Reproduction, Fertility and Development*. 17(2):296-296.
- Pabuççuoğlu S (2001) Sığır oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında HEPES ve hormonların etkileri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 27: 659-670.

- Phemister RD, Holst PA, Spano JS (1973) Time of ovulation in the Beagle Bitch. *Biology of Reproduction* 8: 74–82.
- Pineda, MH (2003) Reproductive Patterns of Dogs. In: Pineda, MH MP Dooley. (Editor). *McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 5 th. Edittion. USA: Blackwell pp: 475-504.
- Polge C, Smith A, Parkes A (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164666, 1949
- Renton JP, Boyd JS, Eckersall PD (1991) Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *Journal of reproduction and fertility*. 93: 221–231.
- Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N (2005) In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 130: 193–201
- Robertson JB, Srsen V, King WA (1992) Cytogenetic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured in vitro. *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, The Hague, The Netherlands* 4: 1808–1810.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL (2003a) Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 58-62.
- Rodrigues BA, Dos Santos LC, Rodrigues JL (2004) Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 67: 215–22
- Rodrigues BA, Rodrigues JL (2003b) Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology* 60: 59–66.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL (2006) Responses of canine oocytes to in vitro maturation and in vitro fertilization outcome. *Theriogenology* 66: 1667–1672
- Rota A, Cabianca G (2004) In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. *Reproduction Nutrition Development* 44:105-109.

- Sağırkaya H, Bağış H (2003) Memeli embriolarının kriyoprezervasyonu: Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2-3: 127-135.
- Saikhun J, Sriussadaporn S, Thongtip N et al (2008) Nuclear maturation and development of IVM/IVF canine embryos in synthetic oviductal fluid or in co-culture with buffalo rat liver cell. *Theriogenology* 69: 1104-1110.
- Saint-Dizier M, Renard JP, Chatant-Maillard S (2001a) Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 121: 97-105.
- Saint-Dizier M, Reynaud K, Chastant-Maillard S (2004) Chromatin, microtubules and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 68: 205–212.
- Saint-Dizier M, Salomon JF, Petit C et al (2001b) In vitro maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. *Journal of reproduction and fertility* 57: 147–150.
- Schillo KK (2009) *The Reproductive Physiology of Mammals, From Farm to Field and Beyond*. 1st Edition. Cengage: Delmar Learning
- Schummer A, Nicel R (1979) Female genital organs of carnivores. In: Wolfgang OS. (Editor). *The Viscera of the Domestic Mammals*. Berlin: Translation and revision by Verlag Paul Parey
- Senger PL (2005) *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2nd. Edition. Pullman: Current Conception Inc
- Sirard MA, Leibfried-Rutledge ML, Parrish JJ, et al (1988) The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *39*: 546-552.
- Smidt D, Niemann H (1999) Biotechnology in genetics and reproduction. *Livestock Production Science* 59:207-221.
- Smitz J, Nogueira D, Vanhoutte L et al (2004) Oocyte in vitro maturation. In: Gardner, D.K., Weissman, A., Howles, C.M., Shoham, Z. (Eds.), *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*, second ed. Taylor & Francis Group, London, pp. 125–161.

- Songsasen N, Spindler RE, Wildt DE (2005) Impact of nuclear status and maturation period on energy substrate use by in vitro dog oocytes. *Biology of Reproduction* 634.
- Songsasen N, Wildt DE (2007) Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science* 98(1-2): 2-22
- Songsasen N, Yu I, Leibo SP (2002) Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Molecular Reproduction and Development* 62: 407–415
- Spanel-Borowski K (1981) Morphological investigations on follicular atresia in canine ovaries. *Cell Tissue research* 214: 155–168.
- Spanel-Borowski K, Calvo W (1982) Short- and long-term response of the adult dog ovary after 1200 R whole body X-irradiation and transfusion of mononuclear leukocytes. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 41: 657–670
- Srsen V, Kalous J, Nagyova E et al (1998) Motlik J. Effects of follicle stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of bhie fox (*Alopex la us*) oocytes in vitro. *Zygote* 6:299-30
- Ström H, Larsson B, Rodriguez-Martinez B, Lagerstedt H, et al (2001) Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. *J. Vet. Med. A: Physiol. Pathol. Clin. Med.* 48: 587– 592.
- Swanson WF, Roth TL, Wildt DE (1994) In vivo embryogenesis, embryo migration, and embryo mortality in the domestic cat. *Biology of Reproduction* 51: 452–464
- Tange S, Van Soom A, Nauwynck H, et al (2002) Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 61: 414-424.
- Taş M, Evecen M, Özdas ÖB et al (2006) Effect of transport and storage temperature of ovaries on in vitro maturation of bitch oocytes. *Animal Reproduction Science* 96: 30–34.

- Tesoriero JV (1981) Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. *J. Morphol.* 168, 171– 179.
- Thibier M, Guerin B (2000) Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62(1-3):233-51.
- Tsutsui T (1989) Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 39: 269–275.
- Tsutsui T, Shimada, K, Nishi M (1989) An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Japon Journal of Veterinary Medical Science* 51: 797-800
- Velilla E, Rodriguez-Gonzalez E, Vidal F et al (2005) Microtubule and microfilament organization in immature, in vitro matured and in vitro fertilized prepubertal goat oocytes. *Zygote* 13: 155–165
- Verlhac MH, Kubiak JZ, Clarke HJ et al (1994) Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 120: 1017–1025.
- Verstegen-Onclin K, Verstegen J (2008) Endocrinology of pregnancy in the dog: A review. *Theriogenology* 70; 291-299.
- Wani NA, Wani GM, Khan MZ et al (1999) Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilisation procedures in sheep. *Small ruminant Research*, 34: 71-76
- Wani NA, Wani GM, Khan MZ et al (2000) Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Ruminant Research*, 36: 63-67
- Wassarman PM, Albertini DF (1994) *The Mammalian Ovum. The Physiology of Reproduction*, Raven Press 79-188
- Wildt DE, Chakraborty PK, Panko WB (1978) Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biology of Reproduction* 18: 561–570.

- Wildt DE, Panko WB, Chakraborty P(1979) Relationship of serum estrone, estradiol-17 β and pro-gesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biology of Reproduction* 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.
- Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA et al (2002) Somatic cell nuclear transfer. *Nature*.419(6907):583-6
- Włodarczyk R, Bukowska D, Jackowska M et al (2009) In vitro maturation and degeneration of domestic cat oocytes collected from ovaries stored at various temperatures. *Veterinarni Medicina* 54(10): 491-497.
- Wolfe BA, Wild, DE, (1996) Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. *Reproduction, Fertility and Development* 106: 135–141
- Wongsrikea P, Otoi T, Karja NWK et al (2005) Effects of Ovary Storage Time and Temperature on DNA Fragmentation and Development of Porcine Oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 51:1
- Woods EJ, Benson JD, Critser JK(2004) Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48: 146–156.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawano Yet al (1993) In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *Journal of reproduction and fertility* 47: 227–229.
- Yang CD, Miao DQ, Zhang QH et al (2010) Short-term Preservation of Porcine Oocytes in Ambient Temperature: Novel Approaches. *Plosone* 5(12): e14242

7.SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Derece Santigrat
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
A	Anafaz
BSA	Bovine Serum Albumin
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Kalsiyum Klorür
Cm	Santimetre
COCs	Comulus Oocyte Complexes
CO ₂	Karbondioksit
EBS	Estrus Bitch Serum
ECS	Estrus Cow Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FSH	Follicule Stimulating Hormone
Gr	Gram
GV	Germinal Vezikül
GVBD	Germinal Vezikül Break Down
HSOF	Yıkama Medyumu
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
IVM	İn Vitro Maturasyon
KCL	Potasyum Klorür
Kg	Kilogram
LH	Luteinizan Hormon
Lt	Litre

MgCl ₂ 6H ₂ O	Magnezyum Klorür Hekza Hidrat
MI	Metafaz I
MII	Metafaz II
ml	Milimetre
mm	Minimetre
MPF	Maturation Promoting Factor
Na	Sodyum Bikarbonat
NaCl	Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄	Monosodyum Fosfat
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
nm	Nanometre
P	Fosfor
PBS	Phosphate Buffered Saline
Ph	Hidrojenin Gücü
SOF	Synthetic Oviductal Fluid
TCM 199	Tissue Culture Medium
TI	Telofaz
UDNM	Undetermined Nuclear Materyal
Zp	Zona Pellusida

8.TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca hem akademik hem kişisel olarak beni her daim destekleyen ve yönlendiren, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA'ya teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Doktora eğitimim boyunca bilimsel önerilerini benimle paylaşan başta Prof.Dr. M.Kemal SOYLU ve tüm Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Yine çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve gelecekteki hayatında çok daha başarılı olacağına inandığım kıymetli Doç. Dr. Selim ALÇAY'a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere erişmemi sağlayan çok değerli ve hayattaki en büyük şansım olan anneme, babama, eşime, kardeşime ve çocuklarıma sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

9.ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Kocaelinde doğdum. İlkokul, Ortaokul ve Lise eğitimini İzmit'te tamamladım. Üniversite eğitimimi Bursa Uludağ Üniversitesinde Veteriner Fakültesinde tamamladım.

Kocaeli Üniversitesi İktisadi ve İdari ve Bilimler Fakültesinde Yönetim ve Organizasyon Bölümünde Pazarlama üzerine tezli yüksek lisans yaptım. Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda Doktora yapma hakkı kazandım. Kocaeli Büyükşehir Belediyesinde Veteriner Hekim olarak görev yapmaktayım.