

RESEARCH ARTICLE

J Res Vet Med. 2023; 42 (2) 70-75
DOI:10.30782/jrv.1326864**Partenogenetik Aktivasyonun Vitriyifiye Köpek Oositleri Üzerine Etkisi****Özde Rabia Özalp^{*1}, Burcu Üstüner², Özge Bari¹, Ahmet Aktar²,
Ahmet Yavuz³, Hakan Sağırkaya²**

1 Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D., Görükle, Bursa

2 Bursa Uludağ Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama A.D., Görükle, Bursa

3 Medikon Veteriner Kliniği, Nilüfer, Bursa

Received 13-07-2023 Accepted 21-12-2023

Özet

Pet hayvanlarında biyoteknolojik çalışmalar son yıllarda hız kazanmaya başlamıştır. Köpeklerde başarısız yardımcı üreme teknikleriyle ilgili oluşan sorular, muhtemelen köpek türlerinin reproduktif fizyolojisine ait yetersiz bilgidir. Fakat diğer taraftan pet biyolojisindeki uygulamalar, insan hastalıkları için model oluşturmaktadır. Bunun ötesinde gamet kriyopreservasyonunun gelişmesi, nesli tükenmekte olan türlerin korunması ve genetik banka oluşturulması için önemlidir. Bu çalışmada, köpek oositlerindeki düşük maturasyon oranlarına rağmen, partenogenetik aktivasyonun etkileri vitriyifiye oositlerde test edildi.

Köpek oositleri, Yıldırım Belediyesi Sokak Hayvanları Bakım ve Rehabilitasyon merkezinden alınan, 20 adet sağlıklı köpekten toplandı. Ovaryumların tekrarlı parçalanmasından sonra, seçilen COCs (kumulat oosit kompleksleri), 5% CO₂ inkübatörde, mineral yağla kaplanmış 500 µl TCM-199 içeren dört-gözlü petrilere, 39°C'de, 72 saat boyunca maturasyona bırakıldı. Maturasyondan sonra oositler, 0%, 10%, 20% etilen glikol içeren 50 ml PBL içinde sırasıyla, 10, 10 dakika ve 30 saniye muamele edildi. Oositler, 30 µl VS3 içeren kriyoviallere yerleştirilerek sıvı nitrojende donduruldu. Bu grubun oositleri (n=257) 'vitriyifiye oosit-VO' olarak gruplandı. Çözdürme sonrasında, oositler ionomisinle 5 dakika ve sikloheksimid ile 3 saat muamele ederek partenogenetik aktivasyona bırakıldı. Sonrasında oositler 72 saat kültüre edilerek nükleer maturasyon değerlendirildi. Kontrol grubu olarak kullanılan oositler (n=257), 'non vitriyifiye oosit-FO' olarak gruplandırıldı. Maturasyondan sonra, oositler direkt olarak ionomisin ve sikloheksimid ile muamele edilerek aktivasyona bırakıldı ve 72 saat kültüre edildi. Tüm oositler Hoechst33342 ile 30 dakika boyandıktan sonra nükleer maturasyon oranları mikroskopta değerlendirildi.

Maturasyon oranları (MI+MII) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (p>0,05). Gruplar arasında GV, GVBD, MI, ve MII oranlarında da istatistiksel fark bulunmadı (p>0,05).

Maturasyon sonrasında, vitriyifiye köpek oositlerinde partenogenetik aktivasyona bağlı nükleer değerlendirmeye çalışması bulunmamaktadır. Fakat bu uygulamada elde edilen düşük maturasyon oranlarının, ileri moleküler çalışmalarla açıklanması gerektiği kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: Köpek oositleri, vitriyifiyasyon, *in vitro* maturasyon, partenogenetik aktivasyon

Effect of Parthenogenetic Activation on Vitrified Canine Oocytes**Abstract**

Biotechnological research in pet animals has been run up in recent years. Raised questions about unsuccessful assisted reproductive technologies in canids are probably related to poor information in the reproductive physiology of canids. But on the other hand, applications in pet biology are accepted as a model for human diseases. Apart from this, the development of gamete cryopreservation is an important tool for genetic banking and conservation of endangered species. In spite of the low maturation rates of canine oocytes, the results of parthenogenetic activation were tried to matured and vitrified-warmed canine oocytes in this study.

Oocytes were collected from 20 healthy bitches at Yıldırım Municipality Stray Animals Sterilization and Rehabilitation Center. After slicing of ovaries, selected (COCs) cumulus-oocyte complexes were matured for 72 h at 39°C in four-well petri dishes containing 500 µl TCM-199 under mineral oil in a 5%CO₂ incubator. After maturation, oocytes were exposed to 50 ml PBL containing 0%, 10%, 20% ethylene glycol for 10, 10 minutes, and 30 seconds, respectively. They were vitrified in cryovials containing 30 µl VS3 in liquid nitrogen. The oocytes in this group (n=257) were grouped as 'vitrified oocyte-VO'. After warming, the oocytes were parthenogenetically activated with ionomycin for 5 minutes and followed by cycloheximide for 3 h. Oocytes were then cultured for 72 h and assessed for nuclear maturation. The oocytes (n=257), grouped as 'non-vitrified oocytes-FO' were used as the control group. After maturation, oocytes were directly incubated with ionomycin and cycloheximide for parthenogenetic activation and cultured for 72 h. All oocytes were stained with Hoechst33342 for 30 min and nuclear maturation rates were assessed using a microscope.

Maturation rates (MI+MII) between groups had not been found statistically different (p>0,05). GV, GVBD, MI, and MII rates were also not statistically different between the two groups (p>0,05).

To our knowledge, there is no information available about the influence of parthenogenetic activation on nuclear maturation after the vitrification of matured canine oocytes. However, low maturation rates should be clarified by further molecular studies.

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

* Corresponding Author: Özde Rabia Özalp, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D., Görükle Kampüsü, 16059, Bursa, Tel: + 90 224 29 40 825, E-posta: rgozalp@uludag.edu.tr

Giriş

Yardımcı üreme teknikleri, primatlar, domuz, inek ve küçük ruminantların dahil olduğu birçok türde başarı ile geliştirilmiş ve uygulama alanı oluşturmuştur.¹⁻⁴ Fakat köpek oositlerinin *in vitro* maturasyon oranının düşük olması ileri çalışmaların yapılmasına kısıtlamalar getirmektedir. Bu durumun, diğer türlerden farklı olarak, köpeklerin reproduktif karakteristikleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.^{5,6} Köpeklerde morfolojik olarak germinal vezikül (GV) olarak tanımlanan immatur oositler ovule olur ve maturasyon ekstraovaryan dokuda, post-ovulasyon 48-60 saat arasında tamamlanır.⁷⁻¹⁰

Köpek oositlerinin maturasyon oranları tatmin edici düzeyde olmasa da, bu türler için gen bankası oluşturulması ve nesli tükenen türlerin korunabilmesi için gamet kriyoprezervasyonu önem taşımaktadır.^{8,11} Gamet ve embriyo vitrifikasyonu, uygulama kolaylığı ve hücre sağ kalım düzeyinin iyi olmasından dolayı çokça tercih edilmektedir.¹² Oositlerin dondurularak saklanması yanında, ovaryan korteks ya da ovaryumların dondurulması da mümkündür. Bu sayede primer ve primordiyal foliküllerden oluşan büyük havuzun fertil oositleri gelecekte kullanılabilir. ¹¹⁻¹³ Köpek oositleri germinal vezikül (GV) aşamasında dondurulur ve çözündürüldükten sonra maturasyonu yapılabilir ya da metafaz II aşamasında olgun halde dondurulur ve çözündürüldükten sonra kullanılır. ¹² Oositler, spermayla karşılaştırıldığında daha büyük hücreler olduğundan farklı kriyotoleransı vardır ve kriyoprotektan solüsyonlarla dondurulmasında ozmotik basınca ulaşabilmesi için daha uzun süreye ihtiyaç duyarlar. Oositler zona pellusida ile çevrili olduğundan permeabilitesi spermaya göre farklı olup plazmatik membran yalnızca hücre çevresinde olur. ¹² Oositlerin ve ovaryan dokuların dondurulmasında vitrifikasyon yöntemi buz kristalleri oluşturmaksızın, camı katılaşmaya neden olarak, hücrelerin bu süreçte zarar görmesine engel olmaktadır.¹²

Maturasyon/M-faz destekleyici faktörün aktivasyonu (MPF) önemli bir mayoz hücre siklus regülatörü olup, germinal vezikül breakdown (GVBD) ve hücre iskeleti/kromatin oluşumu organizasyonlarını indükler.¹⁴⁻¹⁶ Mitoz I (MI) ve mitoz II (MII) aşamalarında, MPF'nin belirgin derecede artışı, köpek oositlerinin mayotik süreci başlatmasında önemli role sahip olduğu açıklanmıştır.¹⁶ MPF, MII fazında yüksek konsantrasyonda tutulur ve sonraki nükleer gelişme sperm ilişkili aktivasyona bağlıdır.^{17,18} Bu da laboratuvar şartlarında partenogenetik aktivasyonla taklit edilir. Fertilizasyon esnasında spermatozoon penetrasyonundan sonra olduğu gibi, partenogenetik aktivasyon metotlarının

temel prensibi intrasellüler serbest kalsiyumun salınımına dayanır.^{18,19} Partenogenetik aktivasyon ve mayotik başlangıç laboratuvar ortamında Ca-EDTA, ionomisin, sikloheksimid ve elektrik stimülasyonu ile köpek oositlerinde test edilmiştir.^{5,19,20} Fakat *in vitro* maturasyon sonrasında vitrifikasyonla dondurulan köpek oositlerinin, partenogenetik aktivasyon testleri yapılmamıştır. Bu nedenle sunulan çalışmada, *in vitro* maturasyon sonrasında vitrifiye edilen köpek oositlerinin, kalsiyum ionofor ve sikloheksimid ile partenogenetik aktivasyonu sonrasında mayotik başlangıca etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Ovaryumların ve oositlerin toplanması

Yıldırım Belediyesi Sahipsiz Hayvan Barınağı'nda rutin ovariohisterektomi sonrasında melez ırk ve yaşları ortalama 4-6 arasında değişen 20 köpekten toplanan ovaryumlar çalışmada kullanıldı. Ovaryumların laboratuvara transportu, operasyondan sonra ortalama 1 saat içinde, 37°C'de ve PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) içinde gerçekleştirildi. Ovaryumlar, petri kutuları içinde tekrarlı dilimlenerek 0.25 mM sodyum piruvat, 3 mg/mL BSA-Frac V, 100 U/mL penisilin içeren TL-HEPES yıkama solüsyonu (stop solüsyon) ile yıkandı ve kumulus oosit kompleksleri (COCs) elde edilmeye çalışıldı.

In vitro maturasyon (IVM)

Dört katlı kumulus hücrelere, koyu pigmentli ooplazmaya ve bozulmamış zona pellusidaya sahip COCs'lar seçildi ve maturasyon kültürüne alındı. *In vitro* maturasyon, 0.5 µg/mL FSH (folikül uyarıcı hormon), 5 µg/mL LH (luteinize edici hormon), 0.2 mM sodyum piruvat, 10 % FCS (fetal buzağı serum) ve 25 µg/mL gentamisin sülfat ile zenginleştirilmiş TCM 199 medyumunda yapıldı. *In vitro* maturasyon medyumunu içeren dörtlü petri kapları içine 30-40 oosit transfer edilerek üzerlerine 500 µl mineral yağ eklendi ve oositler 39 °C ve 5% CO₂'lik etüvde 72 saatlik inkübasyona bırakıldı.

In vitro maturasyon sonrasında, oositler rastgele 2 gruba ayrıldı. Vitrifiye oositler (VO, n=257) *in vitro* maturasyon sonrasında vitrifiye edildi, çözündürüldü ve partenogenetik aktivasyona bırakıldı. Non-vitrifiye oosit grubu (FO, n=257) *in vitro* maturasyon sonrasında partenogenetik aktivasyona bırakıldı ve çalışmanın kontrol grubu olarak kabul edildi.

Oositlerin vitrifikasyonu ve çözündürülmesi

Oositler, çevresindeki kumulus hücrelerinin uzaklaştırılması için 100 µl TL-HEPES içinde hazırlanan 300 IU/ml hiyaluronidaz ile muamele edildi. Denudasyon için toplanan oositler, 5 dakika vortekslenerek, 3 kez TL-HEPES'te

yıkandı ve hızlıca vitrifikasyon solüsyonlarından geçirildi. VS1, VS2 içinde 5'er dakika ve VS3 içinde 30 saniye bekletilen oositler, hızlıca kriyoviyaller içine alınarak sıvı nitrojene alındı. Ortalama 7-10 gün boyunca sıvı azotta kalan kriyoviyaller, çözündürme işlemi için 37°C'de 1 dakika bekletildi ve hızlıca oositlerin hücre büzülmesine engel olmak için 3 dakika 1 M sükröz solüsyonunda bekletildi.

Partenogenetik Aktivasyon

Çözündürülen oositler TL-HEPES içinde 5 µM kalsiyum iyonofor (ionomycin) ile hazırlanan partenogenetik aktivasyon sonüsyonunda 5 dakika inkübe edildi. Takiben 30 mg/ml BSA (bovine serum albumin) içeren TL-HEPES içinde 5 dakika bekletildi.⁵ Ionomisinle muamele edilen oositler 10 µg/ml sikloheksimide (CHX) içinde 3 saat bekletildi. Hemen ardından, 3.3 mg/mL BSA (FAF-fatty acid free), 11.1 µL/mL sodyum piruvat ve 0.5 µL/mL gentamisinle zenginleştirilen TCM-199 içine alınarak, 39°C ve 5% CO₂'lik etüvde 72 saatlik inkübasyona bırakıldı.

Nukleer Maturasyon Oranlarının Değerlendirilmesi

Hoechst 33258 floresans DNA boyası 10 µg/mL konsantrasyonda PBS içinde hazırlandı. Nukleer maturasyon değerlendirilmesi için oositler 1 % v/v Hoechst 33258 damlacıkları içinde 30 dakika karanlık inkübatörde bekletildi. Oositler, dört damla parafin ile desteklenen lamel ile kaplandı ve 350/461 nm dalga boyu filtreli (Olympus BX51, Japonya) floresan mikroskop kullanılarak incelendi. Nukleer morfoloji Germinal Vezikül (GV), Germinal Vezikül Breakdown (GVBD), Metafaz I (MI), ve Metafaz II (MII) olarak sınıflandırıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistik analizleri için IBM SPSS 23.0 programı kullanıldı ve anlamlı farklılıkların yorumlanmasında p değeri 0,05 olarak hesaplamalara dâhil edildi. Veriler, Mann-Whitney U yöntemi ile analiz edildi.

Sonuçlar

In vitro maturasyon oranlarının (MI+MII) gruplar arasında benzer olduğu ve istatistiksel olarak fark olmadığı belirlendi (p>0,05). Yine gruplar arasında GV, GVBD, MI, ve MII oranlarında istatistiksel fark bulunamadı (p>0,05). Bu sonuçlara ait detaylı veriler Tablo 1 ve 2'de verilirken, mikroskop altında oositlerde gözlenen 4 farklı nukleer morfoloji görüntüleri Figür 1'de gösterildi.

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

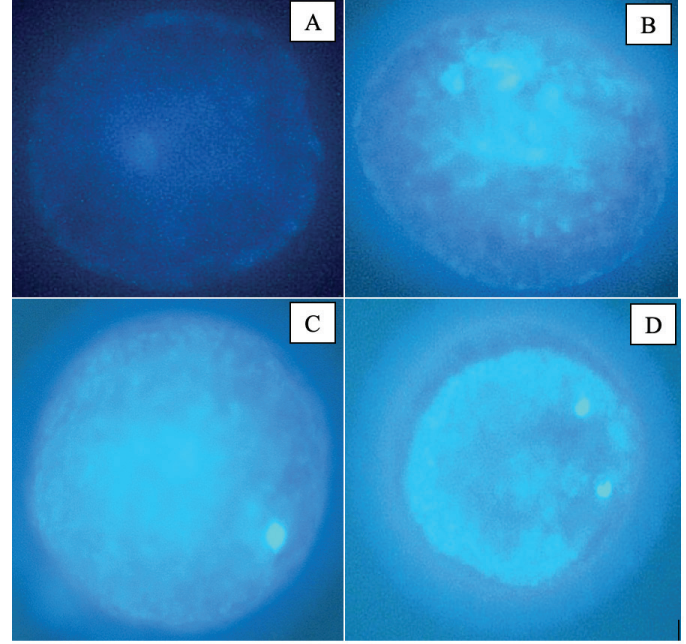
	GV	GVBD	MI	MII
FO	34 (%13,23)	212 (%82,49)	9 (%3,50)	2 (%0,78)
VO	50 (%19,46)	193 (%75,10)	13 (%5,06)	1 (%0,39)

VO-Vitrifiye oosit; FO-Non-vitrifiye oosit; GV-Germinal Vezikül; GVBD-Germinal Vezikül Breakdown; MI-Metafaz; MII- Metafaz

Tablo 2. Gruplar arası MI ve MII oranları (p>0,05)

Grup Non-Vitrifiye Oosit (FO)	Grup Vitrifiye Oosit (VO)
11 oosit (%4,28)	14 oosit (%5,44)

VO-Vitrifiye oosit; FO-Non-vitrifiye oosit



Figür 1: Hoechst 33342 ile boyama sonrasında mikroskopta gözlenen köpek oositleri

A: Germinal Vezikül

B: Germinal Vezikül Break Down

C: Metafaz I

D: Metafaz II

Tartışma ve Sonuç

Köpek türlerinde *in vitro* embriyo üretimi, kriyopreservasyon yada nukleus transferi çalışmalarının sınırlı olarak devam etmesinin en önemli nedeni olarak *in vitro* maturasyonun başarısının düşük olması görülmektedir.²¹ *In vitro* maturasyon geliştirme çalışmaları devam ederken reproduktif biyoteknolojinin vazgeçilmez bir parçası olan oosit kriyoprezervasyonuna ilişkin çalışmalar da hız kazanmıştır. Bu çalışmada *in vitro* maturasyondan sonra vitrifiye edilen köpek oositlerinin, partenogenetik aktivasyon sonrası nukleus maturasyonu değerlendirilmiştir.

Çalışmada toplanan oositlerin tamamı *in vitro* maturasyon sürecine alınmıştır. Rastgele ayrılan oositlerin yarısı vitrifikasyondan sonra 7-10 gün içinde çözündürülerek partenogenetik aktivasyona bırakılmıştır, diğer yarısı ise direkt aktivasyona alınmıştır. Aktivasyon sonunda (VO) oositlerinin %75.10'u (193 adet) GVBD, %5.06'sı (13 adet) MI ve %0.39'u (1adet) MII aşamalarına girmiştir; %19.46'sı (50

adet) GV aşamasında kalmıştır. Kontrol grubunun (FO) oositlerinin %82.49'u (212 adet) GVBD, %3.50'si (9 adet) MI ve %0.78'i (2 adet) MII aşamalarına girmiştir; %13.23'ü (34 adet) GV aşamasında kalmıştır. Çalışmalarda, vitrifikasyonun iki şekilde yapılabileceği bildirilmiştir. Oositlerin toplanmasının ardından GV aşamasında dondurulup, çözdürüldükten sonra maturasyona alınması yada maturasyon aşamasını takiben dondurulup çözdürüldükten sonra kullanılmasıdır.¹² Çalışmamızda ikinci metod kullanılarak, maturasyon aşamasından sonra vitrifiye edilmiş oositler aktivasyonda kullanılmıştır.

Çalışmada partenogenetik aktivasyon ionomisin ve sikloheksimid ile yapılmıştır. Ionomisin intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunu artırarak oosit aktivasyonunu başlatmak için kullanılır.²² Sikloheksimid glutaramid antibiyotik olup, protein sentez inhibitörü olarak oosit aktivasyonuna olumlu etkilerinden dolayı kullanılmaktadır.^{23,24,25} Basitçe MPF'nin siklin B alt birimini degrade etmek için kullanılmaktadır.²⁶ Köpek oositlerinde ionomisin ve sikloheksimidin birlikte kullanımıyla partenogenetik aktivasyon sonrası değerlendirilmiştir. Ionomisinin tek kullanımının, kombinasyondan daha başarılı sonuç verdiği ve GVBD, MI, MII aşamalarındaki oositlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir.⁵ (Song ve ark., 2010). Ionomisin uygulanan toplam 121 oositten 27'si GVBD, 41'i MI ve 24 tanesi MII aşamasında belirlenmiştir. Ionomisin ve sikloheksimid kombinasyonunda ise toplam 112 oositten 45'si GVBD, 19'u MI ve 13 tanesi MII düzeyinde kalmıştır.⁵ Bu sonuçların çalışmamız sonuçlarına göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Çalışmanın *in vitro* maturasyon aşamasında maturasyon kültürüne katılan büyüme faktörlerinin bu farkı yarattığı düşünülmektedir. İnek oositlerinde sikloheksimidin mayozu durdurduğu bilgisine paralel olarak, köpek oositlerinde de benzer etki olabileceği belirtilmiştir ve çalışma sonuçlarımız da bu sonucu desteklemektedir.^{5,27}

Oositlerin GV aşamasında vitrifiye edilmesinden sonra maturasyona bırakılan oositlerin nukleus maturasyonu değerlendirilmiş ve sonuçlar vitrifikasyonun mayotik maturasyona başlamada olumsuz etkileri olduğu ileri sürülmüştür. Ancak MI ve MII aşamalarına ulaşan oosit sayısı arasında istatistiksel fark bulunamamıştır. Transmisyon elektron mikroskopu ile vitrifiye oositler incelendiğinde mayozun başlatılmasında önemli olan kortikal ranüller, mitokondri, düz endoplazmik retikulum gibi yapıların zarar gördüğü belirtilmiştir.¹¹ Oosit dondurmada etkili yöntemi oluşturabilmek için hayati gelişme protokollerinin hazırlanmasının önemi vurgulanmıştır.¹¹ Çalışmamızda maturasyon sonrası vitrifikasyon yapıldığından ve konu ile ilgili başka literatür bulunamadığından sonuçlar

karşılaştırılmaktadır. Ancak düşük MI ve MII oranlarına rağmen gruplar arasında anlamlı fark olmaması, vitrifikasyonun nukleer maturasyona olumsuz etki yaratmadığını düşündürmektedir. Buna ilişkin olarak, gonadotropinlerle hazırlanmış maturasyon medyumları kullanılan bu çalışmada, maturasyon öncesi ve sonrasında oositlerin vitrifiye edilmesi, takibinde meydana gelen değişikliklerin moleküller düzeyde değerlendirilmesinin yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Ionomisin ve sikloheksimid ile yapılan *in vitro* maturasyon oranlarının yüksek olduğu dikkati çekmektedir.⁵ Çalışmamızda alınan düşük oranların bu sonuçlarla paralel değerlendirilmesi gerektiği kanısındayız. Çalışmada *in vitro* maturasyon değerlendirilmesi yapılmadan aktivasyon yapılmıştır. Muhtemelen diğer çalışmalardan farklı olarak, sadece hormon katkıları köpek oositleri için yeterli olamamıştır. Gonadotropik hormonların *in vitro* maturasyona önemli katkısı olduğu bildirilmiştir. Nukleer maturasyonun tamamlanmasında cAMP konsantrasyonundaki değişimler MPF'nin aktivitesini kontrol etmektedir. cAMP'nin artması FSH ve LH'ya cevap olarak mayotik başlangıcını belirlemektedir.^{28, 29, 30} FSH aynı zamanda mayotik yeterliliğin önemli bir parametre olarak kabul edilen kumulus hücre ekspansiyonuna pozitif etkileri vardır.³¹ FSH ve LH'nın tek başına ve birlikte kullanılan medyumlarla yapılan çalışmalardan mayoz başlangıç oranı en yüksek %59 oranıyla en yüksek FSH+LH kombinasyonunda elde edilmiştir.¹² Ancak çalışma sonuçlarımızdan da anlaşılacağı gibi, gonadotropik hormon katkılarının tek başına yeterli olmadığı görülmektedir. Büyüme faktörleri ve antioksidanlar gibi katkı maddeleri katılarak maturasyona bırakılan oositlerin aktivasyona alınmaları sonucunda daha başarılı oranlara ulaşılabileceği kanısındayız.

Gamet hücrelerinin uzun süre saklanabilmesine olanak sağlayan dondurma teknolojisi ilk kez spermatozoon ile başlatılmıştır.³² Kriyoprotektanların donma esnasında gelişen soğuk şokuna karşı koruma sağladığı ve kriyoprotektanların optimum katım oranları türe özgü olduğu bildirilmiştir.³³ Oosit ve embriyonun başarılı kriyoprezervasyonu, dondurma-çözdürme süreçlerinde meydana gelen kriyo-injuri oranına bağlıdır. Sitoplazmadaki yüksek lipid içeriğinin işlemler esnasında geri dönüşsüz probleme neden olduğu inek, domuz ve özellikle diğer türlere göre çok yüksek lipid belirlenen köpek embriyolarında bildirilmiştir.³⁴

Köpek oosit vitrifikasyonu için ya ovaryum dokusu ya da GV aşamasındaki oositlerin kriyoprezervasyonu tercih edilmiştir.^{11,13,35,36} GV aşamasında yapılmış iyi dondurma ve saklama süreçlerinin köpek üretiminde daha avantajlı

olduğu, köpek oositlerinin fizyolojik farklılıkları ve *in vitro* maturasyon oranlarının düşük olmasından dolayı bu uygulamanın daha iyi sonuçlar verebileceği dikkati çekilmektedir. Aynı vitrifikasyon metodunun oosit içeren ovaryum dokularının kullanılmasında yine aynı avantaja sahip olduğu bildirilmiştir.³⁶ İnek ve domuz oositlerinde, kromozomları tutan ağların depolimerizasyonu, metafaz-2 aşamasında dondurma sürecinde geri dönüşsüz oluşmuştur.^{37,38} Köpek oositlerinde ise böyle bir patoloji bildirilmemiştir. Çalışmamızda yukarıdaki bilgilerin aksine maturasyon sonrası oositler vitrifiye edilmiştir. Kedilerde maturasyon sonrası vitrifiye oositler ile çalışmalar bulunmaktadır ancak köpek oositleriyle yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.^{39,40} Çalışmamızda vitrifikasyonun, non-vitrifiye oosit oranlarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak maturasyon sonrası muhtemel kriyoenjuriye ait bilgilere ulaşılabilmesi için ek çalışmalar ihtiyaç olduğu kanısındayız.

Kaynaklar

1. Mapletoft RJ, Hasler JF. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech.* 2005; 24:393-403.
2. Amiridis GS, Cseh S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim Reprod Sci.* 2012; 130:152-161.
3. Dyck MK, Zhou C, Tsoi S, Grant J, Dixon WT, Foxcroft GR. Reproductive technologies and the porcine embryonic transcriptome. *Anim Reprod Sci.* 2014; 149:11-18.
4. Hewitson L. Primate models for assisted reproductive technologies. *Reproduction.* 2004; 128: 293-299.
5. Song HJ, Kang EJ, Kim MJ, Ock SA, Jeon BG, Lee SL, Rho GJ. Influence of parthenogenetic activation on nuclear maturation of canine oocytes. *J Vet Med Sci.* 2010; 72:887-892, 2010.
6. No J, Zhao M, Lee S, Ock SA, Nam Y, Hur TY. Enhanced *in vitro* maturation of canine oocytes by oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology.* 2018; 105:66-74.
7. Renton JP, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJ, Mullaney J, Perry B. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil.* 1991; 93:221-231.
8. Songsasen N, Wildt DE. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. *Anim Reprod Sci.* 2007; 98:2-22.
9. De los Reyes M, Palomino J, Parraguez VH, Hidalgo M, Saffie P. Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during *in vivo* and *in vitro* maturation. *Theriogenology.* 2011; 75:346-353.
10. Concannon PW. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci.* 2011; 200-210.
11. Turathum B, Saikhun K, Sangsuwan P, Kitiyanant Y. Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2010; 8:70.
12. Luvoni GC. Cryobanking of Oocytes and Ovarian Tissue in Cats and Dogs World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, New Zealand, 2013.
13. Fujihara M, Kaneko T, Inoue-Murayama M. Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles. *Scientific Reports.* 2019; 9:3970
14. Kishimoto, T. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15: 654-663.
15. Kishimoto, T., Kuriyama, R., Kondo, H. and Kanatani, H. Generality of the action of various maturation-promoting factors. *Exp Cell Res* 1982; 137: 121-126.
16. Saint-Dizier M, Reynaud K, Chastant-Maillard S. Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. *Mol Reprod Dev* 68(2):205-212, 2004.
17. Brunet S, Maro B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction.* 2005; 130: 801-811.
18. Lee SR, Kim JW, Kim MO, Kim SH, Yoo DH, Shin MJ, Lee S, Park YS, Park YB, Ha JH, Ryoo ZY. The parthenogenetic activation of canine oocytes with Ca-EDTA by various culture periods and concentrations. *Theriogenology.* 2007; 67: 698-703.
19. Meo SC, Leal CL, Garcia JM. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. *Anim Reprod Sci.* 2004; 81:35-46.
20. Lee SR, Kim JW, Kim BS, Yoo DH, Park YS, Lee TH, Ha JH, Hyun BH, Ryoo ZY. Parthenogenetic induction of canine oocytes by electrical stimulation and CaEDTA. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44: 740-744.
21. Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D. Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology.* 2005; 63: 41-59.
22. Funahashi H, Cantley TC, Stumpf T'T, Terlouw SL, Day BN. *In vitro* development of *in vitro* matured porcine oocytes following chemical activation or *in vitro* fertilization. *Biol Reprod.* 1994; 50: 1072-1077.
23. Fulka J Jr, Motlík J, Fulka J, Jílek F. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocyte. *J Reprod Fertil.* 1986; 77: 281-285.

24. Fulka JJ, Leibfried-Rutledge ML, First NL. Effect of 6-dimethyl-aminopurine on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1991; 29: 379–384.
25. Yang X, Presicce GA, Moraghan L, Jiang SE, Foote RH. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology.* 1994; 41: 395–403.
26. Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y, Sagata N. Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature.* 1989; 342: 505–511.
27. Saeki K, Nagao Y, Kishi M, Nagai M, Iritani A. Timing of completion of the first meiotic division in bovine oocytes after maintenance of meiotic arrest with cycloheximide and their subsequent development. *J Vet Med Sci.* 1998; 60: 523– 526.
28. Luciano AM, Modina S, Vassena R, Milanese E, Lauria A, Gandolfi F. Role of intracellular cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. *Biol Reprod.* 2004; 70: 465-472.
29. Sirard MA, First NL. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod.* 1998; 39: 229-234.
30. Smitz JE, Thompson JG, Gilchrist RB. The promise of *in vitro* maturation in assisted reproduction and fertility preservation. *Semin Reprod Med.* 2011; 29: 24-37.
31. Sutovský P, Fléchon JE, Fléchon B, Motlik J, Peynot N, Chesné P, Heyman Y. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during *in vitro* culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol Reprod.* 1993; 49: 1277–1287.
32. Leibo SP, Brandley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: C Gagnon, ed, *The Male Gamet.* Cache River Press, St Louis; 1999: 502-515.
33. Bucak MN, Tekin N. Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2007; 54: 67-72.
34. Abe Y, Suwa Y, Yanagimoto-Ueta Y, Suzuki H. Pre-implantation development in Labrador retrievers. *J Reprod Dev.* 2008a; 54: 135–137.
35. Abe Y, Lee DS, Kim SK, Suzuki H. Vitrification of canine oocytes. *J Mamm Ova Res.* 2008b; 25: 32-36.
36. Abe Y, Asano T, Ali M, Suzuki H. Vitrification of canine cumulus–oocyte complexes in DAP213 with a cryotop holder. *Reprod Med Biol.* 2010; 9: 115–120.
37. Kasai M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reprod Med Biol.* 2002; 1: 1-9.
38. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology.* 2000; 53: 59-72.
39. Merlo B, Iacono E, Regazzini M, Zambelli D. Cat blastocysts produced *in vitro* from oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved electroejaculated semen. *Theriogenology.* 2008; 70: 126–130.
40. Murakami M, Otoi T, Karja NW, Wongsrikeao P, Agung B, Suzuki T. Blastocysts derived from *in vitro*-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. *Cryobiology.* 2004; 48: 341–348.