Köpeklerde Embriyo Elde Edilmesi ve Transferi Çalışmaları

Collection of Embryo and Studies on Embryo Transfer in Dogs

İsmail KIRŞAN[a],
Zeynep GÜNAY UÇMAK[a]

[a]İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi,
Doğum ve Jinekoloji ABD,
İstanbul, TÜRKİYE

Yazışma Adresi/*Correspondence:*
İsmail KIRŞAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi,
Doğum ve Jinekoloji ABD,
İstanbul, TÜRKİYE
krsan@istanbul.edu.tr

ÖZET Günümüzde memelilerin çoğaltılmasına yönelik yardımcı üreme teknikleri giderek artmaktadır. Ancak köpeklerde özellikle oositlerin elde edilmesi, in vitro olarak olgunlaştırılmaları, döllenmeleri ve elde edilen embriyoların olgunlaştırılması ve transferiyle ilgili biyoteknolojiler henüz tam oluşturulmamıştır. Oysa diğer hayvan türlerinde, özellikle sığırlarda bu alanda biyoteknolojik yöntemler geliştirilmiş ve başarıyla uygulanmaktadır. Bu makalede köpeklerden oosit ve embriyo elde edilmesi, bunların olgunlaştırılmaları keza transfer yöntemleri ve neticede elde edilen başarı sonuçları hakkında ayrıntılı bilgiler verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Embriyo yapıları; köpekler; oosit; embriyo transferi

ABSTRACT Nowadays, assisted reproductive techniques for reproduction of mammals are increasing. However, biotechnology related to obtaining oocytes, in vitro oosit maturation, fertilization, embryo maturation and transfer of the embryos obtained has not been established yet. Whereas, in other animal species, especially in cattles, biotechnological methods have been created and applied successfully in this field. In the presented article, detailed information about obtaining oocytes and embryos, their maturation, transfer methods and consequently success results in dogs are given.

Keywords: Embryonic structures; dogs; oocysts; embryo transfer

Köpeklerde yardımcı üreme teknikleri (YÜT), diğer evcil hayvanlardan daha az gelişmiştir. Türe özgü üreme özellikleri, yani monoöstrik, poliovulatör ve mevsimsel olmayan üreme döngüsü, köpeklerde YÜT ile üremenin zorluk derecesini arttırmakta ve başarı seviyesini düşürmektir. Metafaz II aşamasında olgun oositleri yumurtlayan çoğu memelinin aksine, köpekler germinal vezikül aşamasında olgunlaşmamış oositleri yumurtlar ve oositler yumurtalıkta 48-72 saatlik bir postovulatör olgunlaşma dönemine girerler. Köpek oositlerinin *in vitro* olgunlaşması (İVO) için uygun bir sistem kurulmasına odaklanan birçok çalışmaya rağmen, verimlilik diğer memeli türlerinden daha düşüktür.[1,2]

Üreme performanslarının iyileştirilmesi, yardımcı üreme teknolojilerinin (YÜT) nihai hedefidir ve bu amaç doğrultusunda bilimsel topluluklar tarafından biyolojik çeşitliliğin korunmasına ilgi duyulmasıyla birlikte karnivorlarda da bu çalışmalar başlatılmıştır. Aslında, karnivorlar sadece evcil hayvan olarak değil, aynı zamanda evcil olmayan köpek ve kedi türlerine yönelik çalışmalar için karşılaştırmalı modeller olarak kabul edilir. Suni tohumlama (ST), in vitro fertilizasyon (IVF) ve embriyo üretimi (EÜ), embriyo transferi (ET) ve gamet dondurarak saklama (kriyoprezervasyon) gibi yardımcı üreme teknolojileri (YÜT), yalnızca biyolojik çeşitliliği korumak için değil, temel araştırma ve reprodüktif performansı geliştirme için de önemli biyoteknolojilerdir. Bunlar arasında, IVF-ET ve ET, potansiyel olarak döllenmeyi incelemek ve nadir türlerin ge-

KAYNAK GÖSTERMEK İÇİN:
Kırşan İ, Günay Uçmak Z. Köpeklerde embriyo elde edilmesi ve transferi çalışmaları. Erdem H, editör. Hayvanlarda Embriyo Transferi ve Diğer Yardımcı Üreme Teknolojilerinin Kullanımı. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. p.72-8.

netik materyalini korumak için mevcut en güçlü üreme araçlarıdır.[3]

OVULASYON, FERTİLİZASYON VE İMPLANTASYON

Köpeklerde ovulasyon zamanı, LH dalgası ve progesteron seviyesinde anlamlı artışın başladığı zaman dikkate alınarak belirlenir.[4,5] Progesterondaki anlamlı artış LH dalgası ile başlar ve ovulasyon LH dalgasından 24 ila 72 saat sonra spontan olarak gerçekleşir.[6,7]

Köpek türlerinde dişi gametler, diğer birçok evcil memelinin oositlerine kıyasla benzersiz özelliklere sahiptirler. Ana farklılıklar, hem folliküler çevre hem de ovulasyon sırasında oositin mayotik evresinde görülmektedir. Aslında, çoğu memeli türünde östrojen, preovülatör folliküler çevreye hakimdir ve LH-dalgalanmasının bir sonucu olarak yumurtlamadan kısa bir süre önce mayotik bölünme yeniden başlatılır. Ovule olan oositler, belli bir süre sonra mayotik bölünmenin metafaz II evresindedir ve artık döllenmeye hazırdır.[3]

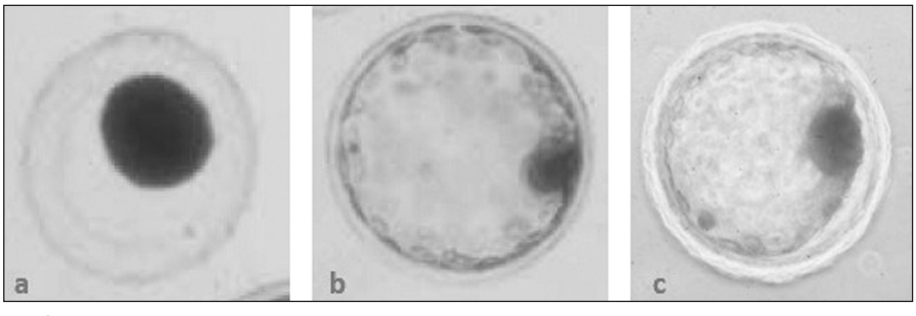
Köpeklerde, tilkilerde ve diğer kanin türlerinde, ovaryan folliküller, yumurtlamadan önce luteinize olur ve oositler giderek yükselen progesteron konsantrasyonlarına maruz kalır. LH artışından sonra, oositler, ilk mayotik bölünmenin başlangıcında, kendiliğinden primer oositler olarak ovule edilir (Resim 1a). Primer oositler, yumurta kanalında (ovidukt) olgunlaşıp sekonder oosit durumuna geçtikten sonra döllenebilirler. Mayotik olgunlaşmadan sonraki aşamalar yumurta kanalında (ovidukt) devam eder ve tamamlanması 2-3 gün sürer.[7,9,10] Bu olay yumurta hücrelerinin büyüklükleri 142-171 µm büyüklüğüne ulaştığı dönemdeyken gerçekleşmektedir.[9] Olgunlaşmış yumurta hücreleri en az 24 saat, bazı araştırıcılara göre 48 saate kadar döllenme kabiliyetlerini korurlar.[7,11] Küçük ırklarda, büyük ırklara (5-15) kıyasla daha az yumurta hücresi (2-10) ovule olduğu bildirilmiştir.[7] Ayrıca, köpek oositleri lipitler açısından çok zengindir ve oosit etrafındaki kumulus hücre kütlesi sıkı ve çok katmanlı olup döllenmeden sonra gamete bağlı kalır.[4]

Köpek embriyolarının yumurta kanalı (ovidukt) geçişi için uzun zaman gerekir ve bunlar 16 veya daha fazla hücreli embriyo olarak, yumurtlamadan 7-9 gün sonra uterusa girerler.[9] Böylece, ovidukt; oositin tamamıyla olgunlaşması, döllenme geçirmesi ve morula-blastosit aşamasına kadar gelişmesi için oositlerin uzun süre hayatta kalmasını destekler.[3] Köpek embriyoları LH zirvesinden sonraki 11. ve 12. günde, ovulasyon sonrası 9.-10. günlerde (191-197 µm büyüklüğüne eriştiklerinde) ya da çiftleşme sonrası 5-12. günde iken morula aşamasındadır (Resim 1b,c).[5,6,12] Blastositler, LH pikinden sonra 12. günde uterusa geçerler.[5,6] Çiftleşme sonrası 8-20. günler arasında uterusta 215-2270 µm büyüklüğündeki blastositler izole edilmiştir.[9] Köpek blastositleri LH dalgasından sonraki 23. günde uterusa implante olur.[7]

Köpeklerde embriyonun yaşının belirlenmesi ile ilgili olarak çok sayıda araştırmalar yapılmıştır.[6,9,12] Bazı araştırıcılar, embriyonal dönemin başlangıcı için LH pikini temel alırken, bazı araştırmacılar ise ovulasyon zamanını referans olarak almışlardır.[6,9,12]

OOSİT ELDE EDİLMESİ

Köpeklerde oosit elde etmek için birkaç deneysel yaklaşım tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi köpeklere ovariektomi uygulanmasıdır. Operasyondan 72 saat önce yumurtalıkları uyarmak amacıyla köpeklere PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) ve 24 saat önce hCG (human Chorionic Gonadotropin) kas içi tek doz enjekte edilerek süperovulasyon yapılır ve ardından ovariektomi gerçekleştirilir. Çıkartılan ovaryumlar daha sonra laboratuvarda dilimlenerek besi solüsyonu bulunan petri kapla-



RESİM 1: a: Ovulasyondan 12 gün sonra fertilize olmamış köpek oositi; **b:** Ovulasyondan 12 gün sonra köpek embriyosu; **c:** Ovulasyondan 15 gün sonra köpek embriyosu.[8]

rına aktarılır. Petri kabında toplanan sıvı bir stereo-mikroskop altında (15x büyütmede) incelenerek oositler araştırılır.[13,14]

Kültür için koyu pigmentli sitoplazmaya sahip bir veya daha fazla kumulus hücre tabakası ile çevrelenmiş primer oositler seçilir.[15-18] Primer oositler elde edildikten sonra 72 saat içerisinde konservasyonları yapılmış, 48 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra yapılan incelemede bir olgunlaşma olmadığı gözlenmiştir.[17-20] Primer oositlerin kültüre edilmesinden sonra, sadece %10 ila %12' si metafaz II' evresine ulaşmıştır.[14,17,19] Bazı araştırmalarda preovulatorik oositler ile daha yüksek bir olgunlaşma oranı elde edilmiştir.[14,21] Anöstrüs dönemindeki ovaryumlardan elde edilen oositlerin sadece %11,1[21] ila %12,1[14] olgunlaşma oranına ulaştığı bildirilmiştir. Buna karşılık, süperovulasyondan sonra %32' ye varan bir olgunlaşma oranı ve proöstrüstaki oositlerde ise %67' ye kadar varan bir olgunlaşma elde edilebilmiştir.[13,14,21]

Siklus döneminin yanısıra, olgunlaşma ortamı da yumurta olgunlaşma oranını etkilemektedir.[18-20] Olgunlaşma ortamındaki östradiolün 1 ug/ml'den 20 µg/ml'ye yükseltilmesi ve insan somatotropininin eklenmesi ile olgunlaşma oranı %10,2'den %14,1'e yükselmiştir.[19] Kültür ortamına ovidukt hücreleri eklendiğinde olgunlaşma oranı %60'a kadar yükseltilebilir.[20] Bir diğer araştırmada ise yumurta hücresi boyutunun oosit olgunlaşma potansiyeline etkisi ile ilgili incelemeler bildirilmiştir.[16,18] Buna göre, 100 µm üzerinde çapa sahip yumurta hücrelerinin, keza 120 µm'den büyük olanların daha iyi olgunlaşma potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir.[16,18] Aynı araştırmada çapı 120 µm üzerinde olan oositlerin oranı folliküler fazda en yüksek olduğu bulunmuştur.[18] Bu konuda dikkate alınması gereken diğer bir husus da köpeğin yaşıdır. Altı yaşından küçük köpeklerde oosit olgunlaşma potansiyeli daha yüksek olduğu belirlenmiştir.[16]

OOSİTLERİN *IN VITRO* MATÜRASYONU

Oositlerin, ovariektomiyle veya postmortem dönemde ovaryumlardan toplanması, büyük bir potansiyel embriyo kaynağı sunmaktadır. Döllenme ve embriyo gelişimi için ön şart oositin tam nükleer (metafaz II evresi) ve sitoplazmik olgunlaşmasıdır. *İn vitro* oosit matürasyonu, preovülatör ovaryan follikülde ve oviduktta meydana gelen dinamik değişiklikleri taklit etmeye çalışan karmaşık bir işlemdir. Başarılı bir olgunlaşma sistemi; kumulus hücreleri, nükleer materyal ve sitoplazma da dahil olmak üzere kumulus oosit kompleksinin tüm bileşenlerini içermektedir.[3] Köpek oositlerinin *in vitro* olgunlaşması halihazırda düşük ve oldukça değişken başarı oranları ile karakterizedir. Köpek oositlerinin, diğer tür oositlerden çok daha düşük bir oranda olmasına rağmen, in vitro mayozise kadar devam ettirildiği bildirilmiştir. Aslında, tam nükleer olgunlaşma kültürlenmiş oositlerin yaklaşık %20'sinde sağlanmaktadır.[22] Düşük olgunlaşma oranı, oositlerin düşük mayotik yeterliliğine veya düşük kaliteli kültür koşullarına bağlı olabilir. *İn vitro* çalışmalar konunun daha iyi anlaşılmasını ve olgunlaşma yeterliliğini gösteren bazı parametrelerin daha iyi tanımlanmasını sağlamışlardır. Kumulus oosit kompleksinin morfolojik görünümü ve oosit çapı, *in vitro* olgunlaşma oranlarını etkileyen faktörler olarak belirtilmiştir. Aslında, koyu renkli ve homojen sitoplazmalı ovaryan folliküllerden toplanan ve tamamen iki veya daha fazla sıkıştırılmış kumulus hücresi tabakası ile çevrelenmiş ve 110 mm'den daha büyük bir çapa sahip oositlerin, *in vitro* olarak olgunlaşma şansları daha iyidir.[16] Ayrıca, yumurtalıklardan disseke olmuş sağlam folliküllerdeki oositlerin kültürlenmesi için bir teknik kullanılmıştır. Sonuçlar, *in vitro* gelişmiş preantral ve erken antral foliküllerde kültürlenen köpek oositlerinin, metafaz II safhasında mayozu devam ettirmeye yetkin olduğunu göstermektedir.[23] Dişi köpeklerde, östrüs siklusunun evresi kumulus hücreleri ve oosit arasındaki iletişimin işlevsel durumunu etkiler.[21] Bu çalışmanın sonuçları, anöstrüs sırasında yumurtalıktan izole edilmiş köpek kumulus-oosit komplekslerinin mayozu tamamlayamadığını ve germinal ve somatik bölme arasındaki boşluk kavşakları arasındaki iletişimin bulunmadığını göstermiştir. Bu; kumulus hücreleri ile oosit arasındaki iletişimin, daha yüksek oranda mayozu tamamlayabilen kompleksler olan, geç proöstrüs sırasında izole edilen kumulus-oosit komplekslerinde mevcut olduğu gözlemiyle uyumludur.[3] Östrüs siklusu fazının dişi köpek oositlerinin mayotik yetkinliği üzerine benzer bir etkisi daha önce Yamada ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada bildirilmiştir.[14] Bu yazarlar, anöstrüstaki dişi köpeklerden gelen oositlerin kültür ortamında 144 saate kadar olgunlaşma eğilimi göstermemesine rağmen, süperovüle edilmiş dişi köpeklerden toplanan preovülatör oositlerin %32'sinin 72 saatlik kültürün ardından metafaz II'ye ulaştığını bildirmişlerdir.[14]

IN VITRO OOSİT OLGUNLAŞMASINDA KULLANILAN BESİ YERLERİ

Köpek oositleri için kültür gereksinimlerini incelemek amacıyla araştırmalar devam etmektedir. Yumurta hücrelerini olgunlaştırmak amacıyla çeşitli katkı maddeleri ilave edilmiş TCM-199 doku kültürü solüsyonu kullanılmıştır.[18-21,24,25] Bu amaçla %5 ve %10 oranında fötal buzağı serumu ilaveli doku kültürü solüsyonları tercih edilmiştir.[13,18] Bazı

çalışmalarda ise TCM-199'a fötal buzağı serumu yerine sığır serum albümini veya östrüsteki köpek serumu ilave edilmiştir.[21,25,26] Ayrıca gentamisin, penisilin, streptomisin gibi antibiyotikler ortama katılmıştır.[13,14,18,24] Yine östradiol, FSH, LH, progesteron, insan somatotropini ve insülin gibi maddeler besiyerine ilave edilerek bunların yumurta hücrelerinin olgunlaşma oranlarına olumlu, olumsuz etkileri araştırılmıştır.[18-21,25] Bogliolo ve ark. besi solüsyonuna ovidukt hücreleri ilave ettiklerinde olgunlaşma oranında artış olduğunu belirlemişlerdir.[20] Nickson ve ark. *in vitro* fertilizasyonun yapılacağı sıvı ortamında %10 fötal buzağı serumu ve 50 mg/ml gentamisin sülfat katkılı TCM-199 solüsyonu kullanmışlardır.[25]

Doku Kültür Medyumu olan TCM-199 gibi kültür ortamlarının, İVO için serum veya hormonal takviyeli olsun veya olmasın, Ham F-10 solüsyonunun modifikasyonu olduğu bildirilmiştir.[13,15] Hewitt ve England ise memelilerde *in vitro* oosit olgunlaşması çalışmalarında normalde kullanılandan farklı ve oviduktal sıvı kompozisyonuna çok benzer bir ortam kullanmanın etkisini araştırmışlardır.[27] Bunun sonucunda araştırmacılar, uzun bir olgunlaşma süresinden sonra (96 saat), yüksek konsantrasyonlarda protein içeren (Ovine Serum Albumin) ve oviductal hücrelerin varlığında sentetik oviduktal sıvı (SOS) olgunlaşma oranlarını arttırdığını tespit etmişlerdir. Tüm bu çalışmalar, oositlerin morfolojik görünüm ve çaplarının, folliküllerin gelişim evrelerinin, siklusun evrelerinin, kültür koşullarıyla birleştiğinde, köpek oositlerinin başarılı İVO'ları için çok önemli faktörler olduğu belirlenmiştir. Evecen ve ark., köpek oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılması amacıyla medyuma protein katılmasının gerekli olduğu ve bu amaçla, %0,3 BSA'nın ve %5FCS'ya göre daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.[28]

SOMATİK HÜCRE NÜKLEER TRANSFERİ (SHNT)

Olgun oositler elde etmek amacıyla, somatik hücre nükleer transferi (SHNT) için günümüzde en faydalı yaklaşım, *in vivo* olarak olgunlaşan oositlerin cerrahi toplanmasıdır. Bununla birlikte köpeklerde ovidukt duvarı ince ve lümeni küçük olduğundan, *in vivo* köpek oositlerinin cerrahi bir yaklaşımla (salpingektomi veya ovidukt yıkaması) toplanması zor bir tekniktir. Benzer şekilde, follikül aspirasyonuyla laparoskopik oosit toplanması işlemi, bursa ovarica varlığı nedeniyle mümkün değildir. Her ne kadar *in vitro* olgunlaşma teknikleri bazı türlerde çok sayıda olgun oosit üretmek için kullanılabilmesine rağmen, oviduktal yıkamadan toplanan *in vivo* olgunlaştırılmış köpek oositlerinin sayısı köpek başına 7 ila 10 oosit arasında değişmiştir.[29] Köpeklerde klonlanlama ile doğmuş tek yavru erkek olduğundan, dişi köpek yavruları üretmeyi amaçlayan Jang ve ark., somatik hücre nükleer transferi (SHNT) için yetişkin dişi bir Afgan tazıya ait kulak fibroblastlarını donör hücreler olarak kullanmışlardır. Doğan yavruların da hem fenotipik hem de genotipik olarak hücre vericisi ile aynı olduğu belirlenmiştir.[30] Bu çalışma sonucunda araştırmacılar, dişi köpeklerin, kulak fibroblastlarının çekirdeği çıkartılmış köpek oositlerine nükleer aktarılmasıyla embriyoların üretilebileceğini göstermişledir.[30]

EMBRİYO ELDE EDİLMESİ

Köpeklerde uterustan embriyoların elde edilmesi için çeşitli yöntemler tarif edilmiştir. İlk yöntemde, önce laparotomi yapılarak karın boşluğuna girilir, ardından elle serviks kontrol altına alındıktan sonra bir Foley kateter vajinal yoldan servikse doğru ilerletilir. Serviks geçilip uterusa girildikten sonra uterus içerisi birkaç kez vücut ısısındaki yıkama solüsyonuyla yıkanır ve geri alınan yıkama sıvısı petri kaplarında toplanır. Daha sonra bu kaplar mikroskop altında incelenir ve embriyolar araştırılır.[31]

Embriyo toplanması için bir diğer yöntem; çiftleşmiş veya suni tohumlama yapılmış köpeklere, önceden belirlenmiş ovulasyon zamanından sonra 12-17. günler arasında ovariohisterektomi uygulanmasıdır.[8] Embriyolar operasyondan hemen sonra uterus yıkaması yapılarak elde edilir. Bunun için uterus operasyonla alındıktan sonra temiz bir serviyet bezi ile silinerek kurulanır. Uterus çıkışları bifurkasyon hizasından birer tane bağırsak pensi ile önceden kapatılmış olması gerekir. Kornu uterilerin ovaryum tarafına yakın bölgesinden 0,6x30 mm ölçülerinde ucu küt bir göz kanülü uterus içerisine doğru yerleştirilir. Sonra %4 sığır serum albüminli Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS) karışımı 5 ml'lik steril bir enjektör içerisinde kanül vasıtasıyla uterus lümenine enjekte edilir. Enjeksiyondan sonra aynı taraftaki bağırsak pensi açılır ve uterus içeriği bir petri kutusunda toplanır. Her iki kornu uteri 15'er ml PBS-albümin solüsyonuyla yıkanır. Petri kabında toplanan sıvı bir stereo-mikroskop altında 15x büyütmede incelenerek embriyolar araştırılır. Tespit edilen embriyoların ayrıntılı olarak değerlendirilmesi invert mikroskopta 400x büyütmede yapılır.[8,32]

EMBRİYOLARIN *IN VITRO* ÜRETİMİ

Çoğu çalışmada, yumurta olgunlaşmasından hemen sonra *in vitro* fertilizasyon yapılmıştır.[13,14,18,19,24-26] Köpeklerde *in vitro* fertilizasyonun (IVF) başarı oranı düşüktür ve sadece erken dönemdeki embriyolar elde edilmiştir. Yamada ve ark., 8 hücreli evreye ulaşan tohumlanmış oositlerin %2'sinde ve 2000 yılında Otoi ve ark. ise 217 döllenmiş

oositten bir blastosit elde etmişlerdir.[13,18] Köpeklerde, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ISSE) gibi mikroenjeksiyon teknikleri bildirilmiş olup, oositlerin %7,8'inde erkek pronükleus oluşumu gözlenmiş, ancak başka bölünme oluşmamıştır.[33] Köpeklerde sperm penetrasyon oranının, yumurta hücrelerinin olgunluğuna bağlı olmadığı bulunmuştur.[24] Sekiz saatlik bir inkübasyon sürecinden sonra pronukleuslar görüldüğü, 12 saat sonra da döllenmiş yumurtaların %37,5' ine kadar pronükleus saptanabildiği bildirilmiştir.[24] Kırksekiz saat sonunda 2-8 hücreli aşamaya kadar gelmiş embriyolar gözlenir.[13,19,26] Bölünme oranı yaklaşık %10'dur.[18,19] Sığır kumulus hücrelerinin besleyici hücreler olarak kullanılmasının, bölünme oranının %15,7'ye çıkardığı bildirilmiştir.[18] Bir embriyonun blastosit aşamasına ulaştığı rapor edilmiştir.[18] Elde edilen embriyolar bir köpeğe nakledilme girişimlerinde bulunulmuş, ancak başarılı sonuçlar elde edilememiştir.[26] Köpek embriyolarının geliştirilmesi için %20 köpek serumu ilaveli fosfat tamponlu salin veya ringer çözeltisi kullanılmıştır.[10,31] Başka bir çalışmada, ısıl işlem görmüş fötal buzağı serumu, penisilin ve streptomisin ilaveli HAM F10 solüsyonu tercih edilmiştir.[32]

England ve ark. yaptıkları bir çalışmada IVF ile elde edilen iki hücreli embriyoyu kornu uteriye (ET) aktarmış ve implantasyonu sağlamışlardır.[26] Tsutsui ve ark. ise erken evre köpek embriyolarının intrauterin transferi ile yavru elde etmek için kullanımını araştırmışlar ve uterin tüp transferinin erken evre köpek embriyoları (4 hücreli) için daha uygun olduğunu belirlemişler ve gebelik oluşmasını başarmışlardır.[34]

EMBRİYO TRANSFERİ

Köpek embriyo transferinde, mevcut hücre sistemleri erken embriyonik gelişimi destekleyemediğinden, tek hücreli embriyolar genellikle alıcı dişinin yumurta kanalına transfer edilir.[35] Hossein ve ark.nın yumurta kanallarının yıkanması ile toplanan köpek oositlerinin sağ kalımına mevsimin ve doğum sayısının etkisi üzerine yaptıkları bir çalışmada, mevsimin oositin yaşam süresi üzerine bir etkisi olmadığını belirlemişlerdir.[29] Bununla birlikte çok doğum yapmış köpeklerden daha çok sayıda oosit toplandığını ve nullipar köpeklere göre multipar köpeklerdeki oosit kullanılabilirliğinin daha yüksek olduğunu saptamışlardır.[29]

İn vivo olarak olgunlaşmış köpek oositlerinden elde edilen embriyolar, doğal olarak östrüs gösteren alıcıların uterusuna aktarılmak suretiyle transfer işlemi gerçekleştirilir. Bu prosedürü şöyle açıklayabiliriz; Alıcı dişiler ya doğal olarak östrüste olmaları gerekir veya ilaçlarla senkronize edilerek östrüse getirilirler. Girişim ise genel anestezi altında yapılır. Ardından abdomen bölgesinin asepsi ve antisepsi sağlanır. Üreme organlarına ulaşabilmek için göbek deliğinin bir 2-3 cm gerisinden orta hat üzerinden pubis'e doğru deriye bir insizyon yapılır. Ardından karın duvarı açıldıktan sonra sağ ve sol açlık çukurluğu bölgelerinde uterus kornuları bulunur. Hazır embriyolar, 3,5 Fr büyüklüğünde Tom Cat katater kullanılarak, kornu uteri' lerin içerisine aktarılır. Embriyo transferinden sonraki 23. günde, ultrasonla 7.0Mhz linear veya konveks prob kullanılarak gebelik durumu tespit edilir.[35-39]

KÖPEK EMBRİYOLARININ KRİYOPREZERVASYONU VE İNTRAUTERİN EMBRİYO TRANSFERİ

Köpeklerde embriyoların kriyoprezervasyonu; embriyoların başka köpeklere nakli, köpek gen kaynaklarının korunması ve gen bankalarının oluşturulması, köpeklerde çiftleşmeyle bulaşan hastalıkların eliminasyonuna, infertiliteye klinik yaklaşım şansının sağlanması gibi üreme teknolojilerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Köpek embriyolarının kriyoprezervasyonu için en etkili uygulama, körler için kullanılan rehber köpekleri ve arama-kurtarmada kullanılan köpeklerin üretilmesinde önemli bir yere sahiptir. Çünkü gerek rehber köpekler gerekse polis ve askeri amaçlı kullanılan köpekler daha sakin bir davranış sergilemeleri ve görevlerine daha iyi odaklanabilmeleri amacıyla, eğitim öncesinde kısırlaştırıldığından genç yaşlarda iken yetiştiricilikte kullanılamamaktadırlar. Bu tür köpeklerin gen bankalarının oluşturulması için embriyolarının dondurularak saklanması önemlidir.[40]

Köpek embriyolarında başarılı bir kriyoprezervasyon için en ciddi problem, embriyoların sitoplazmalarını çevreleyen yüksek miktarda lipid içeriktir. Benzer lipid partikülleri domuz ve sığır embriyolarında da görülmektedir. Ancak lipitlerin yoğunluğu köpek embriyolarında daha fazladır.[41] Buna ilave olarak, dişi köpeklerin reprodüktif sisteminin anatomisi ve uterusa vajinadan ulaşılmasının güç olması nedeniyle, cerrahi embriyo transferi bugüne dek uygulanabilen tek seçenek olarak kabul görmüştür.[34] Buna karşılık Abe ve ark. köpeklerde cerrahi olmayan yöntemle, başarılı embriyo kriyoprezervasyonu ardından embriyo transferi gerçekleştirmişlerdir.[40] Bu amaçla araştırmacıların uyguladıkları prosedür şöyledir:[40] Suni tohumlama sonrasında eksize edilen reprodüktif organlardan köpek embriyoları toplanmıştır. Kriyoprezerve embriyolar 4 hücreli morula evresine geldiğinde cerrahi olmayan yöntemle alıcı köpeklerin uterusuna sistoskop kullanılarak nakledilmiştir.

Yavaş dondurma yöntemi, memeli embriyolarının kriyoprezervasyonu için kullanılan ilk metottur. Kriyopro-

tektan (gliserol veya dimetil sulfoksit) içeren koruyucu maddeler kullanılarak embriyoların daha iyi penetrasyonu sağlanır. Bu embriyolar steril bir pipete doldurulur, önceden programlanmış bir dondurucuda yavaşça dondurulur ve sıvı azot içinde saklanır.[42] Kriyoprotektanların embriyolardaki toksisitesi ve donma için yeterli zamanın gerekliliği bu yöntemde karşılaşılan en önemli sorunlardır. Tüm bunlara rağmen kriyoprezervasyon tekniği kullanılarak dondurulmuş, daha sonra eritilerek embriyoların transferi ile çok sayıda köpek yavrusu elde edilmiştir.[43] Bu yöntemden biraz farklı olarak vitrifikasyon yöntemi olarak adlandırılan başka bir embriyo kriyoprezervasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, yukarıda belirtilen yönteme göre daha az miktarlarda kriyoprotektan, kullanılır ve steril pipetlere doldurulan embriyolar sıvı nitrojene yerleştirilmesi ile protokol tamamlanır.[42] Bu yöntem diğerine göre daha kullanışlıdır, çünkü programlanmış bir dondurucu cihazı gerektirmez ve protokol daha kısa sürer. Ayrıca, çözdürülmüş embriyolar için yüksek hayatta kalma oranına sahiptir. Vitrifikasyon yönteminde, minimum hacimli soğutma (MHS) yöntemi dikkat çekmektedir.[44] Embriyolar, kriyoprotektan ihtiva eden küçük hacimli (<0,1 ml) vitrifiye edici bir koruyucu çözelti içerisinde tutulur ve sıvı azotta depolanır. Yavaş dondurma yöntemine kıyasla bu metotta kristalizasyon meydana gelmediğinden, ısınma sonrasında yüksek bir embriyo sağkalım oranı elde edilebilir.[45,46]

Vitrifikasyon metoduyla dondurulmuş köpek embriyolarından yavruların elde edildiği ilk çalışma Abe ve ark. tarafından yapılmıştır.[40] Bu çalışmada, rijid sistoskop ile servikal kanaldan geçerek uterusun içine eritilmiş embriyolar transfer edildikten sonra, köpek embriyolarının hayatta kalma hızının iyi ve konsepsiyon oranının yüksek olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, köpekler için daha az invaziv olan rijid sistoskop kullanımıyla transfer işleminin başarıyla gerçekleştirilmesi cerrahi yöntemin önüne geçmiştir. Ancak küçük ırk köpeklerde bu metodun uygulanması özel bir eğitimi gerektirmektedir. Bunun aksine, cerrahi yolla yapılan intrauterin ET, özel bir araç gerektirmez ve tüm köpeklere uygulanabilir.[6] Bununla birlikte, Hori ve ark. yaptıkları bir çalışmada; diğer memeli türlerinin embriyolarının kriyoprezervasyonu için kullanılan yavaş dondurma yöntemine göre köpek embriyosu kriyoprezervasyonu için vitrifikasyon yönteminin daha uygun olduğu sonucuna varmışlardır.[47]

Sonuç olarak, köpeklerde embriyo eldesi ve saklanmasında farklı yöntemler kullanılsa da embriyonun nakli amacıyla cerrahi veya cerrahi olmayan iki metot mevcuttur. Nadir bulunan ırkların devamlılığı, özel amaçlar için eğitilmiş köpeklerin genetik aktarımlarının sağlanması, köpeklerde çiftleşme ile bulaşan hastalıkların eliminasyonu ve infertilitenin değerlendirilmesi amacıyla embriyonun korunması ve embriyo transferi faydalı girişimlerdir.

KAYNAKLAR

1. Hewitt DA, Watson PF, England GC. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. Theriogenology. 1998;49:1083-101.
2. Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, et al. Effects of estradiol-17beta and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. Theriogenology. 2005;63:1342-53.
3. Luvoni GC. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. Reprod Nutr Dev. 2000;40:505-12.
4. Renton JP, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJA, Mullaney J, et al. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (Canis familiaris). J Reprod Fertil. 1991;93:221-31.
5. Tsutsui T, Hori T, Okazaki H, Tanaka A, Shiono M, Yokosuka M, et al. Transfer of canine embryos at various developmantel stages recoverd by hysterectomy or surgical uterine flushing. J Vet Med Sci. 2001;63(4):401-5.
6. Concannon PW, Tsutsui T, Shille V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. J Reprod Fertil. 2001;57:169-79.
7. Feldman EC, Nelson RW. Canine female reproduction. canine and feline endocrinology and reproduction. 3rd ed. USA: Elsevier Science; 2004. p.751-928.
8. Kienzle BK. Untersuchungen zur embryogewinnung beim hund. München: Diss Med Vet. 2006. p.1-88.
9. Holst PA, Phemister RD. The prenatal development of the dog: preimplantation events. Am J Vet Res. 1971;35(3):401-6.
10. Tsutsui T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. J Reprod Fert Suppl. 1989;39:269-75.
11. Bouchard GF, Solorzano N, Concannon PW, Youngquist RS, Bierschwall CJ. Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesteron. Theriogenology. 1991;35(3):603-11.
12. Bysted BV, Dieleman SJ, Hyttel P, Greve T. Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. J Reprod Fertil Suppl. 2001;57:181-6.
13. Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. Biol Reprod. 1992;46:853-8.
14. Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. J Reprod Fert Suppl. 1993;47:227-9.
15. Nickson DA, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJA, Renton JP. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. J Reprod Fert Suppl. 1993;47:231-40.

16. Hewitt DA, England GCW. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. Theriogenology. 1998;49(5): 957-66.
17. Fujii M, Otoi T, Murakami M, Tanaka M, Une S, Suzuki T. The quality and maturation ot bitch oocytes recovered from ovaries by slicing method. J Vet Med Sci. 2000;62(3):305-7.
18. Otoi T, Murakami M, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Une S, et al. Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro. Vet Rec. 2000;146:52-5.
19. Rodrigues B, Dos Santos L, Rodrigues J. Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. Mol Reprod Dev. 2004;67(2):215-23.
20. Bogliolo L, Zedda MT, Ledda S, Leoni G, Naitana S, Pau S. Influence of coculture with oviductal epithelial cells on in vitro maturation of canine oocytes. Reprod Nutr Dev. 2002;42:265-73.
21. Luvoni GC, Luciano AM, Modina S, Gandolfi F. Influence of different stages of the estrous cycle on cumulus-oocytecommunications in canine oocytes: effects on the efficiency of in vitro maturation. J Reprod Fertil Suppl. 2001; 57:141-6.
22. Farstad W. Assisted reproductive technology in canis species. Theriogenology. 2000;53(1): 175-86.
23. Bolamba D, Borden-Russ KD, Durrant BS. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. Theriogenology. 1998;49:933-42.
24. Mahi CA, Yanagimachi R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. J Exp Zool. 1976;196(2):189-96.
25. Nickson DA, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJA, Renton JP. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. J Reprod Fert Suppl. 1993;47:231-40.
26. England GCW, Verstegen JP, Hewitt DA. Pregnancy following in vitro fertilization of canine oocytes. Vet Rec. 2001;148:20-2.
27. Hewitt DA, England GCW. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. Anim Reprod Sci. 1999;55:63-75.
28. Evecen M, Baran A, Alkan S, Özdaş ÖB, Tek Ç. [The effects of BSA and FCS on in vitro maturation of bitch oocytes]. Turk J Vet Anim Sci. 2002;26:1453-8.
29. Hossein MS, Kim MK, Jang G, Fibrianto HY, Oh HJ, Kim HJ, et al. Influence of season and parity on the recovery of in vivo canine oocytes by flushing fallopian tubes. Anim Reprod Sci. 2007;99(3-4):330-41.
30. Jang G, Kim MK, Oh HJ, Hossein MS, Fibrianto YH, Hong SG, et al. Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer. Theriogenology. 2007;67:941-7.
31. Archbald LF, Baker BA, Clooney LL, Godke RA. A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. Vet Med Small Anim Clin. 1980;75:228-38.
32. Kinney GM, Pennycook JW, Schriver MD, Templeton JW, Kraemer DC. Surgical collection and transfer of canine embryos. Biol Reprod. 1979;20:96A.
33. Fulton RM, Keskintepe L, Durrant BS, Fayrer-Hosken R. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for the treatment of canine infertility. Theriogenology. 1998;49:366.
34. Tsutsui T, Hori T, Endo S, Hayama A, Kawakami E. Intrauterine transfer of early canine embryos. Theriogenology. 2006;66:1703-5.
35. Jang G, Oh HJ, Kim MK, Fibrianto YH, Hossein MS, Kim HJ, et al. Improvement of canine somatic cell nuclear transfer procedure. Theriogenology. 2008;69:146-54.
36. Revelli A, Tur-Kaspa T, Confino E. Ultrasound guidance in embryo transfer. In: Stadtmauer L, Tur-Kaspa I, eds. Ultrasound Imaging in Reproductive Medicine. Springer, Cham; 2019. p.335-43.
37. Uyar A, Bener A, Ciray HN, Bahceci M. Physician experience in performing embryo transfers may affect outcome. Fertility & Sterility. 2011;95:1860-2.
38. Sankpal RS, Confino E, Matzel A, Cohen LS. Investigation of the uterine cavity and fallopian tubes using three-dimensional saline sonohysterosalpingography. International Journal of Gynaecology and Obstetrics. 2001;73:125-9.
39. Ishibashi H, Motohashi HH, Kumon M, Yamamoto K, Okada H, Okada T, et al. Ultrasound-guided non-surgical embryo collection in the common marmoset. Reprod Boil. 2013;13:139-44.
40. Abe Y, Suwa Y, Asano T, Ueta YY, Kobayashi N, Ohshima N, et al. Cryopreservation of canine embryos. Biol Reprod. 2011;84:363-8.
41. Abe Y, Suwa Y, Ueta YY, Suzuki H. Preimplantation development in Labrador retrievers. J Reprod Dev. 2008;54:135-7.
42. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. Reproduction. 2011; 141:1-19.
43. Martínez AG, Matkovic M. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. Theriogenology. 1998;49:1039-49.
44. Abdalla H, Shimoda M, Hara H, Morita H, Kuwayama M, Hirabayashi M, et al. Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. Theriogenology. 2010;74:1028-35.
45. Cobo A, Bellver J, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Pellicer A, et al. New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification. Reprod Biomed Online. 2008;17:68-72.
46. Vallorani C, Spinaci M, Bucci D, Porcu E, Tamanini C, Galeati G. Pig oocyte vitrification by Cryotop method and the activation of the apoptotic cascade. Anim Reprod Sci. 2012; 135:68-74.
47. Hori T, Ushijima H, Kimura T, Kobayashi M, Kawakami E, Tsutsui T. Intrauterine embryo transfer with canine embryos cryopreserved by the slow freezing and the Cryotop method. J Vet Med Sci. 2016;78(7):1137-43.