

ÖZGE BARI

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANA BİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2023



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ
ANA BİLİM DALI



**KÖPEKLERDE NANO-OZON SOLÜSYONUNUN
IN VITRO NÜKLEER OOSİT MATURASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

ÖZGE BARI

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2023





T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ
ANA BİLİM DALI



**KÖPEKLERDE NANO-OZON SOLÜSYONUNUN
IN VİTRO NÜKLEER OOSİT MATURASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

Özge BARI

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN
Prof. Dr. Rabia Gözde ÖZALP

BURSA-2023

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “**Köpeklerde Nano-Ozon Solüsyonunun *In Vitro* Nükleer Oosit Maturasyonu Üzerine Etkisi**” 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.

Özge BARI
24.11.2023

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

24/11/2023

Adı Soyadı: Özge BARİ

Ana Bilim Dalı: Veteriner/ Doğum ve Jinekoloji

Tez Konusu: Köpeklerde Nano-Ozon Solüsyonunun *In Vitro* Nükleer Oosit Maturasyonu Üzerine Etkisi

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

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. R. Güzde ÖZALP

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN	II
KABUL ONAY SAYFASI... ..	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Köpeklerde Folikülogenezis ve Oosit İlişkisi	3
2.2. Köpeklerde Ovulasyon ve <i>In Vivo</i> Maturasyon Süreci	4
2.3. Maturasyon Sürecinde Meydana Gelen Biyokimyasal Değişiklikler	5
2.4. <i>In Vivo</i> Maturasyon Sürecinde Mayozun Genetik Kontrolü	6
2.5. Köpek Oositlerinin <i>In Vitro</i> Maturasyonu (IVM)	8
2.5.1. <i>In Vitro</i> Maturasyonu Etkileyen Faktörler.....	8
2.5.1.1. Donör İlişkili Faktörler	8
2.5.1.1.1.Köpeğin Yaşı ve Irkı	8
2.5.1.1.2.Köpeğin Seksüel Dönemi	9
2.5.1.1.3. Folikül Büyüklüğü ve Oosit Çapı.....	10
2.5.1.2. Kültür ile İlişkili Faktörler.....	11
2.5.1.2.1. Kültür Medyum ve Süresi.....	11
2.5.1.2.2. Kültür Ortamına Eklenen Katkı Maddeleri	12
2.5.1.2.3. Oksidatif Stres	14
2.5.1.2.3.1. <i>In Vitro</i> Koşullarda Oksidatif Strese Karşı Antioksidan Savunması.....	15
2.5.1.2.3.1.1. Malondialdehit (MDA).....	16
2.5.1.2.3.1.2. Glutasyon (GSH).....	16
2.5.1.2.3.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)	17
2.5.1.2.3.1.4. Katalaz (CAT)	18
2.5.1.2.3.1.5. Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi.....	18
2.5.1.2.3.2. <i>In Vitro</i> Kültür Ortamına Antioksidan Bileşiklerin Eklenmesi	19
2.6. Ozon (O ₃) Biyolojisi ve Etkileri	21
2.7. Çalışmanın Amacı ve Hipotezi	23
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1.Hayvan Materyali	25
3.2. Çalışma Materyalinin Elde Edilmesi	25
3.2.1.Siklusun Belirlenmesi ve Uygun Ovaryum Seçimi	25
3.2.2. Ovariohisterektomi (OHE) Operasyonları.....	25
3.3. Ovaryumların İşlenmesi ve Oositlerin Elde Edilmesi	26
3.4. Oositlerin <i>In Vitro</i> Maturasyonu	27
3.5. Oositlerin Partenogenetik Aktivasyonu.....	28
3.6. Oositlerin Boyanması ve Değerlendirilmesi.....	28
3.7. Örneklerin Toplanması ve Analizi	29
3.7.1. Maturasyon Medyum Örneklerinin Toplanması	29

3.7.1.1. Malondialdehit (MDA) Analizi	29
3.7.1.2. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Analizi	29
3.7.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi	30
3.7.1.4. Ferrik Redüksiyon/Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi	30
3.7.2. Oositlerin Toplanması	31
3.7.2.1. mRNA İzolasyonu ve Real-Time (RT) PCR.....	31
3.7.2.1.1. mRNA İzolasyonu ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	31
3.7.2.1.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	32
3.7.2.1.3. Primerlerin Belirlenmesi ve Optimizasyonu	32
3.7.2.1.4. RT-PCR ve Değerlendirme	33
3.8. İstatistiksel Değerlendirme.....	34
3.9. Çalışma Esnasında Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	34
3.9.1. PBS Hazırlanması.....	38
3.9.2. TL-HEPES Stok ve Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması.....	38
3.9.3. Maturasyon Medyumunun Hazırlanması	39
3.9.4. Partenogenetik Aktivasyon Solüsyonlarının Hazırlanması	39
3.9.5. Partenogenetik Aktivasyon Sonrası Maturasyon Medyumu	40
3.9.6. Hoechst 33258 Boyasının Hazırlanması.....	40
3.9.7. Alet ve Malzeme Listesi	41
4. BULGULAR	43
4.1. Gruplara Göre Nükleer Morfoloji Sonuçları	43
4.1.1. Grup A (Kontrol Grubu) Nükleer Morfoloji Sonuçları	44
4.1.2. Grup B Nükleer Morfoloji Sonuçları.....	44
4.1.3. Grup C Nükleer Morfoloji Sonuçları.....	45
4.1.4. Grup D Nükleer Morfoloji Sonuçları	45
4.1.5. Grup E Nükleer Morfoloji Sonuçları.....	45
4.2. Nano-Ozon Solüsyonunun Oosit Nükleer Morfoloji Sonuçlarına Etkisi	46
4.3. Nano-Ozon Solüsyonunun Antioksidan ve Oksidan İlişkili Enzim Seviyelerine Etkisi.....	51
4.3.1. Malondialdehit (MDA) Seviyelerinin Sonuçları	51
4.3.2. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Sonuçları.....	52
4.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyelerinin Sonuçları	52
4.3.4. Ferrik Redüksiyon/Antioksidan Güç (FRAP) Değerlerinin Sonuçları.....	53
4.4. Nano-Ozon Solüsyonunun Oosit Maturasyonu İlişkili Gen Ekspresyonlarına Etkisi.....	54
4.4.1. Siklin Bağımlı Kinaz1 (CDK1) Gen Ekspresyonu Sonuçları	54
4.4.2. Siklin B1 Gen Ekspresyonu Sonuçları	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
5.1. Nano-Ozon Solüsyonunun Antioksidan ve Oksidan İlişkili Enzim Seviyelerine Etkisi.....	63
5.2. Nano-Ozon Solüsyonunun Oosit Maturasyonu İlişkili Gen Ekspresyonlarına Etkisi.....	67
6. KAYNAKLAR.....	72
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	92
8. EKLER	95
9. TEŞEKKÜR.....	97
10. ÖZGEÇMİŞ	98

TÜRKÇE ÖZET

Köpek oositlerinin *in vitro* maturasyon (IVM) oranları diğer türlere göre oldukça düşüktür. IVM'deki önemli problem, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu olup, bunun önlenmesinde en basit yaklaşım, medyumların antioksidan madde ile hazırlanmasıdır. Bu çalışmada, hem oksidan hem de antioksidan özelliğe sahip nano-ozon solüsyonu kullanıldı. Nano-ozon solüsyonunun köpek oositlerinde nükleer morfolojiye etkisi, kültür medyumunun oksidan/antioksidan durumu ve maturasyon ilişkili genlerin (Siklin bağımlı kinaz 1 (CDK1) ve Siklin B1) ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. Ek olarak, antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi için demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) testi kullanıldı.

Kumulus-oosit kompleksi (COCs) 130 köpekten toplandı. COCs farklı konsantrasyonlarda nano-ozon solüsyonu eklenen maturasyon medyumunda inkübe edildi (0, 0,5, 1, 2, ve 5 µg/ml). Kültür medyumları toplanarak Malondialdehit (MDA), Glutasyon (GSH), Süperoksit-dismutaz (SOD) ve FRAP ölçümü için saklandı. Partenogenetik aktivite sonrasında, nükleer morfolojiler mikroskop altında germinal vezikül (GV), germinal vezikül parçalanması (GVBD), metafaz I (MI), metafaz II (MII), ve dejenere (DEG) oosit olarak değerlendirildi. Aktivasyon sonrası toplanan oositlerde, CDK1 ve Siklin B1 gen ekspresyonları Real-Time PCR ile değerlendirildi. Nükleer morfoloji oranları gruplar arasında farklı bulundu ($p<0,05$). Mayotik süreci tamamlayan oosit oranı (MI+MII) en yüksek Grup B ve C'de bulunurken, MII aşamasına ulaşan en yüksek oosit sayısı Grup C'de gözlemlendi. MDA ve SOD konsantrasyonları arasında fark bulunamadı ($p>0,05$) ancak GSH ve FRAP düzeyleri istatistiksel olarak farklı bulundu ($p<0,05$). Bunun ötesinde CDK1 ve Siklin B1 gen ekspresyonları gruplar arasında farklı bulundu ($p<0,05$). En yüksek oran Grup B ve C'de belirlendi.

Sonuçlarımız nano-ozon'un IVM'de oksidatif stres parametrelerini hafifleterek MII aşamasına gelişimi indüklemiş ve maturasyon-ilişkili gen ekspresyonunu artırmıştır. En uygun doz olarak 0,5 µg/ml, 1 µg/ml nano-ozon katkısının IVM'de kullanılması önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, CDK1/Siklin B1 gen ekspresyonu, *In Vitro* Maturasyon, Köpek, Nano-Ozon

İNGİLİZCE ÖZET

Effect of Nano-ozone Solution on *In Vitro* Nuclear Oocyte Maturation in Dogs

In vitro maturation rates of canine oocytes are rather lower than other species. Long incubations and insufficient conditions of maturation culture affect negatively the success of *in vitro* maturation (IVM). The most important problem during the maturation process is the production of high amount of reactive oxygen species (ROS) that is the end-point of mitochondrial lipid peroxidation. The basic approach to prevent ROS production is to prepare an *in vitro* culture medium with antioxidant substances. In this study, a nano-ozone solution, which has both oxidant and antioxidant properties, was used. The effect of nano-ozone on the nuclear morphology of canine oocytes, oxidant and antioxidant status of maturation culture medium, and maturation-related (Cyclin Dependent Kinase 1 (CDK1) and Cyclin B1) gene expression levels were investigated. Additionally, the Ferric ion-reducing antioxidant power (FRAP) method was used to determine antioxidant capacity.

The cumulus-oocytes complex (COCs) was collected from 130 dogs after the ovariectomy operation. The COCs were incubated in *in vitro* maturation culture media, supplemented with nano-ozone solution at different concentrations (0, 0.5, 1, 2, and 5 µg/ml). After maturation of 72 hours, the culture medium was stored in Eppendorf tubes in order to determine Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH), Superoxide Dismutase (SOD), and FRAP concentrations. Oocytes were parthenogenetically activated and nuclear morphology was classified as Germinal Vesicle intact (GV), Germinal Vesicle Break Down (GVBD), Metaphase I (MI), Metaphase II (MII), and degenerated (DEG) oocytes under light microscope. Additionally, cultured oocytes were collected after activation. The oocytes were used for mRNA isolation and Real-Time PCR for expression of CDK1 and Cyclin B1 genes. The rate of oocyte nuclear morphology (GVBD, MI, MII, and DEG) was statistically different between groups ($p<0.05$). The rate of oocytes that completed the meiotic process (MI+MII) was higher in Group B and Group C, whereas the rate of oocytes reaching the MII stage was highest in Group C. No difference was observed between the groups in terms of MDA and SOD ($p>0.05$). GSH and FRAP levels were statistically different between groups ($p<0.05$). Compared to the control group, GSH and FRAP levels were higher in nano-ozone-supplemented groups. Furthermore, CDK1 and Cyclin B1 gene expressions were also statistically different between groups ($p<0.05$). Expression levels of both genes were high in Group B and Group C.

Our results suggested that nano-ozone solution could alleviate oxidative stress parameters during IVM, induce development to MII stage, and increase the expression levels of maturation-related genes. Low doses of nano-ozone supplementation during canine IVM studies could be advised and the most appropriate and effective doses are 0.5 µg/ml and 1 µg/ml could be suggested.

Keywords: Antioxidant, CDK1/Cyclin B1 gene expression, *In Vitro* Maturation, Canine, Nano-Ozone

1. GİRİŞ

Evcilleştirilen ilk hayvan olan köpeklerin, insanlara yakınlıkları nedeniyle toplumdaki rolü artmış ve odak haline gelmiştir (Chastant-Maillard ve ark., 2010; Larson ve ark., 2012). İnsan dahil birçok memelide uygulanan biyoteknolojik çalışmalar, köpeklerde başarılı şekilde uygulanamamaktadır. Ancak son zamanlarda, nesli tükenmekte olan türlerin korunması, insanlara benzer yönlerinin olması nedeniyle yeni biyolojik model olması, reproduksiyona katkı sağlamak gibi amaçların olması, köpeklerde biyoteknolojik çalışmaları hızlandırmıştır (Chastant-Maillard ve ark., 2010; Hytönen, & Lohi, 2016; Rodrigues, dos Santos, & Rodrigues, 2004). Köpeklerin reproduktif siklus ve gamet biyolojisindeki farklılıklar, yardımcı üreme teknolojisinin ilerlemesine engel olmuştur (Concannon, 2011; Guraya, 1965; Lopes, Alves, Carvalho, Luvoni, & Rocha, 2011).

Köpekler, monoöstrik hayvanlardır. Uzun bir luteal döneme ve zorunlu anöstrus dönemlerine sahiptir. Spontan ovulasyon sonucunda, diğer türlerden farklı olarak, olgunlaşmamış oosit (immatür) ovule olur (Concannon, 2011). Immatür oosit, ovidukt içerisinde maturasyon sürecini tamamlayarak mayoz II aşamasına girer ve metafaz II (MII) aşamasında mayotik blokaja uğrar (Concannon, 2011; Reynaud ve ark., 2005; Tripathi, Kumar, & Chaube, 2010). Köpeklerin spesifik özelliklerinin bulunması, diğer türlere göre daha düşük *in vitro* maturasyon (IVM) başarısına neden olmaktadır. Köpek oositlerinin sadece %10-20'sinin *in vitro* mayotik maturasyonu tamamlaması, *in vitro* embriyo üretim başarısını da etkilemektedir (Luvoni, Chigioni, Allievi, & Macis, 2005). Oositlerin mayoz yeterliliğinin ya da kültür koşullarının yetersiz olması düşük maturasyon oranlarına sebep olduğundan, *in vitro* koşulların iyileştirilmesi gerekmektedir (Luvoni, 2000; Pereira, Bicuda, & Lopes, 2012).

In vitro kültür ortamını etkileyen çok sayıda faktör bulunmaktadır. Fakat ön plana çıkan ana faktörlerden biri oksidatif stres (OS)'tir (Du Plessis, Makker, Desai, & Agarwal, 2008; Soto-Heras, & Paramio, 2020). OS, oosit gelişimini ve maturasyonunu olumsuz etkilemektedir. Kültür koşullarında OS'yi ve oositler üzerindeki etkisini önlemedeki temel yaklaşım, *in vitro* antioksidan maddelerin kullanımıyla mümkün olmaktadır (Soto-Heras, & Paramio, 2020). IVM esnasında antioksidan madde kullanılması, antioksidan mekanizmanın aktivasyonunu sağlayarak reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesinin azalmasına neden olmaktadır.

Bunun sonucunda, oosit maturasyonu olumlu etkilenmektedir (Hosseini ve ark., 2007; Moawad, Salama, Badr, & Fathi, 2021; Pang ve ark., 2018). Diğer etki ise, oosit gelişimi ve maturasyon ilişkili gen ekspresyonlarının artışına neden olarak, mayotik sürecin düzenlenmesine katkı sağlamaktır (Park ve ark., 2021; Wang ve ark., 2023).

Bugüne kadar, köpek IVM çalışmalarının başarısının artırılabilmesi için çeşitli protokoller oluşturulmuştur. Buna rağmen, *in vitro* oosit gelişimi ve maturasyonunun tamamlanması için optimum ortamın sağlanmasındaki zorluklar devam etmektedir. Ayrıca köpek oositlerinde moleküler mekanizma ilişkili çalışmaların çok az sayıda olması, oosit maturasyon sürecinin anlaşılmamasına yol açmıştır. Tez çalışmada, nano-ozon kullanılarak, *in vitro* koşullarda oositlerin nükleer morfolojisine, kültür ortamında oksidan ve antioksidan mekanizmadaki enzim düzeylerine ve maturasyon mekanizmasındaki ekspresyonel değişimlere etkisinin belirlenmesi ele alınmıştır. Ayrıca, hem oksidan hem antioksidan özellikte olduğu düşünülen nano-ozon solüsyonunun, OS'yi önlemede ve köpek oositlerinin IVM başarısında etkili olup olmayacağı sorularına cevap aranmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Köpeklerde Folikülogenezis ve Oosit İlişkisi

Köpekler, seksüel siklus özellikleri ve oosit biyolojisi bakımından sıra dışı canlılardır. Köpeklerde ovaryum gelişimi fetal hayatta başlar. Fetal ovaryumda sadece oogoniyalar bulunur. Fare, inek, insan gibi memeli canlıların aksine, foliküller doğumdan sonra ortaya çıkar. Doğumdan yaklaşık 1 ay sonra ortaya çıkan ilk foliküller, primordiyal foliküllerdir (Andersen, & Simpson, 1973). Morfolojik olarak bu foliküller, tek sıra yassı epitelden oluşan, zona pellusidadan (ZP) yoksun, yaklaşık 25 µm çapında oosit içerir (Barber, Lee, Steffens, Ard, & Fayrer-Hosken, 2001; Songsasen, Fickes, Pukazhenti, & Wildt, 2009).

Köpeklerde folikülogenezis, 2 aşamada gerçekleşir. Oosit gelişimi ve granüloza hücre proliferasyonundan oluşan preantral aşama ve granüloza hücre proliferasyonu, antral sıvı akümüasyonu ile ilişkili, antral aşamalardan oluşmaktadır (Songsasen ve ark., 2009).

Folikülogenezis ile primordiyal foliküllerin aktivasyonu ve büyümesi başlar. Foliküllerin aktivasyonu ve büyüme aşaması, gonadotropik hormonlardan bağımsız, intraovaryan faktörler tarafından düzenlenir (Abdel-Ghani, Shimizu, & Suzuki, 2014; Nagashima, Hansen, Songsasen, Travis, & Place, 2016; Palomino, & De Los Reyes, 2016). Gelişen foliküllerde antrum oluşmasıyla, preantral foliküllerde ekstraovaryan regülasyon meydana gelir. Böylece preantral foliküller, gonadotropinlere bağımlı hale gelir (Nagashima, Wildt, & Songsasen, 2010; Orisaka, Tajima, Tsang, & Kotsuji, 2009).

Primordiyal folikül hücreleri, küboidal hale geçerek primer folikülü oluşturur (Songsasen ve ark., 2009). Ortalama 30 µm çapındaki oosit çevresinde glikoprotein yapıda, ZP belirgin hale gelir (Barber ve ark., 2001; Songsasen ve ark., 2009). Bu aşamada fosfolipitler ve trigliseritlerden oluşan lipid damlacıkları, oositte birikmeye başlar. Lipid damlacıklarının fazla miktarda birikmesi, diğer türlerden farklı olarak köpek oosit sitoplazmasının koyu ve homojen görünmesine neden olur (Guraya, 1965). Köpek oositlerinde lipid damlacıklarının sentezi, oosit maturasyonunun en erken belirtilerinden biri olarak kabul edilmektedir (Tesoriero, 1982). Oosit çevresinde birkaç sıra granüloza hücrelerinin meydana gelmesiyle sekonder folikül

oluşur. Folikül sıvısının salgılanması ve antral kavitenin şekillenmesiyle preantral folikül meydana gelir (Songsasen ve ark., 2009). Foliküller, granüloza hücre proliferasyonunun artması ve teka hücrelerinin oluşmasıyla gonadotropinlere bağımlı hale gelir (Saint-Dizier ve ark., 2008). Antral faz foliküllerinin büyümesiyle, 120 µm'den büyük oosite sahip 2-8 mm büyüklüğünde preovulatorik foliküller meydana gelir (Reynaud, de Lesegno, Chebrou, Thoumire, Chastant-Maillard, 2009; Reynaud ve ark., 2012).

2.2. Köpeklerde Ovulasyon ve *In Vivo* Maturasyon Süreci

Köpeklerde seksüel siklusun kontrolü, hipotalamus, hipofiz ve gonadlar tarafından düzenlenir. Anöstrusun sonunda, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salınımında artış şekillenir. Bu da adenohipofizden folikül stimüle edici hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH) salınımını indükler (Concannon, 2011). Gonadotropinlerin seviyesindeki artış, folikül büyümesini başlatarak gonadal steroidogenezisi uyarır (England, Russo, & Freeman, 2009; Fahiminiya ve ark., 2010). Anöstrusun sonuna doğru gonadotropik stimülasyona cevap veren foliküller gelişir (Kooistra, & Okkens, 2001). Folikül büyüklüğü arttıkça, folikül sıvısında bulunan steroidlerin konsantrasyonu da artar. Oosit gelişimine, steroid hormon varlığında devam eder (Fahiminiya ve ark., 2010). Östradiol-17β seviyesi, preovulatorik LH pikinden önce maksimum seviyeye ulaşır. LH pikinin meydana gelmesiyle, preovulatorik foliküllerin luteinizasyonu gerçekleşir (Concannon, McCann, & Temple, 1989). Başlangıçta bazal seviyede olan progesteron artmaya, östradiol-17β konsantrasyonu azalmaya başlar (Hollinshead, & Hanlon, 2019; Reynaud ve ark., 2009). LH pikinden yaklaşık 48-60 saat sonra, progesteron konsantrasyonunun >5 ng/ml'ye ulaşması sonucu ovulasyon meydana gelir (Concannon, 2009; Groppetti ve ark., 2015; Hollinshead, & Hanlon, 2019). Ovule olan oosit, germinal vezikül (GV) aşamasında, henüz olgunlaşmamış (immatür) haldedir (De Lesegno, Reynaud, Pechoux, Thoumire, & Chastant-Maillard, 2008; Reynaud ve ark., 2005). Köpek oositinin fertilizasyona hazır hale gelmesi için, mayotik olgunlaşmasını tamamlaması gerekir. Ovule oosit maturasyonu, yüksek progesteron varlığında, 48-72 saat içinde ekstra-foliküler, yani ovidukt içinde tamamlanır (Concannon, 2011; Reynaud ve ark., 2005).

Oosit maturasyon süreci, nükleus ve sitoplazmada meydana gelen değişiklikleri içerir. Köpek oositlerinin maturasyon sürecinde meydana gelen kromozom konfigürasyonu ve kinaz aktiviteleri, diğer memeli türleriyle benzerlik gösterir (Saint-Dizier, Reynaud, & Chastant-Maillard, 2004). Nükleer maturasyon, diploten aşamasında blokaja uğrayan oositlerin, mayotik bölünmeye girmesiyle yeniden başlar. Nükleer zarfın parçalanması ve nükleolusun kaybolmasıyla *germinal vesicle break down* (GVBD) oluşur. GVBD oluşumundan sonra, kromozom yoğunlaşması, kromozom iç iplikçiklerinin oluşumu ve birinci polar cisimciğin (PB) ekstrüzyonu gerçekleşir. Böylece ilk mayotik bölünme (Mayoz I, MI) tamamlanmış olur (Sen, & Caiazza, 2013; Tripathi ve ark., 2010). MI'in tamamlanmasının ardından oosit, mayoz II'ye girer ve MII aşamasında durur (Tripathi ve ark., 2010). Fertilizasyon ile mayoz bölünme yeniden başlayarak maturasyon tamamlanır (Sen, & Caiazza, 2013).

2.3. Maturasyon Sürecinde Meydana Gelen Biyokimyasal Değişiklikler

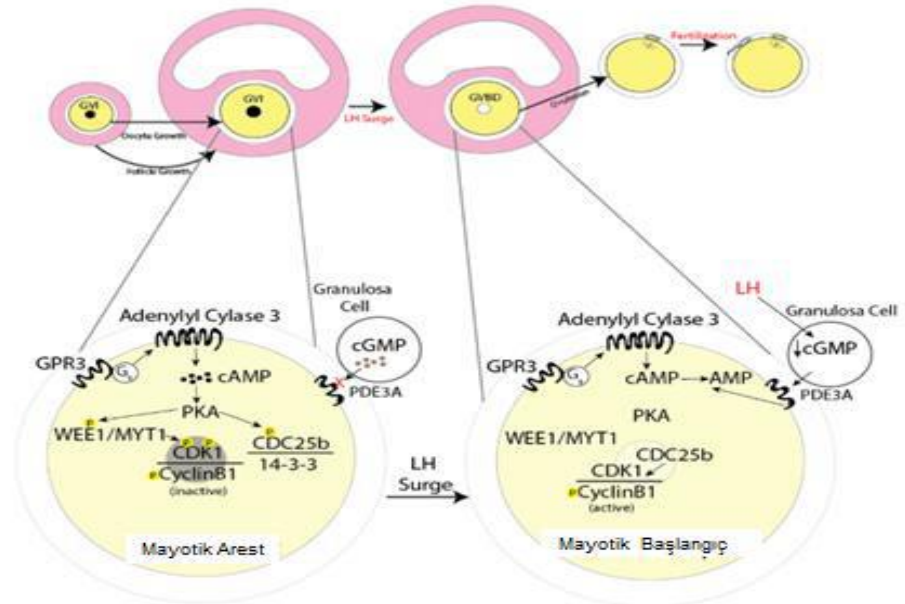
Başarılı fertilizasyon ve ardından embriyonik gelişim için, oositin maturasyonunu tamamlaması gerekir. *In vivo* oosit maturasyonu, oosit ve çevresindeki hücreler arasında farklı sinyal mekanizmalarıyla kontrol edilir (Kim ve ark., 2015; Salavati, Ghafari, Zhang, & Fouladi-Nashta, 2013; Thongkittidilok ve ark., 2020). Birçok memeli türünde, mayotik sürecin düzenlenmesinde siklik adenozin monofosfat (cAMP) sinyal molekülü olarak görev alır (Lee ve ark., 2017; Luciano, Franciosi, Modina, & Lodde, 2011; Rose, Gilchrist, Kelly, Thompson, & Sutton-McDowall, 2013; Zeng ve ark., 2013). cAMP sinyal mekanizmasında rol alan ve mayotik blokajın devamlılığını sağlayan *Gs protein-coupled* reseptörleri, fare, domuz ve insan oositlerinde tanımlanmıştır (DiLuigi ve ark., 2008; Mehlmann, 2005; Yang ve ark., 2012). *Gs* reseptörler, *G* protein ile birleşerek adenilil siklazın (AC) aktivasyonu gerçekleştirir (Horner ve ark., 2003; Zhang, & Xia, 2012). AC, adenozin trifosfatı (ATP) katalize ederek cAMP üretimini uyaran enzimdir (Mehlmann, 2005). Oosit içindeki cAMP'ye farklı iki kaynak katkı sağlar. cAMP molekülü, ya foliküler somatik hücreler tarafından üretilerek *gap junctions*'lar aracılığıyla oosit içine aktarılır ya da oositin yapısında bulunan bileşenler aracılığıyla oosit içinde üretilir (Luciano ve ark., 2011; Mehlmann, 2005; Thongkittidilok ve ark., 2020; Tiwari, &

Chaube, 2017; Yang ve ark.,2012). Oositte cAMP seviyesinin yüksek olması cAMP'ye bağımlı protein kinaz A (PKA)'nın aktivasyonunu sağlar. Aktive PKA, siklin bağımlı (Cdc25b) fosfataz ve G2 kontrol noktası kinaz 1/Miyelin transkripsiyon faktör 1 (Wee1/Myt1) kinaz gibi, CDK1 regülatörlerini fosforile eder (Han, & Conti, 2006; Oh, Han, & Conti, 2010; Pirino, Wescott, & Donovan, 2009). Cdc25b'nin inaktivasyonu ve Wee1/Myt1 kinazın aktivasyonu, *Maturation Promoting Factor* (MPF)'yi inaktif halde tutar. MPF aktivitesinin durdurulması, birçok memeli türünde mayotik blokajın devam etmesine neden olmuştur (Ferencova ve ark., 2022; Han, & Conti, 2006; Kim ve ark., 2015; Shimaoka, Nishimura, Kano, & Naito, 2009). Oosit içi cAMP seviyesinin azalması, mayozun yeniden başlamasını indükler. Kumulus hücrelerinin oositte ayrılması ve *gap junctions* aracılı bağlantının kesintiye uğraması, oosit içinde cAMP seviyesinin azalmasına neden olur (Ferré-Pujol ve ark., 2019; Otoi, Shin, Kraemer, & Westhusin, 2007; Tiwari, & Chaube, 2017). Ayrıca fosfodiesteraz enzimleri (PDE), cAMP degradasyonuna neden olarak cAMP seviyesini düşürür. *In vitro* oosit çalışmalarında PDE inhibitörlerinin, oosit içi cAMP üretimini ve mayotik süreci etkilediği bildirilmiştir (Bilodeau-Goeseels, 2011; Gupta, & Chaube, 2020; Rose ve ark., 2013; Shu ve ark., 2008; Thongkittidilok ve ark., 2020). cAMP konsantrasyonunun azalması, PKA'yı inaktive eder. Bu da Wee1/Myt1 inaktivasyonunu ve Cdc25b aktivasyonunu sağlayarak MPF aktivitesini artırır (Ferencova ve ark., 2022; Han, & Conti, 2006; Kim ve ark., 2015).

2.4. In Vivo Maturasyon Sürecinde Mayozun Genetik Kontrolü

Oositlerin mayotik blokajının devam etmesi ve mayozun yeniden başlaması, MPF aktivitesindeki değişikliklerle kontrol edilir. MPF, farklı iki proteinden oluşan kompleks yapıdır. Katalitik alt birim olan CDK1 ve düzenleyici alt birim olan siklin B'den oluşur (Tripathi ve ark., 2010). Hem mayoz hem de mitoz bölünmeyi, siklinler ve CDK'ler birlikte kontrol eder. Memeli canlılarda tanımlanan 3 tip siklin B mevcuttur (Bouftas, & Wassmann, 2019). Siklin B1 ve siklin B2, CDK1 ile; siklin B3 ise siklin bağımlı kinaz 2 (CDK2) ile kompleks yapı oluşturur (Li ve ark., 2018; Meng ve ark., 2020). Fare oositlerinde, mayotik maturasyona siklin B1'nin aracılık ettiği *in vitro* çalışmalarda bildirilmiştir (Adhikari ve ark., 2012; Ledan, Polanski,

Terret, & Maro, 2001; Tay, Hodgman, & Richter, 2000). GV aşamasındaki oositlerde CDK1 inaktif haldedir. CDK1'in çalışabilmesi için düzenleyici alt birim olan siklin B1'e bağlanarak CDK1-Siklin B1 kompleksini oluşturması gerekir. PKA kontrolünde olan iki MPF regülatörü (Wee1B ve Cdc25b) Cdk1-Siklin kompleksinin düzenlenmesine katılır (Han, & Conti, 2006). CDK1-Siklin B sitoplazmik yerleşim gösterir, GVBD oluşumu için gerekli olan belirli hedeflerin fosforilasyonu için nükleusa doğru yer değiştirmeye başlar. GVBD oluşumu sırasında MPF aktive olur ve mayoz sürecince artmaya devam eder (Marangos, & Carroll, 2004; Pereira, Bersano, Rocha, & Lopes, 2019; Porter, & Donoghue, 2003; Saint-Dizier ve ark., 2004) (Şekil 1). Oositler mayoz II'nin metafaz aşamasında, ikinci mayotik blokaja uğrar (Tripathi ve ark., 2010). Fertilizasyon ya da partenogenetik aktivasyon ile birlikte kalsiyum (Ca^{2+}) düzeyinin artışı indüklenir (Saint-Dizier, Renard, & Chastant-Maillard, 2001; Song ve ark., 2010). İntraselüler Ca^{2+} seviyesinin artmasıyla AC inaktivasyonu gerçekleşir ve oosit içindeki cAMP düzeyi azalır (Horner ve ark., 2003). cAMP'ye bağlı sinyal yollarının düzenlenmesiyle mayoz bölünme yeniden başlar ve maturasyon tamamlanır.



Şekil 1. Mayotik blokaj ve mayozun yeniden başlamasındaki sinyalizasyon mekanizmaları (Firmani, 2018).

2.5. Köpek Oositlerinin *In Vitro* Maturasyonu (IVM)

Genetik hastalıkların ortadan kaldırılması, nesli tükenmekte olan karnivor türlerinin korunması, insan hastalıklarının incelenmesi ve üremeye katkı sağlamak için, yardımcı üreme tekniklerine (YÜT) gereksinim vardır (Chastant-Maillard ve ark., 2010; Hytönen, & Lohi, 2016; Rodrigues ve ark., 2004). YÜT'lerin ilk basamağı IVM, *in vitro* embriyo üretimi için kritik aşamadır. IVM için oosit kaynağı, post mortem ya da ovariohisterektomi (OHE) sonucu alınan ovaryumlardır. Preovulatör folikülde ve oviduktta meydana gelen değişiklikler, IVM sırasında taklit edilmeye çalışılır (Luvoni, 2000). Birçok memeli türünde IVM sistemleri başarılı şekilde uygulanmakta ve maturasyon oranları %50-%80 arasında değişmektedir (Fan, Yang, Regouski, & Polejaeva, 2017; Kwak ve ark., 2012; Pioltine ve ark., 2021). Fakat köpeklerin siklus özelliklerinin ve oosit biyolojisinin farklı olması, etkili bir IVM sisteminin başarısını kısıtlamaktadır (Reynaud ve ark., 2005). Bu yüzden köpek oositlerinin IVM oranı (%30), diğer türlere göre düşük kalmaktadır (Qin ve ark., 2022). Köpek oositlerinin IVM oranını artırmak için, ideal kültür ortamlarının ve etkileyen faktörlerin belirlenmesi önemlidir (Pereira ve ark., 2012).

2.5.1. *In vitro* Maturasyonu Etkileyen Faktörler

2.5.1.1. Donör İlişkili Faktörler

2.5.1.1.1. Köpeğin Yaşı veırkı

Köpeğin yaşı, ovaryumdan elde edilecek oosit sayısını, kalitesini ve maturasyonunu etkilemektedir. Yaş artıkça oosit sayısı artmakta, fakat oosit kalitesi düşmektedir (Rocha, Bastos, Cunha, Adona, & Santos, 2006). Prepubertal köpeklerde (<6 aylık), oosit ve kumulus hücreleri arasındaki bağlantı gevşek yapıdadır. Ayrıca, oositlerde düşük seviyede protein sentezlenmesine rağmen, enerji metabolizması ve transkripsiyonel aktivite yüksektir. Bundan dolayı, prepubertal köpek oositlerinin tam olarak gelişmediği ve mayozu tamamlayamadığı belirtilmiştir (Haenisch-Woehl, Kölle, Neumüller, Sinowatz, & Braun, 2003). Yaş aralığı 1-10 arasında değişen köpeklerden elde edilen oosit sayısı ve kalitesinin değerlendirildiği farklı çalışmalarda, en uygun donörlerin yetişkin ve genç hayvanlar (1-3 yaş ve <7

yaş) olduğu belirtilmiştir (Lopes, Sousa, Luvoni, & Rocha, 2007; Rocha ve ark., 2006).

Köpek ırklarının, oositlerin mayotik yeterliliği üzerindeki etkisini ilişkin bilgiler sınırlıdır. Melez köpekler, safkan ırklara göre daha fazla oosite sahip olsa da, köpek ırkının *in vitro* nükleer maturasyon üzerinde etkisi olmadığı bildirilmiştir (Durrant, Pratt, Russ; & Bolamba, 1998; Reynaud ve ark., 2005).

2.5.1.1.2. Köpeğin Seksüel Dönemi

Dişi köpeklerde seksüel dönemin, oositlerin *in vitro* olgunlaşmasındaki etkisi tartışmalı sonuçlara yol açmıştır. Bazı araştırmacılar, seksüel dönemin oosit gelişimiyle ilişkisi olmadığını belirtirken, diğer araştırmacılar, oositin gelişimini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir (Apparicio ve ark., 2015; Astudillo ve ark., 2023; Evecen ve ark., 2010; Song ve ark., 2011).

Genel olarak, preovulatorik foliküllerden ve foliküler fazda (proöstrus/östrus) elde edilen oositlerin, nükleer maturasyonu başarılı şekilde tamamladığı kabul edilmektedir (Astudillo ve ark., 2023; de Avila Rodrigues, & Rodrigues, 2003; Otoi, Ooka, Murakami, Karja, & Suzuki, 2001).

IVM için kullanılan oositler, diöstrus ya da anöstrus döneminde köpeklerde uygulanan rutin OHE operasyonları sonucu elde edilmektedir. Diöstrus ve anöstrus dönemine ait oositler, hem sayı hem de kalite bakımından farklılık göstermektedir. Anöstrus ovaryumlarından elde edilen GV aşamasındaki oosit sayısı, diğer siklus döneminde elde edilen oosit sayısından fazladır (Song ve ark., 2011). İmmatür oositler, siklusun çeşitli aşamalarında, ultrastrüktürel farklılıklar göstermektedir ve *in vitro* olarak mayotik maturasyondan etkilenmektedir (Lopes, Rocha, & Sousa, 2010). Anöstrustaki köpek oositlerinin mayoz oranları, proöstrus/östrus ve diöstrus oositlerinden daha düşüktür (Apparicio ve ark., 2011; Lopes ve ark., 2007). Çalışmalar, anöstrustaki köpek oositlerinde, ooplazma ve kumulus hücreleri arasında *gap junctions*'ların kapalı olmasından dolayı iletişimin olmadığını, proöstrusun sonunda *gap junctions*'ların açıldığını göstermiştir. Bu bilgi doğrultusunda, anöstrus ovaryumlarından elde edilen köpek oositleri *in vitro* ortamda mayozu yeniden başlatma konusunda başarısız olduğu bildirilmiştir (Chastant-Maillard ve ark., 2012; Luvoni, Luciano, Modina, & Gandolfi, 2001). Bazı araştırmacılara göre ise, siklusun

dönemi dikkate alınmaksızın, *Grade 1* aşamasındaki oositlerin *in vitro* maturasyonda pozitif sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Fujii ve ark., 2000).

Sonuç olarak, aktif üreme (östrus-diöstrus) potansiyeline sahip köpek oositlerinin *in vitro* maturasyonu tamamlamada daha başarılı olduğu, yapılan bir meta-analiz ile bildirilmiştir (Barati, Ehsani, Otoi, Fallah, & Dehkordi, 2022).

2.5.1.1.3. Folikül Büyüklüğü ve Oosit Çapı

Oosit, folikülogenezis ve oogenezis sırasında büyüme yeteneği kazanır. Anöstrus döneminde aday foliküller, gonadotropin stimülasyonu sonucu gelişmeye başlar (England ve ark., 2009; Kooistra, & Okkens, 2001). Folikülogenezis ilerledikçe folikül boyutunda da artış gözlenir. Buna paralel olarak, oosit çapı da artar (Songsasen ve ark., 2009). Seksüel siklusun farklı aşamalarında elde edilen foliküllerin ve oositlerin büyüklüğündeki değişiklikler, oositlerin mayotik maturasyonunu tamamlamasında etkilidir (Evecen ve ark., 2010; Otoi ve ark., 2001; Songsasen, & Wildt, 2005). Anöstrus aşamasındaki köpek folikülleri, 0,5-1 mm çapında küçük foliküllerdir. Diöstrus folikülleri 1-2 mm çapında, proöstrus folikülleri ise genellikle 2 mm'den fazla çapa sahip foliküllerdir (Songsasen, & Wildt, 2005). Daha büyük boyuta sahip foliküller (>2 mm), metabolik olarak daha aktif bir oosit içerir ve *in vitro* nükleer maturasyon başarısı (%80) daha yüksektir (Songsasen ve ark., 2012).

Preovulatörük aşamada, köpek oositleri, diğer memeli oositleri gibi ortalama 110-150 µm çapa sahiptir (Argudo ve ark., 2020; Aryan, Mardenli, & Groza, 2022; De Lesegno ve ark., 2008; Kochan ve ark., 2020; Pors ve ark., 2022). Seksüel siklusun farklı aşamalarında elde edilen oositlerin çapları, değişiklik göstermektedir. Genellikle, foliküler aşamada elde edilen oositlerin çapı 120 µm'den büyük, anöstrustaki köpek oositleri 110 µm'den küçüktür (Otoi ve ark., 2001). Çapı daha küçük olan oositler (<100 µm), MII aşamasına ulaşmada başarısız kalmıştır. Köpek oosit çapının IVM başarısında önemli faktör olduğu ve büyük çapa sahip oositlerin maturasyonu daha iyi tamamladığı belirtilmiştir (Evecen ve ark., 2010; Otoi ve ark., 2001).

2.5.1.2. Kùltür ile İlişkili Faktörler

2.5.1.2.1. Kùltür Medyumu ve Süresi

IVM için tercih edilen kùltür ortamları, hem maturasyon hem de embriyonik gelişim için önemlidir (Luvoni ve ark., 2005). Köpek oositlerinin *in vitro* maturasyonu ve embriyo gelişimi için, *Connaught medical research laboratories medium* 1066 (CMRL 1066), sentetik oviduktal sıvı (SOF) ve doku kùltürü medyumu 199 (TCM 199) yaygın olarak kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2007; Songsasen, Yu, & Leibo, 2002). TCM 199, fazla miktarda bileşen (aminoasit, vitamin, inorganik tuzlar, enerji kaynakları gibi) içeren kompleks besiyeridir (Rota, & Cabianca, 2004). Memeli oositlerinin *in vitro* kùltüründe kullanılan TCM 199, köpek oositlerinin *in vitro* maturasyonu için de tercih edilen etkili kùltür medyumudur (Bahrami, Morris, & Day, 2019; de Araujo ve ark., 2009; Lee ve ark., 2007; Nowshari, 2005; Rota, & Cabianca, 2004; Toori, Mosavi, Nikseresht, Barmak & Mahmoudi, 2014).

Köpek oositlerinin maturasyonu, *in vivo* koşullarda 48-72 saat içinde tamamlanır (Reynaud ve ark., 2005). Çalışmalarda kullanılan *in vitro* kùltür süreleri, 24-96 saat arasında değişmektedir (Apparicio ve ark., 2011; Otoi, Shin, Kraemer, & Westhusin, 2004; Suzukamo ve ark., 2009). Oositler, ovulasyondan 44 saat sonrasına kadar GV aşamasında gözlenmiştir (Reynaud ve ark., 2005). Mayotik süreçte yer alan protein ve kinaz aktivitlerinin 72. saatte maksimum seviyeye ulaşmasıyla, MII aşamasına ulaşan oosit sayısında artış bildirilmiştir (Suzukamo ve ark., 2009). Kùltür süresinin 96 saate uzaması, dejenere oosit sayısının artmasına neden olmaktadır (Apparicio ve ark., 2011). Maturasyon sonuçlarını iyileştirmek ve dejenerasyon oranlarını sınırlamak için, kùltür sistemi ile inkübasyon süresinin arasında optimal dengenin sağlanması şarttır (Luvoni ve ark., 2005). Yapılan çalışmalar ve maturasyon için fizyolojik süre dikkate alındığında, köpek oositlerinin IVM için en uygun kùltür süresinin 72 saat olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Otoi ve ark., 2004; Suzukamo ve ark., 2009).

2.5.1.2.2. Kültür Ortamına Eklenen Katkı Maddeleri

Köpek oositlerinin IVM sürecinde temel kültür ortamı, farklı serum ve protein kaynakları, hormonlar ve büyüme faktörleri ile desteklenmiştir (Evecen, Baran, Alkan, zdaş, & Tek, 2002; Hatoya ve ark., 2009; Lee ve ark., 2007; Song ve ark., 2011; Qin ve ark., 2022).

Köpek oositlerinin *in vitro* mayotik maturasyonu sırasında, besiyerine ek olarak protein kaynaklarına ihtiyaç vardır (Evecen ve ark., 2002; Rodrigues, & Rodrigues, 2003). Köpek oositleri için, sığır serum albümini (BSA) ve fetal buzağı serumu (FCS) en yaygın kullanılan protein kaynaklarıdır (De Los Reyes ve ark., 2023; Qin ve ark., 2022). FCS, kültür ortamına eklendiğinde (>%10) köpek oositlerinin *in vitro* sürecine negatif etkisi olduğu bildirilmiştir (Hewitt, Watson, & England, 1998). Temel kültür ortamına BSA veya FCS eklenerek oosit *in vitro* etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur. Elde edilen sonuçlar, BSA'nın mayotik aktivasyon oranlarını artırdığını göstermektedir (Evecen ve ark., 2002; Hewitt ve ark., 1998; Rodrigues, & Rodrigues, 2003).

Genellikle preovulatrik foliküllerden elde edilen oositler, IVM için kullanılmaktadır. Oosit gelişimi için hormonal uyarım şarttır (Luvoni ve ark., 2005). Köpek oositlerinin *in vitro* şartlardaki FSH, LH ve gonadotropin benzeri aktiviteye sahip gebe kısırak serum gonadotropin (eCG) ve insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonları tek başına ya da kombinasyon halinde kültür ortamına eklenmiştir (Kim ve ark., 2010; Lee ve ark., 2007). IVM ortamına FSH katkısının, kumulus hücre genişlemesinde etkisi büyüktür (Lee ve ark., 2007). Tek başına hormonların kullanılmasıyla, MII aşamasına ulaşan oosit sayısında fark olmadığı bildirilmiştir. Gonadotropinlerin kombinasyon halinde kullanıldığı çalışmalarda, GVBD'den MII aşamasına ulaşan oosit sayısının artış gösterdiği ve dejenerasyon oranlarının azaldığı gözlenmiştir (Kim ve ark., 2010).

Ovule olacak oosit, *in vivo* koşullarda yüksek konsantrasyonlarda steroid hormonların etkisinde kalmaktadır (Fahiminiya ve ark., 2010). Östrojen ve progesteron, mayozun yeniden başlamasında ve oositlerin MII aşamasına ulaşmasında etkili steroid hormonlardır. Bundan dolayı, iki hormonun da *in vitro* kültür ortamına eklenmesinin gerekli olduğu bildirilmiştir (Hatoya ve ark., 2009; Qin ve ark., 2022). Köpek oositleri, *in vitro* ortamda 0,5-10 µg/ml östradiol eklenerek

maturasyona bırakılmaktadır. Konsantrasyonların ve siklus dönemlerinin farklı olmasından dolayı maturasyon oranlarında da değişiklik gözlenir (Hatoya ve ark., 2009; Kim ve ark., 2005). Kültür ortamına östradiol-17 β ilave edilmesi, özellikle foliküler aşamadaki oositlerin, nükleer maturasyon oranını artırmaktadır. Luteal ve anöstrus oositlerinde ise, mayozun yeniden başlamasını sağlayarak GV aşamasında kalan oosit sayısında azalmaya neden olmaktadır (Kim ve ark., 2005). Ovidukt içerisinde, oosit mayozunun tamamlanması için, yüksek konsantrasyonda progesteron gereklidir. Oositlerin maturasyonu sırasında intrafoliküler progesteron seviyesi, plazmadakinden daha yüksektir (Fahiminiya ve ark., 2010). Çalışmalar, plazma progesteron konsantrasyonu 20-40 ng/ml'ye ulaştığı zaman mayotik sürecin tamamlandığını göstermiştir (Chastant-Maillard ve ark., 2011). Ayrıca, serum progesteron konsantrasyonu 40-50 ng/ml olan donörlerden fazla sayıda matür oosit elde edilmiştir (Kim ve ark., 2017). *In vivo* maturasyon ortamına en yakın konsantrasyonlarda (40-50 μ g/ml) progesteronun, kültür ortamına eklenmesi, köpek oositlerinin maturasyon oranlarını önemli oranda artırır (De Los Reyes ve ark., 2023; Qin ve ark., 2022). Buna ek olarak, progesteron katkısı, fertilizasyon ve sonrasında embriyonik gelişimi destekleyerek *in vitro* koşullarda yavruların üretilmesini sağlar (Qin ve ark., 2022).

Folikülogenezis aşamasından, mayozun tamamlanmasına kadar otokrin ve parakrin etki gösteren çeşitli büyüme faktörleri oositlere etki eder (Cardilli ve ark., 2021; Garcia ve ark., 2019; Pereira ve ark., 2019). Bunlar arasında, epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF-9) ve kemik morfogenetik protein 15 (BMP-15) *in vitro* kültür çalışmalarında daha çok tercih edilmiştir (Garcia ve ark., 2019; Sato ve ark., 2018; Song ve ark., 2011). EGF, mayotik hücre döngüsünün başlamasıyla ilişkili proteinlerin lokalizasyonunda değişikliklere sebep olur. Böylece hücre sel sinyal yollarını etkileyerek oosit maturasyon sürecinde yer alır (Pereira ve ark., 2019). IGF-1, köpek kumulus hücrelerinde yüksek seviyelerde eksprese edilen IGF-1 reseptörünü (IGF-1R) aktive ederek, kumulus hücre ekspansiyonuna neden olur. Bununla birlikte, IGF-1, Ras/MAPK (Ras ilişkili mitojenle aktive olan protein kinaz) yolağının uyarılmasını sağlayarak, oositlerin nükleer maturasyonunu pozitif olarak etkiler (Sato ve ark., 2018). Son zamanlarda köpeklerde yapılan çalışmalarda,

foliküler hücre ve oositlerde, GDF-9 ve BMP-15 faktörleri tanımlanmış ve siklus aşamalarına göre farklı seviyelerde eksprese edilmiştir (Palomino, & De Los Reyes, 2016; Ramirez, Palomino, Aspee, & De Los Reyes, 2020). Bu faktörlerin, folikül gelişiminde, kumulus ekspansiyonunda ve oosit maturasyonunda önemli biyolojik rolleri olduğu bildirilmiştir (Garcia ve ark., 2019; Palomino, & De Los Reyes, 2016; Ramirez ve ark., 2020). Köpek oosit mayozunun düzenlenmesinde GDF-9 ve BMP-15 büyüme faktörlerinin etkisi olduğu *in vitro* çalışmalarla desteklenmiştir (Garcia ve ark., 2019).

Köpeklerde *in vitro* ortamda kültürlenmiş oositlerin yüksek oranda MII aşamasına ulaşması zordur. Kültür ortamının farklı bileşiklerle desteklenmesi, köpek oositlerinin IVM başarısında genellikle olumlu etki göstermektedir. Buna rağmen, yine de MII aşamasına ulaşan oosit yüzdesi düşük kalmaktadır.

2.5.1.2.3. Oksidatif Stres

Oositlerin maturasyonu, fertilizasyonu ve ardından embriyonik gelişimin *in vitro* kültür ortamında gerçekleştirilmesi sırasında, ROS üretilir (Khazaei, & Aghaz, 2017). Fizyolojik olarak ROS, aerobik solunum ve hücresel metabolizma yoluyla oluşur ve sinyal molekülleri olarak hareket eder (Al-Gubory, Fowler, & Garrel, 2010; Forman, 2016).

Normal koşullarda, ROS gibi pro-oksidanların üretimi ve antioksidan savunma mekanizmalarının arasında bir denge vardır. Pro-oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması, reproduksiyonu olumsuz etkileyen OS oluşumuna neden olur (Al-Gubory ve ark., 2010). OS'ye yol açan yüksek seviyelerdeki ROS, son derece reaktif ve kararsızdır. Kararlı hale gelmek için nükleik asitler, proteinler, lipitler ve karbonhidratlarla reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar sonucunda, hücrelerde birtakım yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlar meydana gelir (Forman, Maiorino, & Ursini, 2010; Soto-Heras, & Paramio, 2020). Serbest radikallerin oluşumunun en tehlikeli sonuçlarından biri, lipit peroksidasyonunun meydana gelmesidir. Lipit peroksidasyonunun son ve stabil ürünü MDA'dır. Stabil bir ürün olduğu için, lipit peroksidasyonun kümülatif belirteci olarak kullanılmaktadır (Ayala, Muñoz, & Argüelles, 2014; Oborna ve ark., 2010). MDA, oositlerde OS'nin göstergesi olarak kabul edilir (Li ve ark., 2022).

In vitro koşullar sırasında, endojen savunma mekanizmaların yokluğu, gametlerin ve embriyoların uzun inkübasyon süreleri ve atmosferik oksijen (O₂) ile gün ışığı gibi çevresel faktörlere maruz kalması OS'yi artırır (Du Plessis ve ark., 2008). Özellikle köpek oositlerinin lipid içeriğinin ve metabolik olarak glikoz tüketiminin fazla olması, köpek oositlerinin OS'ye duyarlılığını artırır (Lopes ve ark., 2011; Songsasen, & Wildt, 2007). Kültür koşullarında OS'nin oluşması, çoğu memeli oositlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Fare, domuz ve sığır oositlerinin kültürlendiği *in vitro* çalışmalarda, OS'nin mitokondriyal disfonksiyona, apoptoza, hatalı iğ dizilimine, anormal kromozom ayrışmasına yol açtığı bildirilmiştir (Chang, Li, Zhang ve Qian, 2022; Mesalam ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2018).

Hücrel homeostazis için, oksidan ve antioksidan bileşenler arasındaki dengenin korunması zorunludur. Artan ROS seviyelerini nötralize etmek ve hücrel işlevleri düzenlenmek için, antioksidan maddeler kullanılmaktadır (Khazaei, & Aghaz, 2017). Kültür koşullarında oksidatif stresi ve oositler üzerindeki etkisini önlemeye yönelik temel yaklaşım, IVM sırasında kültür medyumuna antioksidan maddelerin eklenmesidir (Soto-Heras, & Paramio, 2020).

2.5.1.2.3.1. *In Vitro* Koşullarda Oksidatif Strese Karşı Antioksidan Savunması

Memeli oositlerinde, normal koşullarda ROS üretimi gerçekleşir. Fizyolojik seviyelerde ROS üretilmesi, çeşitli hücrel olayları modüle ederken, suprafizyolojik seviyeler, oksidatif strese neden olarak hücrelere zarar vermektedir (Al-Gubory ve ark., 2010; Forman, 2016). Hücreler, ROS'un neden olabileceği zararlı etkileri ortadan kaldırmak için, antioksidan savunma sistemine sahiptir (Fahiminiya ve ark., 2010; Kim ve ark., 2007). Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan olarak sınıflandırılmaktadır. Enzimatik antioksidanlar, serbest radikalleri parçalayarak uzaklaştırır. Böylece ROS'u nötralize eder ve hücrel yapının zarar görmesi engellenir (Nimse, & Pal, 2015). Bu aktivitedeki antioksidanlar, glutatyon peroksidaz (GPx), SOD, CAT ve çeşitli peroksidazlar ve peroksiredoksinlerden (PRDX) oluşur (Takahashi, 2012). Enzimatik olmayan antioksidanlar ise, serbest radikal reaksiyonlarını kesintiye uğratarak aşırı ROS oluşumunu önler (Nimse, & Pal, 2015). GSH, bazı vitamin (C vitamini, E vitamini gibi) ve mineraller (selenyum, çinko gibi),

melatonin ve bitkisel aktif bileşenler, enzimatik olmayan antioksidan kapasiteye sahiptir (Nimse, & Pal, 2015).

2.5.1.2.3.1.1. Malondialdehit (MDA)

KontROLSÜZ oksidatif stresin sonuçlarından biri, hücre, doku ve organlarda oksidatif hasarın oluşmasıdır. Yüksek düzeyde serbest radikallerin veya ROS'un üretimi, çeşitli biyomolekül sınıflarına özellikle lipitlere zarar verir (Ayala ve ark., 2014; Tsikas, 2023). Lipitleri en çok etkileyen ROS molekülleri, hidroksil radikali ve hidroperoksildir. Hidroksil radikali, kısa ömürlü olmasına rağmen hücre metabolizmasında ve çeşitli stres koşullarında O_2 'den üretilmektedir. Hidroperoksil radikali ise, lipit peroksidasyon mekanizmasında önemli rol oynar (Ayala ve ark., 2014). Lipit peroksidasyonu, oksidanların özellikle çoklu doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girmesiyle meydana gelir. Reaksiyon sonucunda ana ürün olarak lipit hidroperoksitler, son ürün olarak, 4-hidroksinonenal (4-HNE), MDA gibi aldehytler oluşur (Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991). MDA, reaktivitesi yüksek olan toksik bir moleküldür. MDA konsantrasyonunun yükselmesi, lipit peroksidasyonundaki artışın kanıtıdır. Bu yüzden MDA, oksidatif stresin, özellikle de lipit peroksidasyonun göstergesi olarak kabul edilen ve yaygın olarak kullanılan biyobelirteçtir (Li ve ark., 2022; Tsikas, 2017).

2.5.1.2.3.1.2. Glutasyon (GSH)

GSH, memeli hücrelerinde çok sayıda fonksiyona sahip, protein olmayan başlıca sülfhidril bileşiğidir. Bu tiyol bileşiği, detoksifikasyon ve antioksidan sistemlerde, intraselüler redoks durumunun korunmasında önemli rol oynar. GSH, oksidatif stres durumunda hücreler tarafından hızla kullanılabilen doğal rezervuardır (Adeoye, Olawumi, Opeyemi, & Christiania, 2018). İndirgenmiş (redükte) GSH ve oksitlenmiş GSH (GSSG) olarak iki formda bulunur. GSH'nin ROS'a karşı koruyucu etkisi, GPx ve glutasyon redüktaz (GR) gibi enzimlerle olan etkileşimi sonucu ortaya çıkar. GPx, hidrojen peroksitlerin (H_2O_2) varlığında, GSH molekülünü okside eder. Böylece GSH, GSSG'ye dönüşür (Adeoye ve ark., 2018). GSSG, toksiktir ve GR enzimiyle yeniden indirgenmiş forma dönüştürülür. İndirgenmiş GSH, ROS'un

nötralizasyonunda ve redoks homeostazisinin kontrolünde görev alır (Couto, Wood, & Barber, 2016).

GSH, sadece somatik hücrelerde değil gametlerde de yaygın olarak bulunan tiyol bileşiğidir. Enzimatik olmayan antioksidan sistemlerde, esas olarak GSH kullanılır (Luberda, 2005). Folikülogenezis sırasında GSH, ovaryumları OS'ye karşı koruyarak, oosit kalitesini etkiler. GSH, özellikle oosit maturasyonunda, mayotik iğ iplikçiklerinin oluşumunda ve korunmasında, fertilizasyon sonrası embriyo gelişiminde kritik rol oynar (Hosseini ve ark., 2007; Ren ve ark., 2021; Zhou ve ark., 2019). Olgunlaşmamış köpek oositlerinin, GSH seviyesi düşüktür. *In vivo* maturasyonunu tamamlayan oositlerin GSH içeriği, *in vitro* matüre olan oositlere göre daha yüksektir. Ayrıca, IVM sırasında köpek oositleri GSH sentezleme yeteneğine sahiptir (Kim ve ark., 2007). Domuz ve keçilerde, hücre içi GSH seviyesi yüksek olan oositlerin, daha kaliteli embriyolara dönüştüğü bildirilmiştir (Mukherjee ve ark., 2014; Wu ve ark., 2011). GSH, oosit gelişimindeki rolünden dolayı, sitoplazmik maturasyonun önemli bir belirteci olarak kabul edilmektedir (Kim ve ark., 2007; Liu ve ark., 2023).

2.5.1.2.3.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Tüm aerobik organizmalarda, hücreler tarafından süperoksit radikali (O_2^-) üretilir. Süperoksitin, O_2 ve H_2O_2 'ye dönüşümünden SOD sorumludur (Weydert, & Cullen, 2010). SOD, ROS'a karşı birinci basamak savunma sisteminin bileşeni olarak görev yapan önemli bir endojen antioksidan enzimdir (Ighodaro, & Akinloye, 2018). SOD'un aktivitesi için kofaktöre ihtiyacı vardır. Kofaktör olarak ihtiyacı olan metal iyonuna göre, üç SOD enzimi mevcuttur. SOD1, metal kofaktör olarak bakır (Cu) ve çinko (Zn) içerir ve sitoplazmada bulunur. SOD2, manganez (Mn) içeren formdur ve mitokondride lokalizedir. SOD3, ekstraselüler form olarak bulunur (Weydert, & Cullen, 2010).

Folikülün tüm hücresel komponentlerinde (granüloza hücreleri, kumulus hücreleri ve oositler) ve foliküler sıvıda SOD enzim aktivitesi ve protein ekspresyonunun varlığı bildirilmiştir (Carbone ve ark., 2003; Combelles, Hollick, Paolella, Walker, & Wu, 2010). SOD, domuz oositlerini ve kumulus hücrelerini OS'nin neden olduğu DNA hasarından korumada rol oynar. Ayrıca, foliküler sıvıda

bulunan SOD izoenzimleri de, oosit sitoplazmik maturasyon için gerekli olan fizyolojik süreçlerde yer alır (Tatemoto, Muto, Sunagawa, Shinjo, & Nakada, 2004). İyi kaliteye sahip insan oositlerinde yüksek SOD aktivitesi bildirilmiştir. SOD seviyesindeki değişiklikler, oosit kalitesi ve embriyo gelişimi ile ilişkilendirilmekte, YÜT başarısı için potansiyel bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (Kably Ambe, Ruiz Anguas, Carballo Mondragón, Corona de Lau, & Karchmer Krivitsky, 2004; Matos, Stevenson, Gomes, Silva-Carvalho, & Almeida, 2009).

2.5.1.2.3.1.4. Katalaz (CAT)

CAT, substrat olarak H_2O_2 kullanan önemli bir enzimdir. Bu enzim, H_2O_2 'yi O_2 ve su molekülüne (Dihidrojen monoksit, H_2O) parçalayarak nötralizasyondan sorumludur. Böylece hücrel sinyalleşme süreçleri için de gerekli olan molekülün, hücre içindeki optimum seviyesinin korunmasını sağlar (Nandi, Yan, Jana, & Das, 2019). CAT enzimi, hemen hemen tüm aerobik solunum yapan organizmalarda bulunur ve çeşitli süreçlerde rol oynar. OS sırasında meydana gelen oksitleyici türlerin çoğu CAT inhibisyonuna neden olur (Gebicka, & Krych-Madej, 2019). Somatik hücrelerde CAT aktivitesinin engellenmesi, ROS üretimini artırır ve hücrelerde sitotoksik etkiye sebep olur (Zhao, Wen, Wang, Wang, & Chen, 2019).

Foliküler sıvıda ve oositlerde CAT varlığı, farklı memeli türlerinde belirlenmiştir (Basini, Simona, Santini, & Grasselli, 2008; Gupta ve ark., 2011; Park ve ark., 2016). Sığırlarda, küçük foliküllerin sıvısında CAT seviyesi yüksektir. Folikül büyüklüğü artıkça, CAT aktivitesi azalmaktadır. Böylece, folikülogenezisin başlangıç aşamasında, baskın antioksidan olarak CAT görev almaktadır (Gupta ve ark., 2011). GV aşamasındaki fare oositlerinde CAT, çekirdekte lokalizedir. MI ve MII aşamasındaki fare oositlerinde ise, kromozomlarla ilişkilidir. Bundan dolayı, fare oositlerinde ROS'u ortadan kaldırmak ve genomik bütünlüğü korumak için, CAT gerekli antioksidan enzimdir (Park ve ark., 2016).

2.4.1.2.3.1.5. Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde, farklı tekniklerle *in vitro* ve *in vivo* antioksidan ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler, hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar ve tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar olmak üzere

sınıflandırılır (Huang, Ou, & Prior, 2005; Prior, Wu, & Schaich, 2005). Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde çok farklı yöntemler kullanılsa da, en fazla uygulama alanı olan yöntemlerden biri, demir (III) iyonu indirgeme antioksidan kapasite yöntemi (FRAP)'dir (Büyüktuncel, 2013).

FRAP analizi, ferrik (Fe^{+3}) bileşiğinin antioksidanlar tarafından ferröz (Fe^{+2}) bileşiğine indirgenmesiyle belirlenir (Büyüktuncel, 2013; Somwongin, Chantawannakul, & Chaiyana, 2018). Bu yöntem, farklı alanlarda antioksidan kapasiteyi belirlemek için tercih edilmektedir. Foliküler sıvıda antioksidan tayininde, ovaryumlarda OS'ye karşı kapasitenin değerlendirilmesinde, spermanın antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde FRAP yöntemi kullanılmaktadır (Cerezetti ve ark., 2021; Guedea-Betancourt ve ark., 2022; Seyfettinoğlu ve ark., 2021).

2.5.1.2.3.2. *In Vitro* Kültür Ortamına Antioksidan Bileşiklerin Eklenmesi

Evcil hayvanların oositlerinde, foliküler sıvı bileşimine dayalı antioksidanlar ve bitkilerden elde edilen aktif bileşenler *in vitro* kültür ortamında kullanılmaktadır (Soto-Heras, & Paramio, 2020). Foliküler sıvı, oositleri ROS kaynaklı hasardan koruyan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar içerir (Fahiminiya ve ark., 2010; Gupta ve ark., 2011; Shi ve ark., 2009).

Kültür koşullarında ROS kaynaklı hasarı önlemek amacıyla, daha iyi oosit maturasyonu ve embriyonik gelişim için IVM ortamında test edilen çok sayıda antioksidan özelliğe sahip bileşenler mevcuttur. Örneğin, melatonin hormonu, L-karnitin, L-prolin, sistein gibi aminoasitler, çeşitli bitkisel bileşenler, antioksidan özelliktedir (Hosseini ve ark., 2007; Liu ve ark., 2023; Moawad ve ark., 2021; Pang ve ark., 2018; Park ve ark., 2021).

Melatonin, IVM sırasında oositleri ROS'tan korumak için başarılı şekilde kullanılan, antioksidan özelliği olan hormondur. Hücresel düzeyde, melatonin ROS'u ortadan kaldırmak için hareket eder (Barros ve ark., 2020; He ve ark., 2016; Pang ve ark., 2018). Birçok türde, IVM ortamına melatonin eklenmesinin oosit maturasyonuna olumlu etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Melatonin desteği, fare oositlerinin kalitesini artırmakta, mitokondriyal fonksiyonu iyileştirmektedir. Ayrıca, hücre içi GSH seviyesini artırarak ROS seviyesinin azalmasına neden olmaktadır (He ve ark., 2016). Sığır oositlerinde melatonin etkisini, kumulus ekspansiyonu ve

nükleer maturasyonu artırarak göstermektedir (El-Raey ve ark., 2011). Melatonin, antioksidan özelliğinden dolayı, sığır oositlerinde ROS seviyesini önemli derecede azaltır, GSH sentezinin artışı sağlar. IVM sonucunda elde edilen embriyolarda, apoptoz ve antioksidan ilişkili genlerin ekspresyonu etkilenir (Pang ve ark., 2018).

L-karnitin, L-prolin, sistein gibi aminoasitler, fare ve köpek oositlerinin IVM esnasında kullanılmaktadır. Bu tür aminoasitler, çeşitli biyolojik işlevlerde etkili olduğundan, oksidan maddelerin ortadan kaldırılmasında etkili antioksidanlardır (Hossein ve ark., 2007; Liu ve ark., 2023; Moawad ve ark., 2021). L-prolin, *in vitro* maturasyon sürecinde, fare oositlerinde ve kumulus hücrelerinde GSH sentezini artırarak, oosit olgunlaşmasına pozitif etki eder (Liu ve ark., 2023). Benzer şekilde, köpek oositlerinin IVM ve embriyo kültüründe L-karnitin'in etkisi tanımlanmıştır. L-karnitin, köpek oositlerinin *in vitro* nükleer maturasyon oranlarını iyileştirmiştir. Ayrıca, fertilizasyon ve sonrasında embriyonik bölünme için L-karnitin'in yararlı etkisi olduğu bildirilmiştir (Moawad ve ark., 2021). Farklı siklus evrelerinde olan köpek oositleri, sistein ile kültürlenmiştir. Kültür sonunda, mayozu yeniden başlayan oosit oranları etkilenmemiş, fakat foliküler aşamada daha fazla oosit, MII aşamasına kadar ulaşmıştır. Sisteamin ile kültüre edilen oositlerde ise maturasyon oranlarının değişmediği bildirilmiştir. Foliküler ve luteal evrelerde oositlerin GSH içeriğinde önemli artış gözlenmiştir (Hossein ve ark., 2007).

Bitkilerden elde edilen bileşikler, antioksidatif etkilerinden dolayı IVM ortamında tercih edilmektedir. Resveratrol, rosmarinik asit, anetol, imperatorin, luteolin, kuersetin gibi farklı bileşikler, domuz, sığır, fare ve insan oositlerinin *in vitro* kültürlerinde kullanılmaktadır (Khadrawy ve ark., 2020; Liu ve ark., 2018; Luo ve ark., 2020; Park ve ark., 2021; Sá ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2019). Domuzlarda, çeşitli konsantrasyonlarda kullanılan rosmarinik asit, imperatorin ve luteolin hücre içi ROS oluşumunun azalmasını ve SOD, CAT gibi oksidatif stresle ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin artmasını sağlamıştır (Luo ve ark., 2020; Park ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2019). Diğer bir etki ise, oosit maturasyonu (BMP-15, GDF-9, MAPK) ve MPF ilişkili (CDK1 ve siklin B) genlerin ekspresyon seviyelerinde artışın olmasıdır (Park ve ark., 2021). Anetol ve kuersetin, sığır oosit maturasyonunu ve ardından embriyoların *in vitro* üretimini etkileyen antioksidanlardır (Khadrawy ve ark., 2020; Sá ve ark., 2020). Kuersetin, nükleer

NFE2 ilişkili faktör-2 (Nrf2) ekspresyon seviyesinin artışına neden olur. Ardından Nrf2 ile ilişkili olarak, antioksidan genlerin aktivasyonu sağlanır. Böylece, hücre içi ROS seviyesinin azalmasında, embriyonik gelişimin sürdürülmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Khadrawy ve ark., 2020). Maturasyondan sonra sığır oositlerindeki ROS üretiminde farklılık olmasa da, doza bağlı olarak anetol etkisinde değişiklik olmuştur. Anetol eklenen *in vitro* ortamdaki oositler, daha yüksek FRAP ve mitokondriyal membran potansiyeli sergilemiştir (Sá ve ark., 2020). Bitkilerden doğal olarak elde edilen diğer bileşik ise, resveratrol'dür. Farklı memeli oositlerinin *in vitro* kültürlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2018; Wang ve ark., 2014). Resveratrol'un sirtuin 1 (SIRT1) aktivitesini artırdığı, CAT, SOD ve GPx gibi antioksidan ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlediği fare ve insan oositlerinde gösterilmiştir (Liu ve ark., 2018). Bu etkilerin yanı sıra, sığır kumulus hücrelerinin ekspansiyonu ve oosit maturasyonu ile ilişkili genlerin seviyelerini artırarak, IVM ve IVF sonrası embriyonik gelişimde rol oynar (Wang ve ark., 2014).

2.6. Ozon (O₃) Biyolojisi ve Etkileri

Ozon (O₃) atmosferde doğal olarak bulunan, döngüsel yapıya sahip, üç oksijen atomundan oluşan, kararsız bir gazdır. O₃, O₂'den daha yoğun ve suda daha fazla çözünür. (Bocci, 2006). İlk kez, 1785 yılında Van Mauren tarafından O₃'ün ayırt edici kokusu tanımlandı. Daha sonra, çalışma sırasında Alman kimyager Schönbein tarafından O₃ gazı keşfedildi (Altman, 2007). 1856 yılında, operasyon salonları ve cerrahi aletlerin dezenfeksiyon işlemlerinde, antiseptik olarak O₃ ilk defa kullanıldı. Birinci Dünya Savaşı'nda yara enfeksiyonları kontrolünün sağlanması ve önlenmesi için, O₃ profilaktik amaçlı tercih edildi (Altman, 2007; Merin ve ark., 2007). Günümüzde ise O₃, terapötik ajan olarak hem beşeri hekimlikte hem de veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılmaktadır (He, & Ma, 2015; Teixeira ve ark., 2013).

Oldukça reaktif bir molekül olan O₃'ün etkisi, immünoregülasyon ve antiinflamatuvar özelliklerden antimikrobiyal etkiye, analjezik ve vazodilatasyondaki rolüne, kan akışı ve oksijenizasyonun desteklenmesine, rejeneratif süreçlerin düzenlenmesine kadar çok çeşitlilik gösterir (Lillo ve ark., 2023; Spadea, Tonti, Spaterna, & Marchegani, 2018; Teixeira ve ark., 2013; Yu, Guo, Luo, & Chen, 2021;

Zeng ve ark., 2020). O₃'ün etkilerinden biri de, hücreyi serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan GPx, SOD ve CAT gibi enzimlerin sentezinin indüksiyonunu sağlamaktır. Böylece, biyokimyasal mekanizmaları etkileyerek güçlü bir antioksidan özelliği gösterir (Abdel-Rahman Mohamed ve ark., 2022; Bocci, 2006). O₃, lipitler, proteinler, karbonhidratlar, DNA ve RNA olmak üzere hücre membranlarının makromolekülleri ile reaksiyona girer. Bu moleküllerin hepsi elektron verici olarak hareket ederek oksidasyona uğrar (Bocci, 2006). Biyolojik sistemlerde çoğu molekül radikal değildir. Bu moleküllerden biri olan ozon, radikal molekül olmamasına rağmen, biyolojik molekülleri oksitleyerek serbest radikallerin oluşumunda rol oynar. Serbest oksijen radikalleri, birçok hücre metabolizması sırasında kendiliğinden üretilir. Bunun yanında, bazı moleküllerle reaksiyona girerek oksidatif modifikasyona sebep olur (Martemucci ve ark., 2022). Serbest radikallerin hafif artışı, geçici hücresel değişimlere neden olurken, aşırı üretimi oksidatif stres oluşumuna katkıda bulunur (Jakubczyk ve ark., 2020). Buna rağmen, aygır spermasının kriyoprezervasyonunda kullanılan düşük doz ozonun, sperm yapısı ve kinetiğine olumlu etkisi bildirilmiştir (Pereira ve ark., 2022). Ayrıca boğa spermasının IVF'den kısa süre önce H₂O₂ ile muamele edilmesiyle, yüksek fertilizasyon oranları elde edilmiştir (Rahman ve ark., 2012). Oksijen kaynaklarının OS'yi artırdığı çok açıkken, yapılan son araştırmalarda kontrollü ve düşük doz ozon ya da H₂O₂ gibi reaktif türlerin, hücre antioksidan mekanizmalarını aktive edebileceği hipotezi speküle edilmiştir.

Gaz halindeki O₃, stabil değildir ve yarılanma ömrü 20°C'de 40 dakikadır. Bu yüzden depolanamaz, üretildiğinde hemen kullanılması gerekir (Bocci, 2006). O₃'ün kararsız bir gaz olması ve yarılanma ömrünün kısa olması, kullanım alanını sınırlamaktadır. Bu dezavantajın üstesinden gelmek için, O₃ farklı farmasötik formülasyonlarda hazırlanarak kullanılmaktadır (Donato ve ark., 2023; Sabancı ve ark., 2022; Teixeira ve ark., 2013). Bunlardan biri de, yeni nanoteknolojik ürünler olarak adlandırılan nanopartikül lipozomlardır (Erkan-Alkan, Güneş, Özakin, & Sabancı, 2021; Sabancı ve ark., 2022).

Nanoteknolojik sistemler ile küçük boyutlu (50-450 nm) taşıyıcılar kullanılmaktadır. Nanolipozomlar olarak bilinen lipit keseleri, biyoaktif maddelerin kapsüllenmesi ve belirli hedeflere yönelik kullanılan nanoteknolojik ürünlerdir

(Bozzuto, & Molinari, 2015). Belirli bir bölge ya da hücreyi hedef alarak sağlıklı doku ve hücreler üzerindeki yan etkiyi minimuma indirmekte, optimum terapötik etkinliği göstermektedir. Aynı zamanda, bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan terapötik ajanların etkisinin kısıtlı olması nedeniyle, kontrollü ilaç salınım sistemlerinde kullanımı yaygındır (Raja, Maldonado, Chen, Zhong, & Gu, 2021). Nanoteknoloji sayesinde, biyobozunur ve aynı zamanda biyouyumlu yapıya sahip, ozonlanmış nanolipozomlar geliştirilmiştir (Sabancı ve ark., 2022). Gaz halindeki O₃, kısa yarı ömürlü olmasına rağmen, ozonlanmış nanolipozom solüsyonunda stabilite daha uzun olarak bildirilmiştir (Erkan-Alkan ve ark., 2021). Doğal ve yavaş salınımlı özelliğiyle, O₃'ün farklı alanlarda kullanılabilirliği artmakta ve uzun süre etkisi devam etmektedir (Balta, Kumral, & Sabancı, 2020; Erkan-Alkan ve ark., 2021; Özüiçli, 2020).

2.7. Çalışmanın Amacı ve Hipotezi

Köpeklerde IVM sürecinde yaşanan zorluklar nedeniyle, kültür koşullarının optimum hale getirilmesi ve *in vivo* koşulların taklit edilmesi hedeflenmektedir.

In vivo maturasyon ve embriyo gelişimi esnasında hücrelerin, çeşitli reaktif oksijen molekülleri ürettiği bilinmektedir. Bu moleküller ile antioksidan savunma sistemleri arasında meydana gelen dengesizlik sonucu, OS oluşumu kaçınılmazdır. Kültür koşullarında oksidatif stresi azaltma ve/veya önlemedeki temel yaklaşım, antioksidan maddelerin kullanımıyla mümkün olabilmektedir. Yine başka bir hipoteze göre ise, doz kontrollü serbest oksijen türlerinin, antioksidan mekanizmaları indüklemeye etkisi gösterdiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada, biyomalzeme olarak üretilen nano-ozon kullanımıyla aşağıda belirtilen sorulara yanıt aranmıştır.

1. Hem oksidan hem de antioksidan özelliğe sahip olduğu düşünülen nano-ozon solüsyonunun köpek oositlerinin nükleer morfolojisine etkisi nedir?
2. Kültür ortamında meydana gelen oksidan ve antioksidan mekanizmadaki enzimler nasıl etkilenmektedir?
3. Nano-ozon solüsyonunun, maturasyonla ilişkili gen ekspresyonlarındaki değişimlere etkisi nedir?

Sonuç olarak ‘köpek oositlerinin IVM başarısını artırmada ve oksidatif stresi önlemede nano-ozon solüsyonun etkili olacağı’ hipotezi oluşturulmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Çalışmada, yaşları 2-5 arasında ve ortalama ağırlığı 15-30 kg olan, farklı ırklarda 130 adet köpeğe ait toplam 260 adet ovaryum (n=260) kullanıldı. Tez çalışması, Yıldırım Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü'nden (13.12.2021 tarihli ve E-1-622.01.01-641 sayılı) alınan izin belgesi ve Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (18.01.2022 tarihli ve 2022-01/08 numaralı etik kurul kararı) onayı alınarak gerçekleştirildi.

3.2. Çalışma Materyalinin Elde Edilmesi

3.2.1. Siklusun Belirlenmesi ve Uygun Ovaryum Seçimi

OHE operasyonu öncesinde tüm köpeklere vaginal sitoloji yapıldı. Kullanılan steril pamuklu çubuk, izotonik sodyum klorür (% 0,9 NaCl) ile ıslatıldı. Vulva dudakları aralanarak, 45 derecelik açıyla dorsale doğru yönlendirildi. Toplanan hücre döküntüleri lam üzerine yaydırıldı. Hazırlanan preparatlar *Diff-Quik* boyama yöntemi ile boyandı. Hücre sayımı ve hücre morfolojisi, ışık mikroskobu altında x100 büyütmede yapıldı.

Sitolojik olarak değerlendirilen 100 hücrede, farklı morfolojilere ait hücre oranları belirlendi. Eritrositlerin eşlik ettiği ve intermediyer, süperfisiyal hücreleri yüksek olan köpekler proöstrusta; anükleer süperfisiyal hücrelerin yoğun olduğu köpekler östrusta, intermediyer hücre sayısının yüksek olduğu köpekler ise diöstrusta kabul edildi (Groppetti ve ark., 2015). Bu verilere ek olarak, aktif ovaryumlara sahip olduğu belirlenen köpeklerin, operasyon esnasındaki ovaryum morfolojisi (korpus luteum ve foliküllerin varlığı) de değerlendirildi. Her iki kritere göre ovaryum aktivitesi olan köpekler çalışmaya dâhil edildi.

3.2.2. Ovariohisterektomi (OHE) Operasyonları

Operasyona alınacak köpekler, anestezi öncesinde 6-8 saat aç bırakıldı. Tüm OHE operasyonları, Yıldırım Belediyesi Veteriner İşleri'nde görev alan Veteriner Hekimler tarafından yapıldı.

Rutin OHE operasyonu öncesinde, preanestezi amacıyla, Ksilazin hidrogen klorür (HCl) (Vetaxyl® %2, VET-AGRO, Lublin/Poland)) 1-2 mg/kg dozda, kas içi (IM) ve ağrı kontrolü için Meloksikam (Bavet Meloxicam, Bavet İlaç San. ve Tic. A.Ş., İstanbul/Türkiye) 0,2 mg/kg dozda, deri altı (SC) yolla uygulandı. Anestezi, Ketamin HCl (Keta-Control® %10, Doğa İlaç, İstanbul/Türkiye) 5-10 mg/kg IM ile sağlandı. Pre, intra ve postoperatif dönem sıvı tedavisi için, 22 gauge (G) mavi renkli anjiokat kullanılarak vena (v.) *cephalica antebrachii*'nin kateterizasyonu sağlandı.

Sedasyonu sağlanan köpekler, sırt üstü pozisyonda operasyon masasına sabitlendi. Operasyon bölgesi temizliği yapıldıktan sonra, operasyon alanı serviyet bezleri ile sınırlandırıldı. Reprodüktif organlara daha kolay ulaşılması amacıyla tüm operasyonlar, median hattın yapıldı. Göbek sikatriksinin yaklaşık 2-3 cm altından, kaudal yönde 5-7 cm'lik dikey deri ensizyonu yapıldı. Ensizyon yerinden deri altı bağ dokuları ve yağ dokusu, *linea alba* 'nın daha rahat görülebilmesi için künt makas yardımı ile diseke edildi. Kanama şiddetini minimize etmek için, abdominal ensizyon fibröz *linea alba* boyunca yapıldı ve sırasıyla *musculus (m.) obliquus externus abdominis*, *m. obliquus internus abdominis*, *m.transversus abdominis* ve periton eğri uçlu hemostatik pens yardımıyla delinerek abdominal boşluğa ulaşıldı. *Linea alba*, ovaryumlara ulaşımın kolay olması için kranial ve kaudal yönde genişletildi. Sol ovaryum bulunarak *ligamentum (lig.) suspensorium ovarii* 1 numara emilebilir dikiş materyali ile ligatüre edildi. *Lig. latum uteri* künt diseksiyon ile ayrıldı ve ovaryum serbest bırakıldı. Sağ ovaryum için de aynı işlemler uygulandı. Korpus uteri ve serviks uteri'nin birleşme yerine *arteria (a.)* ve *v. uterina*'ları da içine alacak şekilde 1 numara emilebilir dikiş materyali (ALCASORB®, KATSAN Katgut San. ve Tic. A.Ş., İzmir/Türkiye) ile ligatüre edildi ve her iki ovaryum ile birlikte kornu uteri ve korpus uteri uzaklaştırıldı. Kanama kontrolleri yapıldıktan sonra, periton, kas katmanları ve deri 1 numara emilebilir dikiş materyali ile kapatıldı. Toplanan ovaryumlar 37 °C'de, 1x fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içinde 30-45 dakika içinde laboratuvara getirildi.

3.3. Ovaryumların İşlenmesi ve Oositlerin Elde Edilmesi

Laboratuvara getirilen ovaryumlar, çevrelerindeki fazla doku ve yağlardan arındırıldı. Ovaryumlar, 120 mm'lik steril petriler içerisinde bistüri yardımıyla

dilimlendi (*slicing* işlemi). İşlemler sırasında ovaryumlar TL-HEPES ile yıkanarak oositler serbest bırakıldı. *Slicing* işleminden sonra çökmesi beklenen oositler, x10 ve x20 büyütmede ve stereo mikroskop (Nikon SMZ 1000) altında toplandı. En az 2 sıra kumulus hücresi tarafından sıkıca sarılmış, uygun çapta, vitellusları homojen ve koyu renkli görünen oositler (*Grade 1 COCs*) seçildi (Fujii ve ark., 2000). Toplanan oositler, TL-HEPES ile 2-3 kez yıkandı.

3.4. Oositlerin *In Vitro* Maturasyonu

Seçilen oositlerin maturasyonu için temel besiyeri olarak TCM-199 kullanıldı. TCM-199 içerisine, 0,75 IU/ml insan menapozal gonadotropin (hMG, Menopour® 600 IU, Ferring GmHB, Kiel/Almanya), %10 FCS, 0,2 mM sodyum piruvat ve 25 µg/ml gentamisin eklenerek filtre edildi (Moawad ve ark., 2021). Oositler 5 farklı çalışma grubuna ayrıldı. Buna göre;

Grup A: Nano-ozon solüsyonu içermeyen grup, kontrol grubu

Grup B: 0,5 µg/ml nano-ozon solüsyonu eklenerek hazırlanan grup

Grup C: 1 µg/ml nano-ozon solüsyonu eklenerek hazırlanan grup

Grup D: 2 µg/ml nano-ozon solüsyonu eklenerek hazırlanan grup

Grup E: 5 µg/ml nano-ozon solüsyonu eklenerek hazırlanan grup olarak kabul edildi.

Gruplar oluşturulurken 500 µg/ml nano-ozon içeren solüsyon (Sonofarma İlaç Kimya San Tic Ltd Şti; Ref Numarası: OZ INJ 500 flakon; Patent Dosya No: PCT/TR2022/050177) kullanıldı. Steril *ependorf* tüp içerisinde, maturasyon medyumuna, her grup için belirlenen konsantrasyonlarda nano-ozon solüsyonu eklendi (Tablo 1). Her bir kuyucuğa toplam 500 µl maturasyon medyumuna hazırlandı, üzerine 400 µl mineral yağ ilave edildi.

Tablo 1. Maturasyon medyumuna katılan nano-ozon solüsyonu miktarları

Çalışma Grupları	Konsantrasyon (µg/ ml)	Maturasyon Medyum (µl)	Nano-ozon Solüsyonu (µl)
Grup A (Kontrol Grubu)	0	500	0
Grup B	0,5	499,5	0,5
Grup C	1	499	1
Grup D	2	498	2
Grup E	5	495	5

Toplanan oositler, her bir kuyucukta 30-40 adet olacak şekilde, maturasyon medyumuna yerleştirildi ve 39°C’de, %5 CO₂’li etüvde, 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

3.5. Oositlerin Partenogenetik Aktivasyonu

İnkübasyon sonunda oosit denudasyonu için 100 µl TL-HEPES içinde % 0,1 sığır testis hyaluronidaz enzimi kullanıldı. Kumulus hücrelerinden ayrılması için oositler 10 dakika boyunca vortekslendi. TL-HEPES içine alınan oositler, 2-3 kez yıkanarak enzimden arındırıldı. Tüm oositler, 4997,5 µl TL-HEPES içine 2,5 µl ionomisin (5 µM) eklenerek hazırlanan aktivasyon solüsyonunda 5 dakika inkübe edildi. Hemen ardından TL-HEPES ile hazırlanan *stop* solüsyonuna (30 mg/ml BSA, 0,2 mM sodyum piruvat ve 25 µg/mL gentamisin) aktarılarak 5 dakika inkübe edildi ve reaksiyon durduruldu. Tekrar yıkanan aktive edilmiş oositler, maturasyon medyumuna yerleştirilerek, 39°C’de ve 5% CO₂’li etüv içinde 72 saat boyunca inkübe edildi.

3.6. Oositlerin Boyanması ve Değerlendirilmesi

Oositleri boyamak için, *Hoechst 33258* (1 mg/ml) floresan DNA boyası kullanıldı. Kullanım sırasında 10 µl *Hoechst 33258* boya üzerine, 990 µl TL-HEPES solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Hazırlanan boya ile petri kapları içerisine droplar yapıldı. Oositler, hazırlanan droplar içerisine aktarılarak, karanlık ortamda 39°C’de 30 dakika inkübe edildi. Lam üzerine gliserol damlatıldı ve boyanan oositler gliserol içine aktarıldı. Floresan ataçmanlı, faz kontrast mikroskop (Olympus BX51,

Japonya) altında oositlerin nükleer morfolojisi değerlendirildi (Duque Rodriguez ve ark., 2021).

Nükleer morfoloji, GV, GVBD, MI, MII ve Dejenere (DEG) olarak sınıflandırıldı. (De los Reyes, de Lange, Miranda, Palominos, & Barros, 2005).

3.7. Örneklerin Toplanması ve Analizi

Morfolojik oosit değerlendirmeleri haricinde, maturasyon medyumunu oksidan, antioksidan ve FRAP düzeylerinin ölçülebilmesi için medyum örnekleri toplandı. Maturasyonda etkili genlerin ekspresyonlarının değerlendirilebilmesi için, aktivasyon sonrası kültüre edilen oositler toplandı.

3.7.1. Maturasyon Medyum Örneklerinin Toplanması

Maturasyon medyum örnekleri, oosit maturasyon sürecinin sonunda toplandı. Örnekler, her grup için en az 1 ml olacak şekilde 2 ml'lik *ependorf* tüpler içine aktarıldı. Her grup için 8'er örnek çalışıldı ve toplanan örnekler, analiz yapılana kadar -80°C'de depolandı.

3.7.1.1. Malondialdehit (MDA) Analizi

MDA seviyesi, tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonuna göre belirlendi. Her grup için 0,5 ml medyum, 2,5 ml %10 (w/v) trikloroasetik asit ile iyice karıştırılarak, 95°C su banyosunda 15 dakika inkübe edildi. Tüpler 4°C'ye soğutuldu ve 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Önceden hazırlanmış deney tüplerine, elde edilen supernatant alındı ve üzerine % 0,67 TBA eklenerek iyice karıştırıldı. Karışım başka bir tüpe alınarak 95°C'de 15 dakika boyunca inkübe edildi, ardından hızlıca soğutma işlemi uygulandı. MDA analizinde, standart madde olarak 1,1,3,3-tetrametoksi propan kullanıldı. Örneklerin MDA düzeyi, 532 nm dalga boyundaki absorbans değerinin (Shimadzu Corp, Japan) ölçülmesiyle belirlendi. MDA konsantrasyonu nmol/ml olarak hesaplandı (Draper, & Hadley, 1990).

3.7.1.2. İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Analizi

GSH seviyesi, Ellman reaktifi (DTNB, 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit)) ile GSH ve GSSG arasındaki katalik reaksiyona dayanan, Ellmann yöntemi

kullanılarak belirlendi (Hilf, & Hissin, 1976). Üç yüz ml distile su içerisinde 5 g metafosforik asit, 1 g etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ve 90 g NaCl bulunan çöktürücü çözelti hazırlandı. Hazırlanan çözeltiden 3 ml alınarak, 0,2 ml süpernatant ile karıştırıldı. Karışım, filtre edildi. Filtre edilen süzüntüye 8 ml fosfat tamponu (0,3 M disodyum fosfat (Na_2HPO_4)) ve 0,5 ml DTNB çözeltisi eklenerek iyice karıştırıldı. Standart madde olarak redükte glutatyon kullanıldı. Oluşan karışımın GSH değeri, 412 nm dalga boyundaki absorbans değerinin ölçülmesiyle belirlendi. GSH konsantrasyonu mg/ml olarak hesaplandı.

3.7.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi

SOD aktivitesi, süperoksit radikallerinin, SOD ve *nitro-blue tetrazolium* (NBT) reaktifinin indirgenmesini inhibe etmesiyle belirlenir. Kontrol ve test tüplerine 2,45 ml SOD reaktifi karışımından (20 ml 0,3 mM ksantin çözeltisi, 10 ml 0,6 mM EDTA dihidrat, 10 ml 150 mM NBT reaktifi, 6 ml 400 μM sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi ve 1 g/l BSA karışımı) eklendi. Kontrol tüpü için 0,5 ml bidistile su, test tüpleri için 0,5 ml medyum örneği hazırlanarak, tüm tüplerin üzerine 50 μl ksantin oksidaz (20 U/ml) ilave edildi ve karıştırıldı. Karışım, 20 dakika boyunca 25°C su banyosunda inkübe edildi. Reaksiyonun stabil hale gelmesi 0,8 mM bakır di klorür (CuCl_2) ile sağlandı. SOD aktivitesi, 560 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin ölçülmesiyle belirlendi. SOD değeri U/ml homojenizat olarak verildi (Flohé, & Otting, 1984; McCord, & Fridovich, 1969).

3.7.1.4. Ferrik Redüksiyon/Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi

Enzimatik olmayan antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla FRAP yöntemi kullanıldı (Somwongin ve ark., 2018). Bu yöntem, Fe^{+3} iyonlarının antioksidanlar aracılığıyla indirgenerek Fe^{+2} iyonu konsantrasyonunun belirlenmesi prensibine dayanır. Asetat tamponu (300 mmol/l), 2,4,6-tripiridil-S-triazin (40 mmol/l HCl içindeki 10 mmol/l'lık çözelti; 2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorit (TPTZ) çözeltisi) ve ferrik klorür (20 mmol/l) karışımının 10:1:1 oranında karıştırılmasıyla FRAP çalışma çözeltisi hazırlandı. Analiz, 37°C'de gerçekleştirildi. Her bir numune için ölçümler, 100 μl numune ve 3 ml FRAP çözeltisi karıştırılarak 4 dakika aralıklarla yapıldı. Askorbik asit standart maddesi ve örneklerin absorbanslarının 593

nm dalga boyunda ölçülmesiyle, reaksiyon takip edildi. FRAP değeri $\mu\text{mol/l}$ olarak aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{FRAP değeri } (\mu\text{mol/l}) = \frac{\text{Test numune reaksiyon karışımı değeri}^a}{\text{Fe}^{2+} \text{ standart reaksiyon karışımı değeri}^b} \times \text{Fe}^{2+}$$

^a Test numune reaksiyon karışımı 593 nm 4 dk absorbanası

^b Fe^{2+} standart reaksiyon karışımı 593 nm 4 dk absorbanası

^c Fe^{2+} standart konsantrasyonu

3.7.2. Oositlerin Toplanması

Partenogenetik aktivasyon sonrası, maturasyon medyumunda inkübe edilen oositler toplandı. Her kuyucukta bulunan 25-30 oosit, steril *ependorf* tüplere aktararak, üzerine 750 μl TriPure™ eklendi. Toplanan örnekler analiz yapılana kadar -80°C 'de depolandı.

3.7.2.1. mRNA İzolasyonu ve Real-Time (RT) PCR

3.7.2.1.1. mRNA İzolasyonu ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Derin dondurucuda saklanan *ependorf* tüplere, izolasyondan hemen önce 250 μl TriPure™ eklenerek toplam 1 ml'ye tamamlandı. Oositler parçalanarak homojenizasyon sağlandı. Homojenize edilen tüpler buz üzerinde 2 dakika, ardından oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Faz ayrımını yapmak için, tüplere 200 μl kloroform eklenerek 5 dakika bekletildi. Tüpler, 4°C , 12000 rpm' de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda RNA içeren renksiz kısım yeni bir tüpe aktarıldı. Yeni tüp üzerine RNA'yı arındırmak amacıyla, 500 μl izopropanol eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpler tekrar 4°C , 12000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi, ardından süpernatant atıldı. Tüpün dibinde oluşan pelet üzerine 1 ml %75 Etanol (EtOH) eklenerek 4°C , 7500 x g' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı ve tüp içerisinde kalan EtOH, kuru hava sterilizatöründe (Nüve TT 109, İngiltere), 37°C 'de uçuruldu. Kalan pelet üzerine 50 μl RNAase-free (Invitrogen™ UltraPure™, Thermo Fischer Scientific™, Waltman, USA) su eklenerek pipetleme yapıldı.

İzole edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonlarının ölçümü, spektrofotometre (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, ABD) ile yapıldı. RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonları 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi. Değerlendirme yapılırken, ideal saflıktaki kaliteli mRNA'nın A260/A280 absorbans oranı 1,8-2,0 aralığında olması dikkate alındı.

3.7.2.1.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi için, RevertAid RT *Reverse Transcription* Kiti (Thermo Scientific™, Waltman, USA) kullanıldı. cDNA dönüşümü için 1000 ng RNA örneği kullanıldı. Her örnek için, RNA, 0,5 µl Random Hexamer primer, 0,5 µl Oligo dT ve 12 µl nükleaz free su eklendi. Hazırlanan karışım 65 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve buz üzerinde soğutuldu. RNA örnekleri üzerine, son hacmi 20 µl olarak hazırlanan bileşenler eklendi (Tablo 2) ve 0,2 µl'lik PCR tüplerinde karıştırıldı. Reaksiyon, Thermal Cycler (Veriti™ 96 well Thermal Cycler, Thermo Fischer Scientific, Waltman, USA) cihazında, 25°C'de 5 dakika, 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 5 dakikada protokole uygun gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar, Real Time-PCR işlemi yapılana kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 2. Her bir reaksiyon için hazırlanan reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Hacim (µl)
RNA örneği	12
5X Reaksiyon Karışımı	4
RNaz İnhibitörü (20 U/µl)	1
dNTP Mix (10 mM)	2
Revers Transkriptaz Enzimi (200 U/ µl)	1
Toplam Hacim	20

3.7.2.1.3. Primerlerin Belirlenmesi ve Optimizasyonu

Hedef gen (CDK1 ve siklin B1) ve referans gen (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ve Aktin β (ACT- β)) için primerler belirlendi (Tablo 3).

Primerler belirlenirken NCBI ve ENSEMBLE gen bankaları kullanıldı. *Canis* cinsine spesifik olarak seçildi ve spesifikliği kontrol edildi.

Tablo 3. Çalışmada hedef gen ve referans gen için kullanılan primerler

Genler	Primer Sekansları (5'→ 3')		Uzunluk (bp)
CDK1	<i>Forward</i>	GTCAGTCTTCAGGATGTGCTTAT	102
	<i>Reverse</i>	ACCAGGAGGGATGGAATCTAA	
Siklin B1	<i>Forward</i>	GACTGGCTAGTACAGGTTCAAA	108
	<i>Reverse</i>	CTTCTTGGGCACACAGTTATTC	
GAPDH	<i>Forward</i>	GAACATCATCCCTGCTTCCA	129
	<i>Reverse</i>	CAGGTCAGATCCACAACCTGATAC	
ACT-β	<i>Forward</i>	GCCAACCGTGAGAAGATGA	97
	<i>Reverse</i>	CAGAGGCGTACAGGGACA	

Primerler, kullanım talimatlarına uygun olarak hazırlandı ve 100 pmol/ µl olacak şekilde sulandırıldı. *Forward* ve *reverse* primerler için, 10 µM'lik ara stoklar oluşturuldu.

3.7.2.1.4. RT-PCR ve Değerlendirme

Her bir örnek için PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Her bir reaksiyon için, her kuyucuğa 3 µl cDNA ve 17 µl PCR reaksiyon karışımı (Tablo 4) ilave edildi. Toplam 20 µl'lik son reaksiyon hacmi RT-PCR cihazına (Roche LightCycler 480 II) yerleştirilerek termal program (Tablo 5) uygulandı.

Tablo 4. PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacim (µl)
cDNA	3
Su, PCR-grade	5,8
<i>Forward</i> Primer (Ara stok 10 µM)	0,6
<i>Reverse</i> Primer (Ara stok 10 µM)	0,6
Enzim Karışımı (LightCycler® 480 SYBR Green I Master)	10
Toplam Hacim	20

Tablo 5. PCR cihazında uygulanan termal program

Program Adı	Pre-İnkübasyon	Amplifikasyon			Melting Curve			Soğutma
Analiz Modu	Yok	Kuantifikasyon Modu			Erime Eğrisi Modu			-
Döngü Sayısı	1	45			1			1
Hedef Sıcaklık [°C]	95	95	57	72	95	62	97	40
Süre (sn)	5	10	15	10	5	1	0	30
Sıcaklık Artış Hızı [°C/s]	4,8	4,8	2,5	4,8	4,8	2,5	0,11	2,5
Okuma Modu	-	-	-	Tek	-	-	Sürekli	-

RT-PCR sonuçlarının değerlendirilebilmesi için iki aday referans genin (Aktin β ve GAPDH) güvenilirliği analiz programı kullanılarak değerlendirildi (Gao, Deng, & Zhu, 2019). Hedef gen Ct değerleri, ACT- β ile normalize edildi ve ekspresyon değerleri bulundu. Çalışma sonunda elde edilen veriler, absolut ve relatif kantitasyon yöntemleriyle analiz edildi.

3.8. İstatiksel Değerlendirme

Elde edilen tüm verilerin istatistiksel değerlendirmesi, IBM SPSS 28.0 (Chicago, IL, ABD) programı kullanılarak yapıldı. Anlamlı farklılık için, $\alpha < 0,05$ olarak kabul edildi. Bütün verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemek için *Shapiro-Wilk* testi uygulandı. Normal dağılım gösteren veriler için One-Way ANOVA, normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Farklılık gösteren verilerin karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Verilerin sonuçları, ortalama $\pm$ SD (standart sapma) ile ifade edildi.

3.9. Çalışma Esnasında Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal ve reaktiflere ait detaylar Tablo 6'da verildi.

Tablo 6. Çalışma esnasında kullanılan kimyasallar ve reaktifler

Kimyasal-Reagent	Katalog Numarası	Firma
NaCl	S5886	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
KCl	P5405	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaHCO ₃	S5761	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sodyum fosfat monobazik (Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O)	S5011	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sodyum DL-laktat solüsyon (%60 şurup)	L7900	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CaCl ₂ x 2H ₂ O	C7902	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MgCl ₂ x 6H ₂ O	M2393	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hepes	H4034	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penisilin G potasyum tuzu	P3032	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fenol <i>Red</i>	P3532	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Doku Hücre Medyumu-199 (TCM-199)	M5017	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetal Buzağı Serum (FCS)	F9665	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sodyum pirüvat	P5280	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gentamisin sülfat	G1264	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA (Kültür için)	A6003	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA- <i>Fraction V</i>	A8022	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kalsiyum ionofor (Ionomisin)	C7522	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sığır hyalüronidazı	H4272	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tablo 6. Çalışma esnasında kullanılan kimyasallar ve reaktifler (devamı)

Fosfat tampon solüyon tableti	P4417	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Hoechst 33258</i>	94403	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Embryo Water</i>	W1503	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gliserol	G5516	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mineral yağ	M8410	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Menopour®	8697621790476	Ferring GmbH, Kiel, Almanya
Kloroform	102444	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
İzopropanol	109634	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
EtOH	100983	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Invitrogen™ UltraPure™, DNAaz/RNAaz Ari Distile Su	10977023	Thermo Fischer Scientific, Waltman, USA
RiboLock RNaz İnhibitörü	EO0382	Thermo Fischer Scientific, Waltman, USA
Reverse Transkripsiyon Kiti	K1691	Thermo Fischer Scientific, Waltman, USA
Tripure™ İzolasyon Reaktifi	11667165001	Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, ABD
LightCycler® 480 SYBR <i>Green I Master</i>	4707516001	Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, ABD
TBA	504-17-6	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Trikloroasetik asit	76-03-9	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
1,1,3,3-tetrametoksi propan	T9889	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ellman reaktif (DTNB)	69-78-3	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Metafosforik asit	37267-86-0	Merck KGaA, Darmstadt, Germany

Tablo 6. Çalışma esnasında kullanılan kimyasallar ve reaktifler (devamı)

EDTA	60-00-4	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Sodyum klorit (NaCl)	7647-14-5	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Na ₂ HPO ₄	7558-79-4	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
NBT	298-83-9	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Ksantin	69-89-6	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Na ₂ CO ₃	497-19-8	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
BSA	9048-46-8	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Ksantin oksidaz	X1875	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bakır diklorür (CuCl ₂)	7447-39-4	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
2,4,6-tripiridil-S-triazin	T1253	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ferrik klorür	7705-08-0	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Askorbik asit	50-81-7	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
<i>Diff Quick Boyama Seti</i>	1.11955-1.11956-1.11957	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

3.9.1. PBS Hazırlanması

Operasyon sonrası alınan ovaryumların taşınmasında kullanılmak üzere, aşağıdaki formülasyona uygun hazırlandı.

PBS tablet	1 adet
Distile su	200 ml

3.9.2. TL-HEPES Stok ve Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması

Ovaryumların dilimlenmesi sırasında ve çalışma boyunca yıkama işlemleri sırasında kullanılmak üzere TL-HEPES stok ve yıkama solüsyonu aşağıdaki formülasyona uygun hazırlandı. TL- HEPES stok solüsyonu, pH değeri 7,4 olacak şekilde ayarlandı ve filtre edildi. Muhafaza etmek amacıyla 4°C'ye kaldırıldı. Günlük kullanımlarda ise TL-HEPES yıkama solüsyonu 50 ml olacak şekilde hazırlanarak filtre edildi.

TL-HEPES Stok (mg/500 ml) Solüsyonu

NaCl	3330
Potasyum klorür (KCl)	120
Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	84
Sodyum fosfat (NaH ₂ PO ₄) Anhidroz	24
Sodyum laktat (%60 şurup)	0,930
Kalsiyum klorid dihidrat (CaCl ₂ 2H ₂ O)	150
Magnezyum klorid hegzahidrat (MgCl ₂ 6H ₂ O)	50
Hepes	1200
Penisilin	32,5
Fenol kırmızısı	5

TL-HEPES Yıkama Solüsyonu

TL-Hepes Stok	50 ml
BSA Fraction- V	150 mg
Piruvat Stok (0,2 mM final)	500 µl
Gentamisin (25 µg/mL final)	25 µl

3.9.3. Maturasyon Medyumunun Hazırlanması

Oositlerin *in vitro* maturasyonu amacıyla TCM-199 medyumunu kullanıldı. Aşağıdaki formülasyona göre hazırlanan TCM-199 stok medyumunu filtre edilip 4°C’de muhafaza edildi. Maturasyon medyumunu, TCM-199 stok medyumundan 4,5 ml kullanılarak günlük hazırlandı ve filtre edildi.

TCM-199 Stok Medyumunu

TCM-199	495 mg
NaHCO ₃	110 mg
<i>Embryo Water</i>	50 ml

Maturasyon Medyumunu

TCM-199	4,5 ml
FCS (60 °C 30 dk işlem görmüş)	0,5 ml
Pirüvat stok (0,2 mM final)	50 µl
Menopur ® (600 IU/mL)	6,25 µl
Gentamisin (50 mg/mL) 25 µg/mL final	2,5 µl

3.9.4. Partenogenetik Aktivasyon Solüsyonlarının Hazırlanması

Maturasyon aşamasını tamamlayan oositlerin partenogenetik aktivasyonu esnasında kullanılan kalsiyum ionofor (ionomisin) ve reaksiyon durdurucu (*stop*) solüsyonu aşağıdaki formülasyona göre hazırlandı.

Kalsiyum İonofor (İonomisin) Eklenmiş Medyum Hazırlanması

TL-Hepes Yıkama Solüsyonu	4997,5 µl
Kalsiyum ionofor (5 µM)	2,5 µl

Reaksiyon Durdurucu (Stop) Solüsyonun Hazırlanması

TL-Hepes Stok	10 ml
BSA <i>Fraction- V</i>	300 mg
Piruvat Stok (0,2 mM final)	100 µl
Gentamisin (25 µg/mL final)	5 µl

3.9.5. Partenogenetik Aktivasyon Sonrası Maturasyon Medyumu

Aktive edilen oositlerin 72 saat boyunca inkübe edileceği maturasyon medyumu aşağıdaki formülasyona göre hazırlanarak filtre edildi.

TCM-199 Stok	4,5 ml
BSA (FAF)	15 mg
Piruvat Stok (0,2 mM final)	50 µl
Gentamisin (25 µg/ml final)	2,5 µl

3.9.6. Hoechst 33258 Boyasının Hazırlanması

Oositlerin nükleer morfolojisini değerlendirmek için kullanılan boya aşağıdaki formülasyona göre hazırlandı. Hazırlanan solüsyon *ependorf* tüplere 10 µl olacak şekilde porsiyonlanarak, alüminyum folyo ile sarıldı ve -20°C’de saklandı. Kullanım esnasında boya TL-HEPES ile dilüe edilerek kullanıldı.

Hoechst 33258 (1mg /ml)	1 mg
PBS	1 ml

3.9.7. Alet ve Malzeme Listesi

Çalışma esnasında kullanılan alet ve malzeme listesi Tablo 7’de verildi.

Tablo 7. Çalışma esnasında kullanılan alet ve malzeme listesi

Alet Listesi	Malzeme Listesi
Üç gaz girişli inkübatör	Penset
Stereo mikroskop	Bistüri ucu No: 11
Çeker ocak	Enjektörler (5-10-50 ml’lik)
Buzdolabı ve Derin dondurucu (-20 ve -80 °C)	Filtre kağıdı (20 µm)
pH metre	Lam-Lamel
Elektronik hassas terazi	<i>Eppendorf</i> tüpleri
Manyetik balmıklar	Cam beher
Santrifüj cihazı	Laboratuvar şişesi (500-1000 ml)
Vorteks	Hamilton enjektör
Floresans ataçmanlı, ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop	Otomatik pipetler (10-100-1000 µl)
Distile su cihazı	Otomatik pipet uçları
IKA-T18 Ultra Turrax Homojenizatör	4 gözlü kültür petripleri
Kuru hava sterilizatörü	Petri kutuları
Su banyosu	96 gözlü PCR Pleytleri

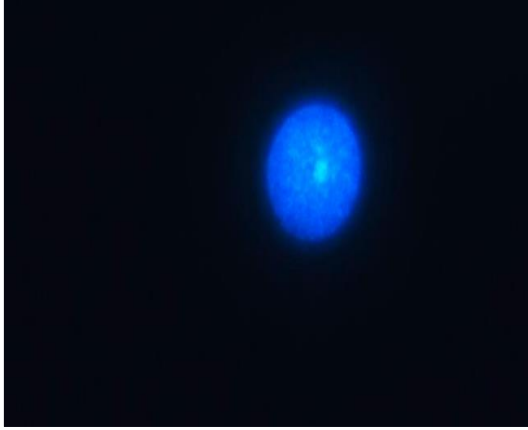
Tablo 7. Çalışma esnasında kullanılan alet ve malzeme listesi (devamı)

RT- PCR cihazı	PCR tüpü (0,2 ml)
Spektrofotometre	Falkon tüpleri (15-50 ml'lik)
Nanodorop 2000	Steril Mikrosantrifüj Tüpleri (1,5 ml)
MagNA Lyser-Ekstraksiyon cihazı	Tüp sporu
LightCycler 480 II	Alüminyum folyo
Thermal Cycler	Filtreli pipet uçları (10-100-1000 µl)
Termal Blok	

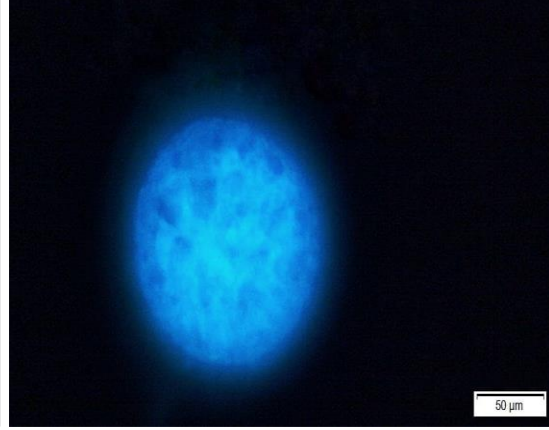
4. BULGULAR

4.1. Gruplara Göre Nükleer Morfoloji Sonuçları

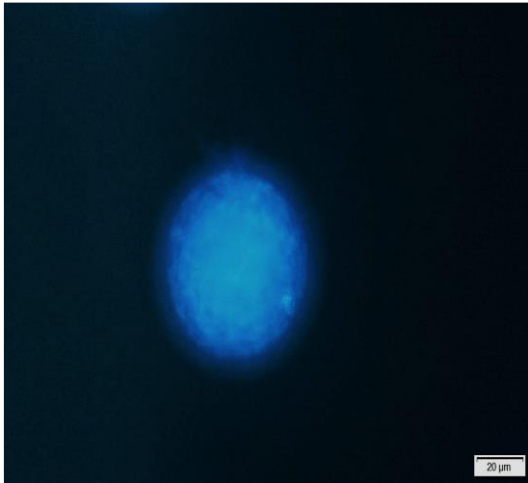
Tüm gruplarda değerlendirilen oositlerin nükleer morfolojilerine ait örnek görüntüler Fotoğraf 1-5 arasında verilmiştir.



Fotoğraf 1. GV aşamasındaki oosit görüntüsü



Fotoğraf 2. GVBD aşamasındaki oosit görüntüsü



Fotoğraf 3. MI aşamasındaki oosit görüntüsü



Fotoğraf 4. MII aşamasındaki oosit görüntüsü



Fotoğraf 5. Dejenere oosit görüntüsü

4.1.1. Grup A (Kontrol Grubu) Nükleer Morfoloji Sonuçları

Grup A olarak belirtilen grup, nano-ozon solüsyonu eklenmeden, kontrol grubu olarak oluşturuldu. Çalışmada, bu gruba ait toplamda 207 adet oosit değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda, elde edilen veriler, oranlar, aritmetik ortalama ve standart sapma (SD) değerleri Tablo 8’ de verildi.

Tablo 8. Grup A’ya ait nükleer morfoloji sonuçları

GRUP	GV	GVBD	MI	MII	DEG
Grup A	3 (%1,44)	157 (%75,84)	33 (%15,94)	5 (%2,41)	9 (%4,34)
Ortalama $\pm$ SD	0,50 $\pm$ 0,54	26,166 $\pm$ 0,40	5,50 $\pm$ 0,54	0,83 $\pm$ 0,40	1,50 $\pm$ 0,54

4.1.2. Grup B Nükleer Morfoloji Sonuçları

Grup B olarak belirtilen grup, rutinde kullanılan maturasyon medyumuna 0,5 µg/ml nano-ozon solüsyonu eklenerek oluşturuldu. Çalışmada, bu gruba ait toplamda 207 adet oosit değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda, elde edilen veriler, oranlar, aritmetik ortalama ve standart sapma (SD) değerleri Tablo 9’ da verildi.

Tablo 9. Grup B’ye ait nükleer morfoloji sonuçları

GRUP	GV	GVBD	MI	MII	DEG
Grup B	2 (%0,96)	147 (%71,01)	36 (%17,39)	6 (%2,89)	16 (%7,72)
Ortalama $\pm$ SD	0,33 $\pm$ 0,51	24,50 $\pm$ 0,54	6,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	2,66 $\pm$ 0,51

4.1.3. Grup C Nükleer Morfoloji Sonuçları

Grup C olarak belirtilen grup, rutinde kullanılan maturasyon medyumuna 1 µg/ml nano-ozon solüsyonu eklenerek oluşturuldu. Çalışmada, bu gruba ait toplamda 203 adet oosit değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda, elde edilen veriler, oranlar, aritmetik ortalama ve standart sapma (SD) değerleri Tablo 10’ da verildi.

Tablo 10. Grup C’ye ait nükleer morfoloji sonuçları

GRUP	GV	GVBD	MI	MII	DEG
Grup C	0 (%0)	143 (%70,44)	30 (%14,77)	14 (%6,89)	16 (%7,88)
Ortalama ± SD	0,00±0,00	23,83±0,40	5,00±0,00	2,33±0,51	2,66±0,51

4.1.4. Grup D Nükleer Morfoloji Sonuçları

Grup D olarak belirtilen grup, rutinde kullanılan maturasyon medyumuna 2 µg/ml nano-ozon solüsyonu eklenerek oluşturuldu. Çalışmada, bu gruba ait toplamda 207 adet oosit değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda, elde edilen veriler, oranlar, aritmetik ortalama ve standart sapma (SD) değerleri Tablo 11’ de verildi.

Tablo 11. Grup D’ye ait nükleer morfoloji sonuçları

GRUP	GV	GVBD	MI	MII	DEG
Grup D	2 (%0,96)	147 (%71,01)	32 (%15,45)	9 (%4,34)	17 (%8,21)
Ortalama ± SD	0,33±0,51	24,50±0,54	5,33±0,51	1,50±0,54	2,83±0,40

4.1.5. Grup E’ye Ait Nükleer Morfoloji Sonuçları

Grup E olarak belirtilen grup, rutinde kullanılan maturasyon medyumuna 5 µg/ml nano-ozon solüsyonu eklenerek oluşturuldu. Çalışmada, bu gruba ait toplamda 223 adet oosit değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda, elde edilen veriler, oranlar, aritmetik ortalama ve standart sapma (SD) değerleri Tablo 12’ de verildi.

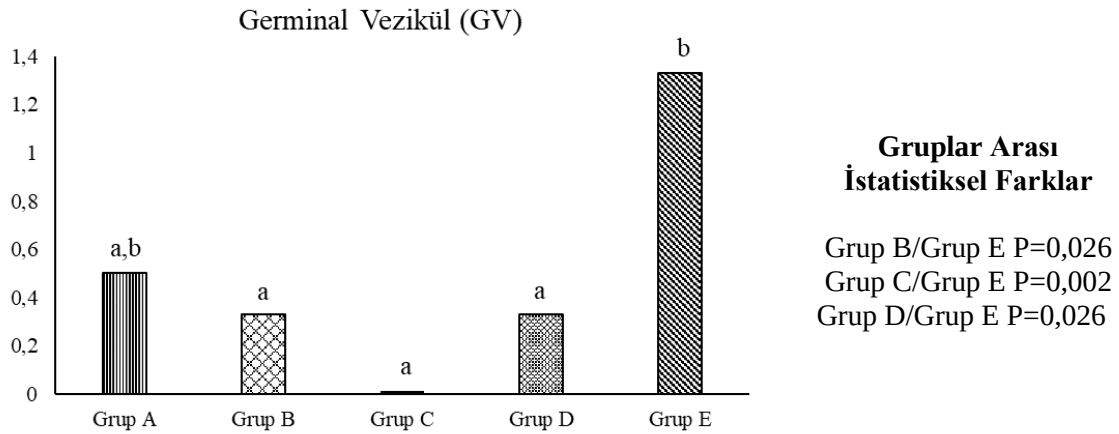
Tablo 12. Grup E'ye ait nükleer morfoloji sonuçları

GRUP	GV	GVBD	MI	MII	DEG
Grup E	8 (%3,58)	150 (%67,26)	20 (%8,96)	4 (%1,79)	41 (%18,38)
Ortalama $\pm$ SD	1,33 $\pm$ 0,51	25,00 $\pm$ 0,00	3,33 $\pm$ 0,51	0,66 $\pm$ 0,51	6,83 $\pm$ 0,40

4.2. Nano-Ozon Solüsyonunun Oosit Nükleer Morfoloji Sonuçlarına Etkisi

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, bütün gruplar için kullanılan oositler, GV, GVBD, MI, MII ve DEG olarak sınıflandırıldı. Gruplar arası GV, GVBD, MI, MII, DEG istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Ek olarak mayoza yeniden başlayarak aktive olan oositler (GVBD+MI+MII) ve maturasyonunu tamamlayan oositlerin (MI-MII) oranları da istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

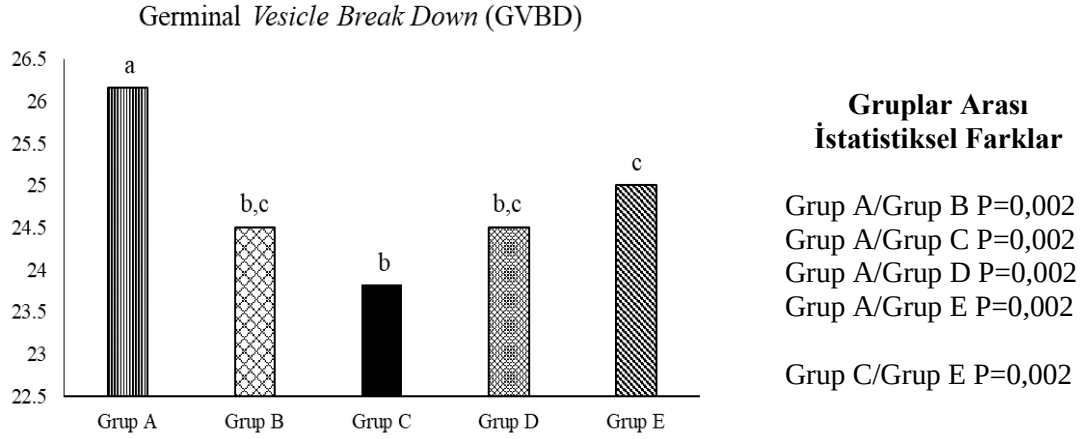
GV aşamasındaki oositlerin istatistiksel değerlendirilmesinde gruplar arasında fark olduğu belirlendi ($p=0,006$). Grup B-Grup E ($p=0,026$), Grup C-grup E ($p=0,002$) ve Grup D-Grup E ($p=0,026$) verileri istatistiksel olarak farklı bulundu. En fazla GV aşamasında kalan oosit sayısı Grup E'de gözlemlendi ($1,33\pm0,51$). Grup C'de ise hiç GV aşamasında kalan oosit gözlenmedi. GV aşamasındaki oositlerin gruplar arası karşılaştırma verileri Grafik 1'de detaylı olarak verildi.



Grafik 1. GV aşamasındaki oosit sayılarının gruplar arası istatistiksel farkları ^{a,b} Üst simgeler istatistiksel farkları gösterir $p<0,05$.

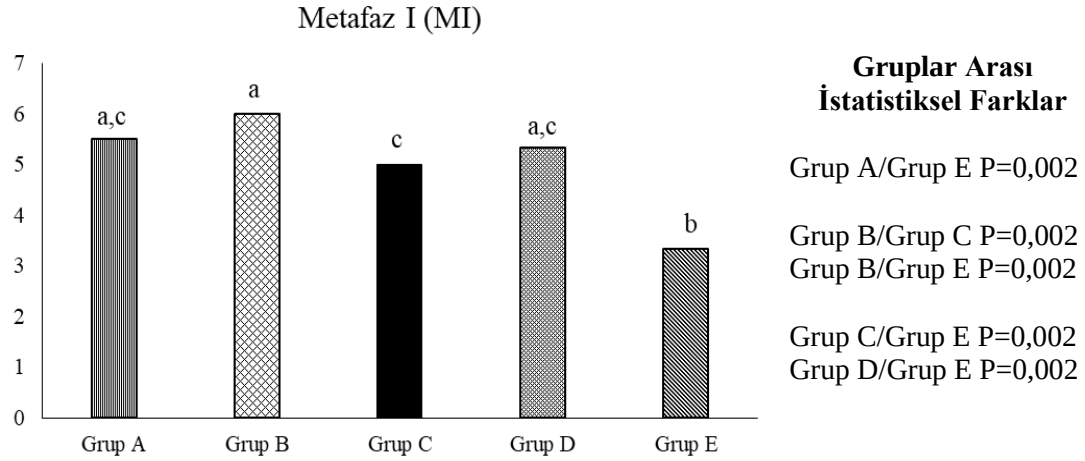
GVBD aşamasındaki oositlerin istatistiksel değerlendirilmesinde gruplar arasında fark olduğu belirlendi ($p<0,001$). Grup A'nın diğer tüm gruplara göre farklı olduğu belirlendi ($p=0,002$). Ayrıca, Grup C-Grup E arasında da istatistiksel olarak

anlamlı fark belirlendi ($p=0,002$). GVBD aşamasına geçen oosit sayısı en fazla Grup A'da ($26,16\pm0,40$), en az Grup C'de belirlendi ($23,83\pm0,40$). GVBD aşamasındaki oositlerin gruplar arası karşılaştırma verileri Grafik 2'de detaylı olarak verildi.



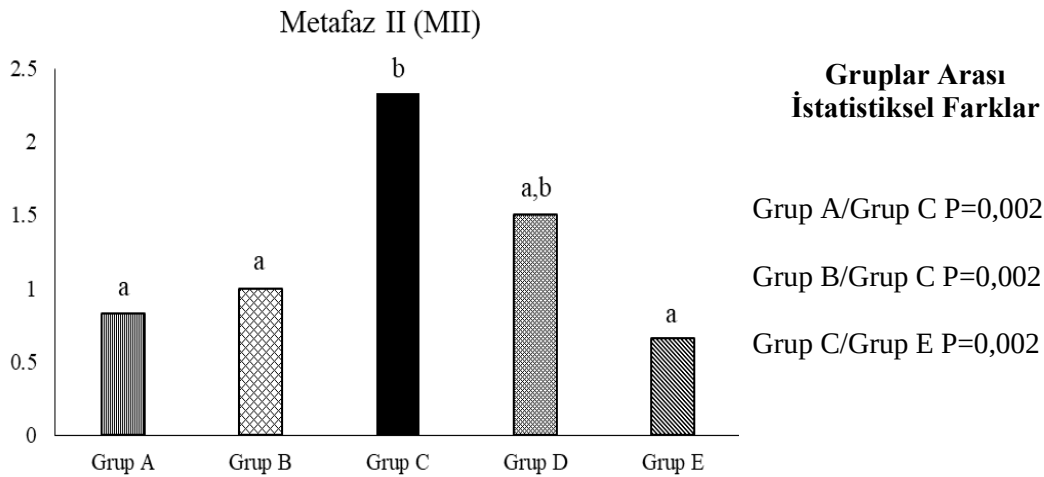
Grafik 2. GVBD aşamasındaki oosit sayılarının gruplar arası istatistiksel farkları ^{a,b,c} Üst simgeler istatistiksel farkları gösterir $p<0,05$.

MI aşamasındaki oositlerin istatistiksel değerlendirilmesinde gruplar arasında fark olduğu belirlendi ($p<0,001$). İkili karşılaştırma sonucunda, Grup E ve diğer gruplar (Grup A, B, C ve D) arasındaki istatistiksel farkın anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,002$). Bir başka istatistiksel anlamlı fark ise, Grup B ve Grup C arasında tespit edildi ($p=0,002$). En fazla MI aşamasına ulaşan oosit sayısı Grup B'de ($6,00\pm0,00$), en az ise Grup E'de ($3,33\pm0,51$) gözlemlendi. MI aşamasındaki oositlerin gruplar arası istatistiksel farkları Grafik 3'te gösterildi.



Grafik 3. MI aşamasındaki oosit sayılarının gruplar arası istatistiksel farkları ^{a,b,c} Üst simgeler istatistiksel farkları gösterir p<0,05.

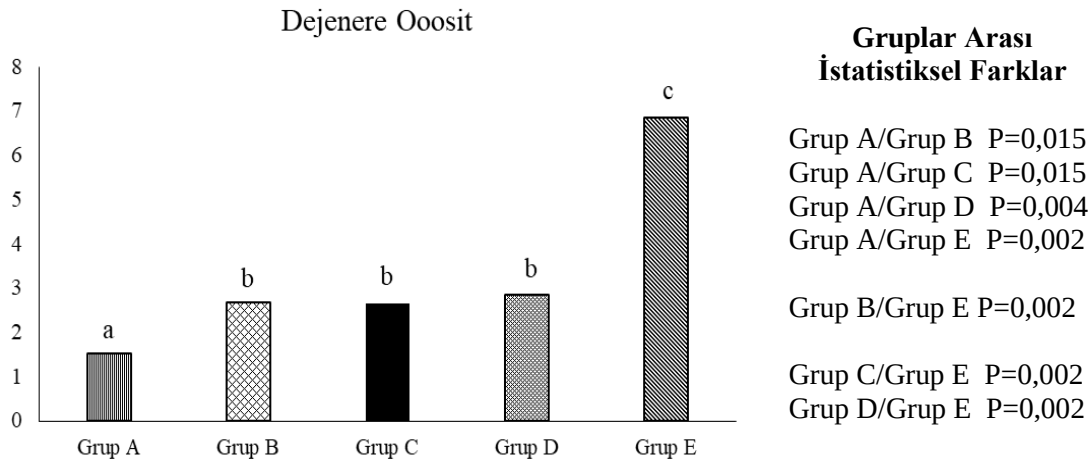
MII aşamasındaki oositlerin istatistiksel değerlendirilmesinde gruplar arasında fark olduğu belirlendi (p<0,001). Grup A ile Grup C arasında istatistiksel fark olduğu tespit edildi (p=0,002). Ayrıca Grup B-Grup C (p=0,002), Grup C-Grup E (p=0,002) arasında da anlamlı fark bulundu. MII aşamasında olan oosit sayısı en fazla Grup C’de (2,33±0,51) gözlenirken, en az Grup E’de (0,66±0,51) gözlemlendi. MII aşamasındaki oositlerin gruplar arası istatistiksel farkları Grafik 4’te gösterildi.



Grafik 4. MII aşamasındaki oosit sayılarının gruplar arası istatistiksel farkları ^{a,b} Üst simgeler istatistiksel farkları gösterir p<0,05

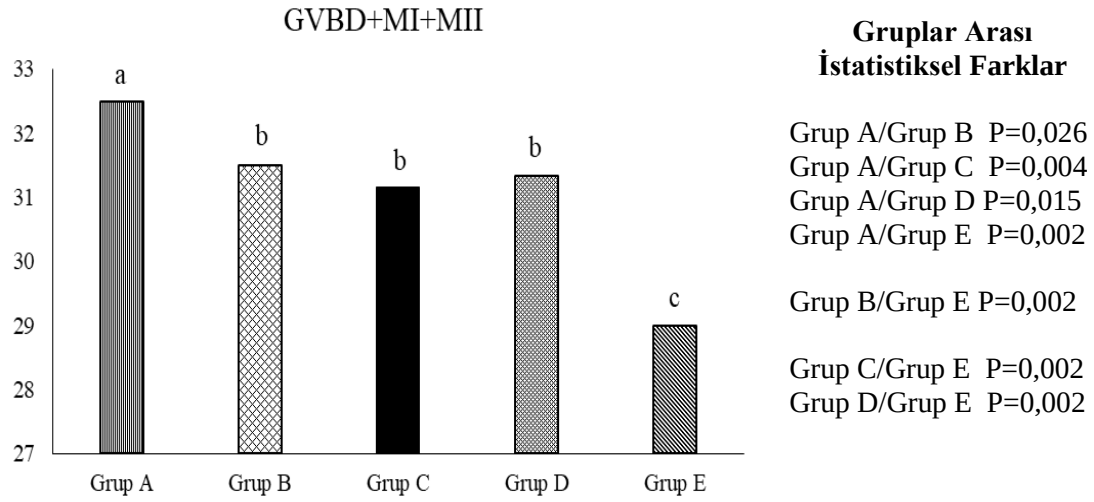
Nükleer morfoloji değerlendirme esnasında, tanımlanamayan ya da zona pellusidanın bütünlüğünün bozulduğu oositler dejenere olarak çalışmaya dahil edildi.

Dejenere oositlerin istatistiksel değeriendirilmesinde gruplar arasında fark olduğu belirlendi ($p<0,001$). Grup A ve Grup E'nin diğeri tüm gruplara göre farklı olduğu tespit edildi; Grup A-Grup B ($p=0,015$), Grup A-Grup C ($p=0,015$), Grup A-Grup D ($p=0,004$), Grup A-Grup E ($p=0,002$), Grup B-Grup E ($p=0,002$), Grup C-Grup E ($p=0,002$), Grup D-Grup E ($p=0,002$). Konsantrasyon artışına bağılı olarak dejenere oosit sayısında artış gözlemlendi. En fazla dejenere oosit Grup E'de ($6,83\pm0,40$), en az Grup A'da ($1,50\pm0,54$) belirlendi. Dejenere oositlerin gruplar arası istatistiksel farkları Grafik 5'te gösterildi.



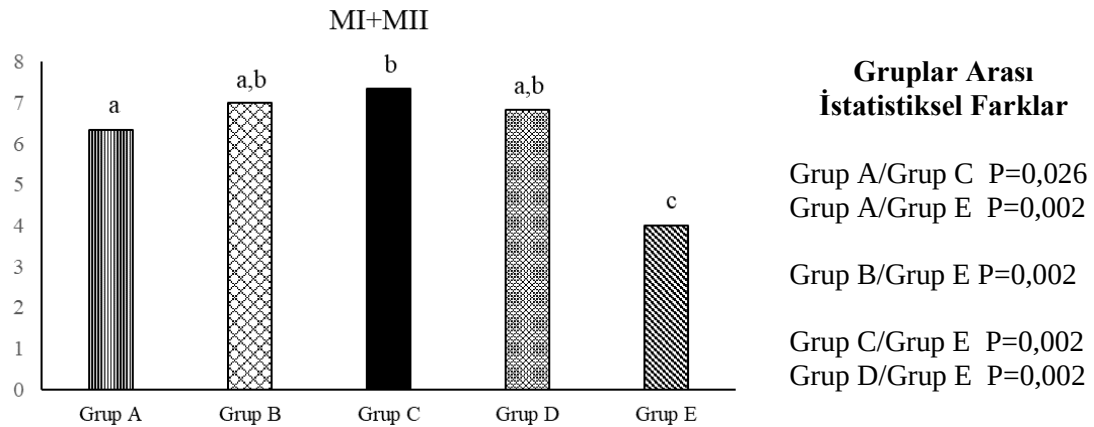
Grafik 5. DEG sayılarının gruplar arası istatistiksel farkları. ^{a,b,c} Üst simgeler istatistiksel farkları gösterir $p<0,05$

Mayotik sürecin başlamasıyla aktive olan oositlerin (GVBD, MI ve MII) gruplar arası istatistiksel analizinde anlamlı fark tespit edildi ($p<0,001$). İstatistiksel değeriendirme sonucunda, Grup A'nın diğeri tüm gruplara göre farklı olduğu belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gruplar arasında (Grup B, C, D ve E) da istatistiksel olarak farklılık belirlendi. Grup A-Grup B ($p=0,026$), Grup A-Grup C ($p=0,004$), Grup A-Grup D ($p=0,015$), Grup A-Grup E ($p=0,002$), Grup B-Grup E ($p=0,002$), Grup C-Grup E ($p=0,002$), Grup D-Grup E ($p=0,002$). Grup A'da, en fazla mayoza başlayan oosit sayısı belirlendi ($32,50\pm0,54$). Nano-ozon konsantrasyonu arttıkça, aktive olan oosit sayısında azalma gözlemlendi. Azalmanın en yüksek olduğu grup, Grup E olarak belirlendi ($29,00\pm0,00$). GVBD, MI ve MII aşamasındaki toplam oositlerin gruplar arası istatistiksel farkları Grafik 6'da gösterildi.



Grafik 6. GVBD+MI+MII aşamasındaki toplam oosit sayılarının gruplar arası istatistiksel farkları. a,b,c Üst simgeler istatistiksel farkları gösterir p<0,05

MI-MII aşamasına ulaşan oositlerin gruplar arasında istatistiksel karşılaştırmada anlamlı fark tespit edildi ($p<0,001$). Grup E'nin tüm gruplardan farklı olduğu ($p=0,002$) belirlendi, ayrıca Grup A ile Grup C arasında istatistiksel fark tespit edildi ($p=0,026$). Başlangıçta konsantrasyon artışına bağlı olarak MI-MII aşamasına ulaşan oosit sayısında artış gözlemlendi. Böylece en fazla MI-MII aşamasına ulaşan oosit sayısı Grup C'de gözlemlendi ($7,33\pm0,51$) ve daha sonra azalış meydana geldi. Grup E'de ise en az sayıda oosit MI-MII aşamasına ulaştı ($4,00\pm0,00$). MI ve MII aşamasındaki toplam oositlerin gruplar arası istatistiksel farkları Grafik 7'de gösterildi.



Grafik 7. MI+MII aşamasındaki toplam oosit sayılarının gruplar arası istatistiksel farkları. a,b,c Üst simgeler istatistiksel farkları gösterir p<0,05

4.3. Nano-Ozon Solüsyonunun Antioksidan ve Oksidan İlişkili Enzim Seviyelerine Etkisi

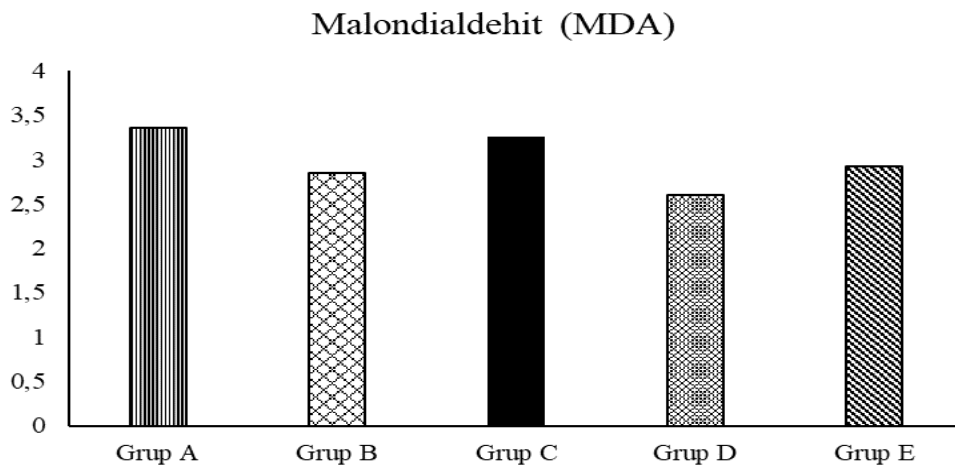
Maturasyonunu tamamlayan her grup için, partenogenetik aktivasyon öncesi kültür örnekleri toplandı. Oksidatif stres indikatörü olarak MDA, antioksidan savunma mekanizmasının ana enzimleri olan GSH ve SOD seviyeleri değerlendirildi. Bunlara ek olarak, antioksidanların toplam miktarlarını belirlemek amacıyla FRAP yöntemi uygulandı.

4.3.1. Malondialdehit (MDA) Seviyelerinin Sonuçları

Gruplara göre MDA seviyelerinde istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p>0,05$). En yüksek MDA seviyesi, Grup A'da ($3,35\pm1,00$) belirlendi. İstatistiksel fark olmamasına rağmen, nano-ozon solüsyonu kullanılarak hazırlanan gruplardaki MDA seviyeleri, Grup A'ya göre düşük bulundu. En düşük MDA seviyesi Grup D'de ($2,65\pm0,77$) belirlendi. Gruplara ait ortalama MDA seviyeleri, Tablo 13'te verildi. Ek olarak, gruplara arası istatistiksel sonuçlar Grafik 8'de verildi.

Tablo 13. Gruplara ait MDA seviyelerinin sonuçları. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ SD olarak verildi.

	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D	Grup E
Ortalama $\pm$ SD	$3,35\pm1,00$	$2,85\pm0,53$	$3,25\pm0,85$	$2,65\pm0,77$	$2,92\pm1,27$



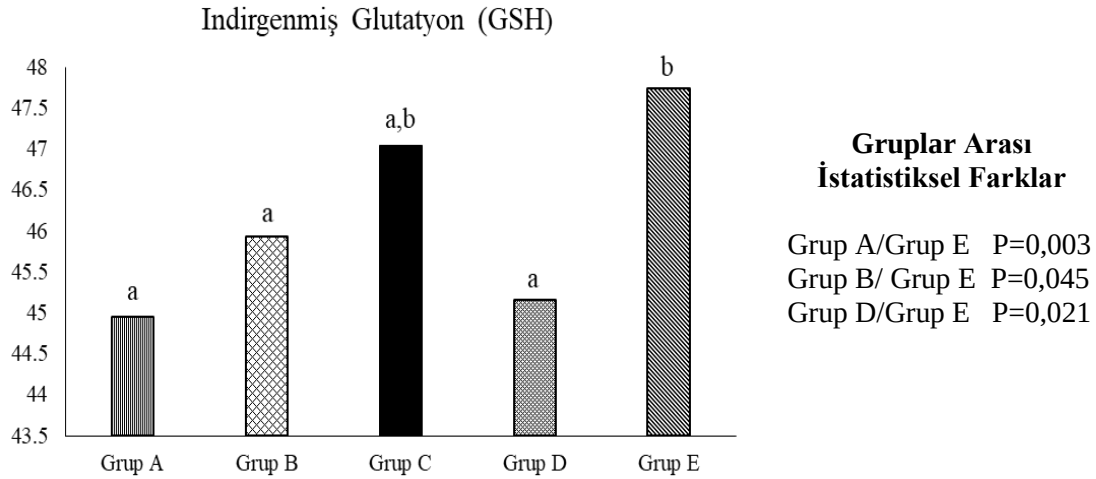
Grafik 8. Gruplar arası MDA istatistiksel sonuçları

4.3.2. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Seviyelerinin Sonuçları

GSH seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel fark tespit edildi ($p=0,048$). Grup A-Grup E ($p=0,003$), Grup B-Grup E ($p=0,045$) ve Grup E-Grup D ($p=0,021$) arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu. Grup A’da belirlenen GSH seviyesi ($44,94\pm1,48$), nano-ozon solüsyonuyla hazırlanan tüm gruplara göre düşük bulundu. En yüksek GSH seviyesi, Grup E’de ($47,73\pm1,91$) belirlendi. Gruplara ait ortalama GSH seviyeleri, Tablo 14’te verildi. Ek olarak, gruplara arası istatistiksel farklar Grafik 9’da verildi.

Tablo 14. Gruplara ait GSH seviyelerinin sonuçları. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ SD olarak verildi.

	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D	Grup E
Ortalama $\pm$ SD	44,94 $\pm$ 1,48	45,93 $\pm$ 1,10	47,04 $\pm$ 2,79	45,15 $\pm$ 1,79	47,73 $\pm$ 1,91



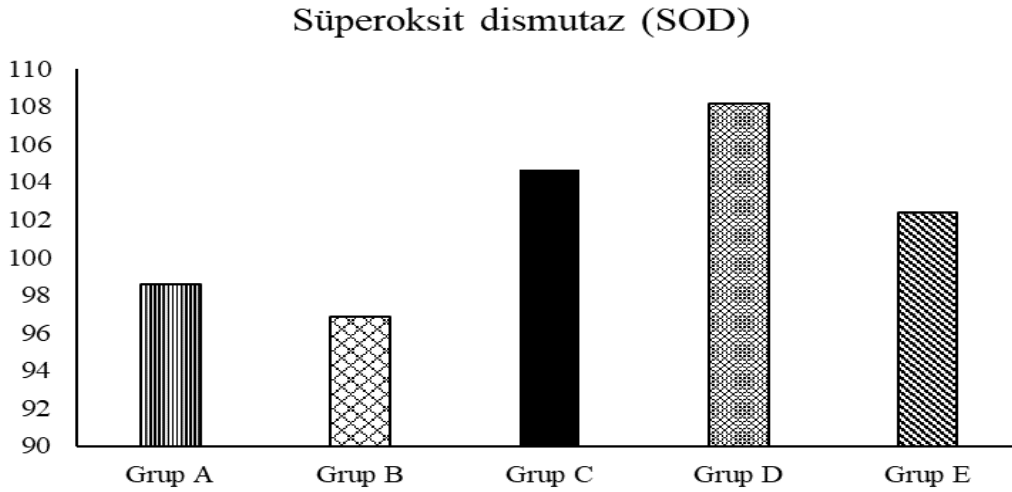
Grafik 9. Gruplar arası GSH istatistiksel sonuçları. ^{a,b} Üst simgeler istatistiksel farkları gösterir $p<0,05$

4.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Seviyelerinin Sonuçları

SOD seviyelerinde gruplar arasında fark bulunamadı ($p>0,05$). En düşük SOD seviyesi Grup B’de ($96,85\pm9,00$), en yüksek Grup D’de ($108,17\pm13,71$) belirlendi. Gruplara ait ortalama SOD seviyeleri, Tablo 15’te verildi. Ek olarak, gruplara arası istatistiksel sonuçlar Grafik 10’da verildi.

Tablo 15. Gruplara ait SOD seviyelerinin sonuçları. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ SD olarak verildi.

	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D	Grup E
Ortalama $\pm$ SD	98,57 $\pm$ 16,57	96,85 $\pm$ 9,00	104,67 $\pm$ 16,06	108,17 $\pm$ 13,71	102,39 $\pm$ 18,96



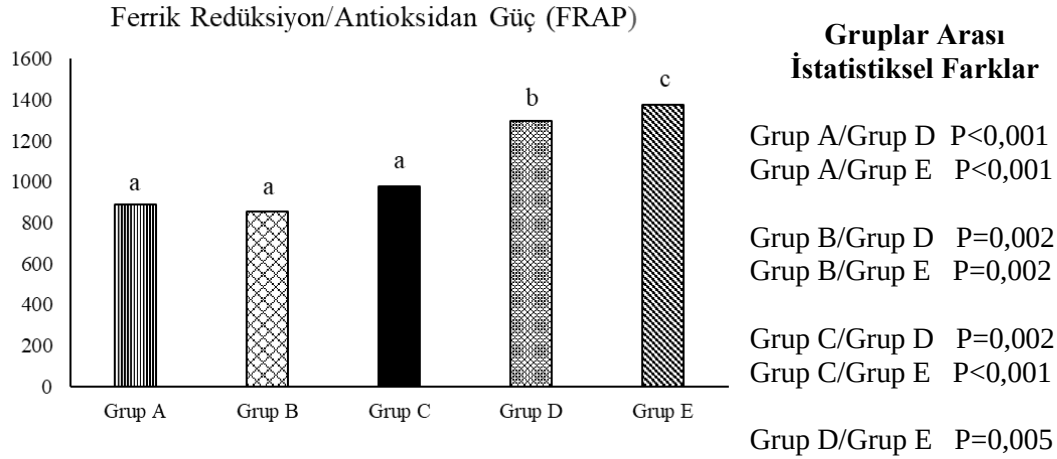
Grafik 10. Gruplar arası SOD istatistiksel sonuçları

4.3.4. Ferrik Redüksiyon/Antioksidan Güç (FRAP) Değerlerinin Sonuçları

FRAP seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel fark olduğu bulundu ($p < 0,001$). İstatistiksel değerlendirme sonucunda, Grup D ve Grup E'nin diğer tüm gruplara göre farklı olduğu tespit edildi; Grup A-Grup D ($p < 0,001$), Grup B-Grup D ($p = 0,002$), Grup C-Grup D ($p = 0,002$), Grup A-Grup E ($p < 0,001$), Grup B-Grup E ($p = 0,002$), Grup C-Grup E ($p < 0,001$), Grup D-Grup E ($p = 0,005$). Nano-ozon konsantrasyonu artıkça, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gruplarda FRAP değerlerinde artış gözlemlendi. Bu durum, sadece Grup B'de farklıydı. Çünkü en düşük FRAP değeri, Grup B'de ($854,66 \pm 79,17$) belirlendi. Grup E ise, en yüksek FRAP değerine sahipti ($1376,60 \pm 45,61$). Gruplara ait ortalama FRAP değerleri, Tablo 16'da verildi. Ek olarak, gruplara arası istatistiksel sonuçlar Grafik 11'de verildi.

Tablo 16. Gruplara ait FRAP seviyelerinin sonuçları. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ SD olarak verildi.

	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D	Grup E
Ortalama $\pm$ SD	888,57 $\pm$ 62,56	854,66 $\pm$ 79,17	977,70 $\pm$ 204,78	1296,84 $\pm$ 26,85	1376,60 $\pm$ 45,61



Grafik 11. Gruplar arası FRAP istatistiksel sonuçları. ^{a,b,c} Üst simgeler istatistiksel farkları gösterir $p < 0,05$

4.4. Nano-Ozon Solüsyonunun Oosit Maturasyonu İlişkili Gen Ekspresyonlarına Etkisi

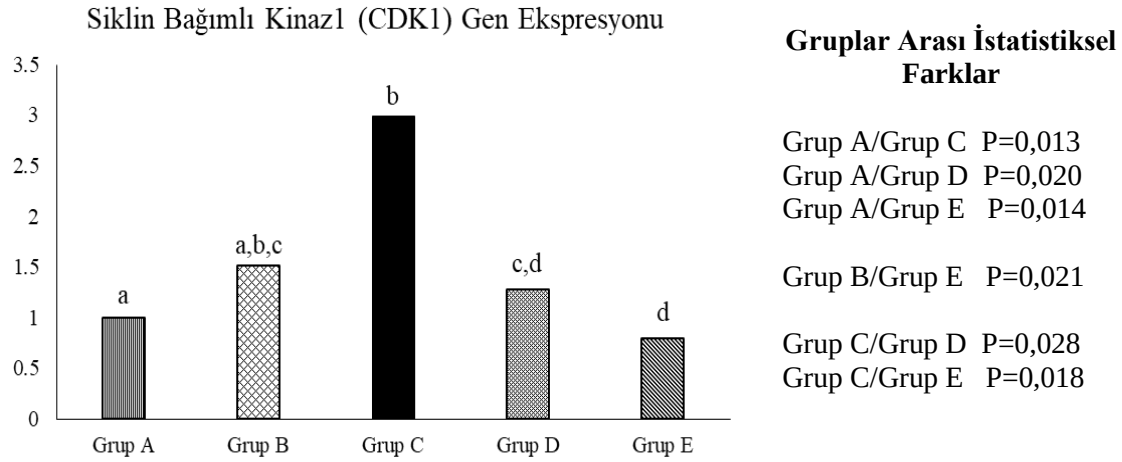
Mayotik blokajın devam etmesinde ve mayozun yeniden başlamasında MPF aktivitesi önemlidir. MPF iki alt birimden oluştuğu için, CDK1 ve Siklin B1 gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi ön plana çıkmaktadır.

4.4.1. Siklin Bağımlı Kinaz1 (CDK1) Gen Ekspresyonu Sonuçları

Katalitik alt birim CDK1 ekspresyonu, gruplar arasında istatistiksel olarak farklı bulundu ($p = 0,007$). Değerlendirme sonucunda, Grup A-Grup C ($p = 0,013$), Grup A-Grup D ($p = 0,020$), Grup A-Grup E ($p = 0,014$), Grup B-Grup E ($p = 0,021$), Grup C-Grup D ($p = 0,028$), Grup C-Grup E ($p = 0,018$) arasında istatistiksel fark tespit edildi. Grup C ($2,99 \pm 1,42$), CDK1 gen ekspresyonunun en yüksek olduğu gruptu. En düşük CDK1 gen ekspresyonu ise, Grup E'de ($0,79 \pm 0,37$) belirlendi. Gruplara ait ortalama gen ekspresyon değerleri, Tablo 17'de verildi. Ek olarak, gruplara arası istatistiksel sonuçlar Grafik 12'de verildi.

Tablo 17. Gruplara ait CDK1 gen ekspresyonu sonuçları. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ SD olarak verildi.

	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D	Grup E
Ortalama $\pm$ SD	1	1,51 $\pm$ 0,36	2,99 $\pm$ 1,42	1,28 $\pm$ 0,47	0,79 $\pm$ 0,37



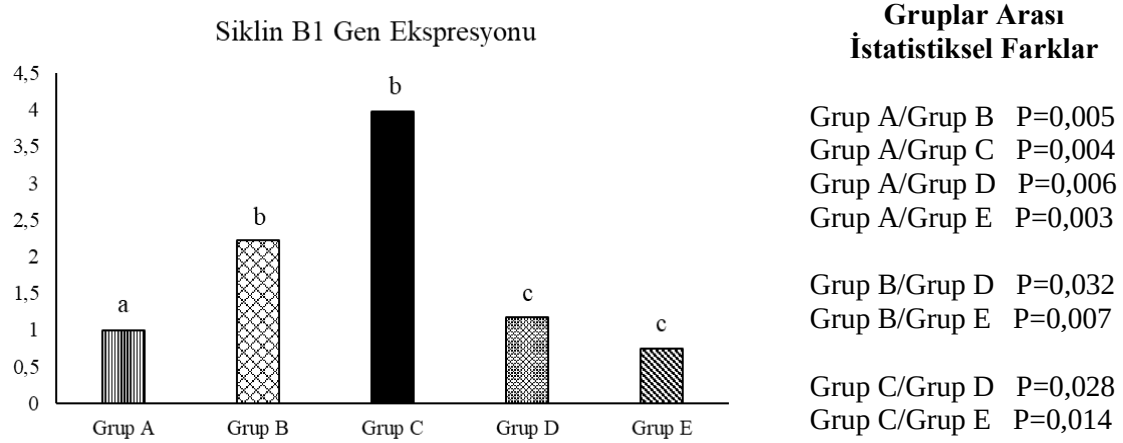
Grafik 12. Gruplara ait CDK1 genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. a,b,c,d gruplar arasındaki farkı gösterir P<0.05

4.4.2. Siklin B1 Gen Ekspresyonu Sonuçları

Regülatörük alt birim Siklin B1 ekspresyonu, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,001$). Grup A'nın diğer gruplara göre (Grup B, C, D ve E) farklı olduğu belirlendi; Grup A-Grup B ($p=0,005$), Grup A-Grup C ($p=0,004$), Grup A-Grup D ($p=0,006$) ve Grup A-Grup E ($p=0,003$). Ayrıca, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma sonucunda, Grup B-Grup D ($p=0,032$), Grup B-Grup E ($p=0,007$), Grup C-Grup D ($p=0,028$) ve Grup C-Grup E ($p=0,014$) arasındaki fark anlamlı bulundu. En yüksek Siklin B1 gen ekspresyonu Grup C'de ($3,98\pm1,65$), en düşük ekspresyon ise, Grup E'de ($0,75\pm0,21$) belirlendi. Gruplara ait ortalama gen ekspresyon değerleri, Tablo 18'de verildi. Ek olarak, gruplara arası istatistiksel sonuçlar Grafik 13'te verildi.

Tablo 18. Gruplara ait Siklin B1 gen ekspresyonu sonuçları. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ SD olarak verildi.

	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D	Grup E
Ortalama $\pm$ SD	1	2,22 $\pm$ 0,91	3,98 $\pm$ 1,65	1,17 $\pm$ 0,75	0,75 $\pm$ 0,21



Grafik 13. Gruplara ait Siklin B1 genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. ^{a,b,c} gruplar arasındaki farkı gösterir, P<0.05

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nesli tükenmekte olan karnivor türlerinin korunması, bazı hastalıkların incelenmesi ve tedavisi, üremeye katkı sağlamak amacıyla biyoteknolojik uygulamalara ihtiyaç vardır (Chastant-Maillard ve ark., 2010; Hytönen, & Lohi, 2016; Rodrigues ve ark., 2004). Oositlerin *in vitro* maturasyonu (IVM), *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve *in vitro* embriyo kültürü (IVC) gibi YÜT'lerin gelişimi, diğer evcil türlere göre köpeklerde gecikmiştir. Bu olumsuz durumun, köpeklerin türe özgü spesifik özelliklerinin olmasından ve oosit biyolojisi sırasında meydana gelen mekanizmaların netlik kazanmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Abdel-Ghani, Abe, Asano, Hamano, & Suzuki, 2010; Chastant-Maillard ve ark., 2010). Son zamanlarda evcil köpekler, toplumdaki rolünün artması ve biyomedikal teknolojide yeni biyolojik model olmasından dolayı ilgi odağı haline gelmiştir (Chastant-Maillard ve ark., 2010). Bundan dolayı, geri planda kalmış çalışmalar tekrar gündeme gelmiştir.

Köpekler, hem reproduktif siklus, hem de oosit biyolojisi bakımından diğer evcil memelilere göre farklı özelliklere sahiptir. Monoöstrik hayvanlar olan köpekler, uzun luteal döneme ve zorunlu anöstrus dönemlerine sahiptir. Spontan ovulasyon sonucu atılan oosit, immatür haldedir. Yani, ovule olan oosit henüz fertilizasyona hazır değildir (Concannon, 2011). Fertilizasyona hazır hale gelmesi için, immatür oositin maturasyonunu tamamlayıp olgunlaşması gereklidir. Maturasyon süreci, 48-72 saatlik süre içerisinde, yüksek progesteron varlığında ve ovidukt içerisinde tamamlanır (Concannon, 2011; Reynaud ve ark., 2005). Köpek oositlerinin lipid içeriğinin ve metabolik glikoz tüketiminin fazla olması da, diğer memeli oositlerinden farklı olduğunu göstermektedir (Guraya, 1965; Lopes ve ark., 2011). Dişi gamet fizyolojisinin benzersiz olması nedeniyle, köpeklerde *in vitro* koşullarda oosit maturasyon başarısı düşük kalmaktadır (Reynaud ve ark., 2005).

Yapılan çalışmaların, köpek oositlerinin IVM oranını artırmaya yönelik olduğu görülmektedir. Bu amaçla, *in vitro* kültür koşullarında, *in vivo* foliküler ve oviduktal koşullar taklit edilmeye devam etmektedir. Düşük maturasyon oranları, oositlerin mayozu başlatıp devam ettirmede başarısız ya da kültür koşullarının yetersiz olmasından kaynaklanabilmektedir (Luvoni, 2000). *In vitro* kültür ortamını etkileyen faktörlerin belirlenmesi önemli hale gelmekte ve *in vitro* koşulların iyileştirilmesi ön

plana çıkmaktadır (Pereira ve ark., 2012). Bu faktörler; kültür medyumunu ve süresi, kültür ortamına eklenen ajanlar olarak belirtilmektedir (Songsasen, & Wildt, 2007). Köpek oositlerinin maturasyon sürecinde, *in vitro* kültür ortamları farklı serum ve protein kaynakları, hormonlar ve büyüme faktörleri ile desteklenmektedir (Evecen ve ark., 2002; Song ve ark., 2011; Qin ve ark., 2022). Buna rağmen, olgunlaşan oosit oranı düşük kalmaktadır. Oositlerin gelişim sürecini etkileyen ana faktörlerden biri de, *in vitro* koşullarda oluşan OS'dir (Du Plessis ve ark., 2008; Soto-Heras, & Paramio, 2020). OS'yi önlemek amacıyla, antioksidan özelliği bulunan maddelerin kültür şartlarında kullanılması önem kazanmıştır. Bu çalışmada, hem oksidan hem de antioksidan özelliği olduğu düşünülen, nano-teknolojik yöntemle geliştirilerek, biyomalzeme özelliği kazandırılan nano-ozon solüsyonu kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki nano-ozon solüsyonunun oosit nükleer maturasyon oranlarına ve kültür medyumundaki oksidan-antioksidan ilişkili enzim düzeylerine etkisi değerlendirildi. Ek olarak, partenogenetik aktivasyon sonucunda oositler toplanarak, mayozun yeniden başlamasında ve maturasyon sürecinde etkili olan genlerin ekspresyonları değerlendirildi. Böylece, nano-ozon solüsyonun *in vitro* maturasyon sürecinde oositte ve kültür ortamında, nasıl bir etki oluşturduğu sorusunun açıklığa kavuşturulması amaçlandı.

GVBD aşamasından, MI ve MII aşamasına geçen oosit oranının yüksek olması, östrus fazıyla ilişkilendirilmiştir. Ovaryumların aktif fazda, yani foliküler ya da luteal dönemde olması, köpek *in vitro* oosit çalışma sonuçlarını olumlu yönde etkilediği belirtilmektedir (Apparicio ve ark., 2011; Barati ve ark., 2022). Vitellusları homojen, koyu pigmentli ve en az iki sıra kumulus hücre katmanıyla tamamen çevrili, iyi kalite *Grade 1* aşamasındaki oositlerin oranı, aktif fazda daha yüksek olduğu bilinmektedir (Fujii ve ark., 2000). Tez çalışmasında da, östrus siklusunun aktif fazında olduğu belirlenen köpeklerden toplanan oositler kullanılmıştır. *Grade 1* oositlerin luteal ya da foliküler evrede yüksek olduğu sonuçlarımız, diğer araştırmacıların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Ancak Rodrigues, & Rodrigues (2003)'e göre MI ve MII aşamasına geçişte, siklusun her döneminde toplanan oositlerden benzer maturasyon başarısı elde edilebilir. Östrus siklusunun her aşamasında *Grade 1*'de olan oositlerin aynı başarılı sonuçlar verebileceği, dolayısıyla siklusun aşaması yerine oosit kalitesinin ön planda tutulması önerilmektedir (Rodrigues, & Rodrigues, 2003). Tez çalışmasında aktif fazda olan köpekler kullanılmış, anöstrustaki köpekler çalışmaya dâhil

edilmemiştir. Ancak araştırmacıların öne sürdüğü ve her iki kriterin sağlandığı oosit seçimi yapılmıştır. Grade 1 oositlerin çalışmamıza dâhil edilmiş olması, gruplar arasında GVBD'den MI ve MII aşamasına geçiş oranlarında anormal sapmalara engel olduğu kanısındayız. Bu durumda farklı kültür katkılarıyla yapılacak çalışmalarda, oosit kalite homojenizasyonunun sağlanabileceğini düşünmekteyiz.

Köpek IVM çalışmalarının başarısının artırılabilmesi için her geçen gün yeni protokoller oluşturulmaktadır. Bunlardan bir tanesi de kültür ortamına eklenen antioksidan maddelerdir ve bu konuda az sayıda çalışma yapıldığı görülmektedir. Kim ve ark (2004)'nın yaptığı çalışmada, antioksidan madde olarak β -merkaptotanol kullanmıştır. TCM 199 ortamına farklı konsantrasyonlarda β -merkaptotanol eklenerek, köpek oositleri *in vitro* maturasyona bırakılmıştır (Kim ve ark., 2004). Başka bir çalışmada ise, köpek oositlerinin *in vitro* maturasyonu, TCM 199 besi yerine, tiyol bileşikleri olan sistein ve sisteamin tek başına veya kombinasyon halinde eklenerek gerçekleştirilmiştir (Hossein ve ark., 2007). Yapılan iki çalışmada da, farklı seksüel aşamadaki oositler ayrı kültüre edilmiş ve antioksidan maddelerin oosit nükleer morfolojisine etkisi değerlendirilmiştir. Kim ve ark (2004), β -merkaptotanol ile yapılan çalışmada, GV aşamasında kalan oosit oranını %5-47 olarak bildirirken, Hossein ve ark (2007), tiyol bileşikleriyle kültüre edilen oositlerde GV oranını %5,2-17,9 olarak bildirmiştir (Hossein ve ark., 2007; Kim ve ark., 2004). Çalışmamızda, dört farklı konsanstrasyonda nano-ozonla kültüre edilen oositlerin GV aşamasındaki oranı %0-3,5 olarak bulunmuştur. Nano-ozon konsantrasyonun artmasıyla kontrol grubuna göre, Grup B ve C'de GV oositlerinde azalma gözlenmiştir. Sadece Grup C'de GV aşamasında olan oosit gözlenmemiştir. Grup C'den sonra, konsantrasyon artıkça GV aşamasındaki oosit oranında da artış görülmüştür. En yüksek GV oosit oranı Grup E'de belirlenmiştir. Çalışmamız diğer kültür katkılı araştırmalarla karşılaştırıldığında, Grup C (1 μ g/ml nano-ozon katkısı)'de GV aşamasında kalan oosit oranı oldukça düşük bulunmuştur (Duque Rodriguez ve ark., 2021; Hossein ve ark., 2007; Kim ve ark., 2004). Kontrol grubuyla istatistiksel fark bulunmamasına rağmen Grup B'de daha düşük, Grup C'de ise hiç GV oosite rastlanmamıştır. Bu durumda antioksidan etkisinin de değerlendirildiği düşük doz nano-ozonun kültür ortamına katıldığında GV'den mayoza geçişi indükleyen iyi bir ajan olabileceği düşünülmektedir.

Memeli oositlerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* maturasyon sürecinde morfolojik değişiklikler meydana gelir. GV aşamasındaki oositte, mayozun başlamasıyla nükleer zarf parçalanması ve nükleolusun kaybolması gerçekleşir. GVBD olarak bilinen bu olay, mayozun yeniden başlamasının ilk işaretlerinden biridir (Tripathi ve ark., 2010). Çalışmamızda, en yüksek GVBD kontrol grubunda, nano-ozon katkılı gruplar arasında Grup E’de en düşük bulunmuştur. Nano-ozon solüsyonunun konsantrasyona bağlı kalmaksızın tüm gruplarda GVBD’ye geçişi artırdığı görülmektedir. Antioksidan katkılı kültürlerde kontrol grubuna göre azalan GBVD oranı diğer araştırmalarda da düşük bulunmuş ve çalışmamızla benzer sonuçları göstermiştir (Hossein ve ark., 2007; Kim ve ark., 2004). Bu sonuçlarla GV’den GVBD’ye geçiş sonuçları başarılı kabul edilebilir. Ancak kullanılan kültür katkılarının mayozu devam ettirerek MI, MII aşamasına geçişteki başarısının daha önemli olduğu kanısındayız.

Mayozun devam etmesiyle, oositler MI aşamasına doğru ilerler. Oositlerin MI aşamasına ulaşması, mayotik maturasyonun dönüm noktası olarak kabul edilmektedir (Sen, & Caiazza, 2013; Wei, Zhang, Wang, Schatten, & Sun, 2015). Çalışmamızda, en yüksek MI oranı Grup B’de, en düşük Grup E’de gözlenmiştir. Grup B dışındaki diğer nano-ozon katkılı gruplardaki MI oosit oranı, konsantrasyon artışına bağlı olarak azalmıştır. Sonuçlarımız, çeşitli antioksidan katkılı çalışmaların sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir (Hossein ve ark., 2007; Kim ve ark., 2004). Maturasyonunu tamamlayan oosit, MII aşamasındadır ve IVM başarısını değerlendirmede önemlidir (Moawad ve ark., 2021; Sen, & Caiazza, 2013). Antioksidan katkılı köpek IVM çalışmalarında en yüksek MII oranı %41,4 olarak bildirilmiştir (Moawad ve ark., 2021). Çalışmamızın MII sonuçları, %1,79-6,89 arasında değişiklik göstermiştir. Nano-ozon konsantrasyonunun artışına paralel olarak MII oositlerinde de artış görülmüştür. En yüksek MII oranı, Grup C’de belirlenmiştir. Grup C’den sonra, konsantrasyon arttıkça MII oranlarında belirgin azalma gözlenmiştir. Çalışmamızdaki MII sonuçları, Moawad ve ark (2021) ve Duque Rodriguez ve ark (2021)’na göre düşük, Hossein ve ark (2007) ve Kim ve ark (2004) bulgularına benzer bulunmuştur (Duque Rodriguez ve ark., 2021; Hossein ve ark., 2007; Kim ve ark., 2004; Moawad ve ark., 2021). Sonuçlar doğrultusunda, hem oositlerin mayotik sürecini hem de maturasyonunu tamamlamasında, nano-ozonun katkısının etkili olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, IVM

oranlarını artırmak için, nano-ozon solüsyonunun en uygun konsantrasyonunun belirlenerek kullanılmasının önemli olduğu kanaatindeyiz.

Köpek oositleri IVM sırasında yüksek oranda dejenere olmaktadır. Herhangi katkı madde olmaksızın TCM 199 ile kültüre edilen köpek oositlerinin %25-40'ının dejenere olduğu bildirilmektedir (Liang ve ark., 2012; Pernes ve ark., 2016). Farklı antioksidan karakterdeki katkı maddeleri eklenerek yapılan çalışmalarda bu oran %16 ila %38 arasında değişmektedir (Liang ve ark., 2012; Salavati, Ghafari, Zhang, & Fouladi-Nashta, 2012). Çalışmamızdaki dejenere oosit oranı, %4,34-18,38 olarak bulunmuştur. Kültür ortamındaki nano-ozon konsantrasyon artışına bağlı olarak, dejenere oosit oranında kademeli artış görülmüştür. Dejenerasyon oranı, nano-ozon katkılı gruplarda kontrol grubuna göre yüksek bulunsada, diğer antioksidan katkılı çalışmalara göre çok düşük bulunmuştur (Liang ve ark., 2012; Pernes ve ark., 2016; Salavati ve ark., 2012). Bu sonuçlara göre, nano-ozonun kültür şartlarında, oositleri dejenerasyona karşı protektif etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Memeli oositlerinin fertilizasyonu ve ardından embriyonik gelişimi, maturasyon aşamasının başarılı şekilde tamamlanmasına bağlıdır (Sen, & Caiazza, 2013). Nükleer olgunluk iki aşamada kazanılır. Birincisi, oositler mayozu yeniden başlatarak, GVBD'dan MI aşamasına geçer. İkincisi, oositler mayozu sürdürme yeteneği kazanarak, MI'den MII aşamasına ulaşır (Eppig, 1996). Çalışmamızda, mayotik sürece giren ve maturasyonu tamamlama yeteneğine sahip oosit oranları değerlendirilmiştir.

Memeli oositlerinde meydana gelen hücresel olaylar, ROS seviyelerine bağlıdır. *In vitro* kültür sistemlerinde, *in vivo* olanlardan daha yüksek ROS üretimi söz konusudur (Khazaei, & Aghaz, 2017). Orta düzeyde ROS üretimi, blokaja uğrayan GV oositlerinde mayozun başlamasında etkili olmaktadır. ROS'un yüksek seviyeleriye, *in vitro* oosit mayotik hücre döngüsünün durmasına ve apoptozise neden olmaktadır (Pandey, Tripathi, Premkumar, Shrivastav, & Chaube, 2010; Tiwari ve ark., 2016). Oositler, oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji ihtiyaçlarını karşılar. Bu esnada O₂ kullanıldığından, fizyolojik olarak ROS üretilir (Khazaei, & Aghaz, 2017). Hem *in vivo* hem de *in vitro* maturasyon sırasında O₂, kumulus-oosit yapısı için önemli bileşendir (Silva, Rodriguez, Cavalcante, Rodrigues, & Rodrigues, 2009). Köpek oositlerinin IVM çalışmasında, farklı iki O₂ konsantrasyonunun (%5 ve %20) etkisi değerlendirilmiştir. Düşük O₂ (%5) koşullarında, mayotik sürece giren ve MII aşamasına ulaşan oosit

oranının daha yüksek, dejenerasyon oranının da daha düşük olduğu bildirilmiştir (Salavati ve ark., 2012). O₂ konsantrasyonunun artması, daha fazla ROS üretimine neden olarak, oksidan/antioksidan dengenin bozulmasına yol açar. Sonuç olarak, hücrel homeostaz mekanizmasının etkilenmesi, OS oluşumuna sebep olur (Khazaei, & Aghaz, 2017; Salavati ve ark., 2012). Yüksek O₂ seviyesi, kumulus-oosit hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna sebep olarak köpek oositlerinde apoptozisin indüklenmesinden sorumludur. Bu olumsuz etkilerin, mayozu tamamlayan oosit oranında azalmaya ve dejenerasyon oranlarında artışa neden olduğu bildirilmektedir (Salavati ve ark., 2012; Silva ve ark., 2009). Çalışma esnasında kullanılan katkı maddesinin biyoaktif molekülü O₃'tür. O₃ molekülü, biyolojik olayların gerçekleştiği sıvı ortamlarla etkileştiğinde çözünme yeteneğine sahiptir. Biyomoleküllerle reaksiyonu sonucunda O₃, moleküler (O₂) ve atomik (O⁻) oksijene ayrışır (Bocci, 2006). O₃ etkisini, direkt molekülleri oksitleyerek ROS üretimine ya da organik moleküllerdeki çift bağlarla reaksiyona girerek lipid oksidasyon ürünlerinin üretimine neden olarak gösterir (Bocci, 2006; Mudway, & Kelly, 2000).

Çalışmamızda, mayotik sürece giren (GVBD+MI+MII) ve mayozu tamamlayan (MI+MII) oositlerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Mayotik sürece giren oosit oranı, en yüksek kontrol grubunda, en düşük Grup E'de bulunmuştur. Konsantrasyon arttıkça Grup B ve Grup C'de MI ve MII'ye geçiş yapan oosit oranında artış, Grup D ve Grup E'de azalma meydana gelmiştir. Nano-ozon katkılı gruplarda bu oran düşük bulunmuş ve Salavati ve ark (2012)'nin yaptığı çalışmayla benzer sonuçlar göstermiştir (Salavati ve ark., 2012). Ayrıca, nano-ozon konsantrasyonundan bağımsız olarak, tüm gruplarda yüksek oranda mayotik sürece giren oosit olduğu görülmektedir. Çalışma sonuçlarımız, antioksidan etkinin araştırıldığı köpek IVM çalışmalarından yüksek bulunmuştur (Hossein ve ark., 2007; Liang ve ark., 2012; Salavati ve ark., 2012).

Kültür koşulları fark etmeksizin oositlerin sadece %10-20'sinin mayotik maturasyonu tamamlayabildiği bildirilmiştir (Luvoni ve ark., 2005). Bugüne kadar yapılan *in vitro* köpek oosit çalışmalarında, en yüksek maturasyon oranı %41,4'tür (Moawad ve ark., 2021). Yine de bu oran, diğer türlerle karşılaştırıldığında düşük kalmaktadır. Çalışmamızdaki oositlerin MI+MII oranları, %10,76-21,67 olarak bulunmuştur. Nano-ozon konsantrasyonundaki artışla beraber MI+MII oranları, Grup C'ye kadar artmış, Grup C'den sonra azalma eğilimi göstermiştir. En yüksek MI+MII

oranı Grup C’de, en düşük Grup E’de belirlenmiştir. Sonuçlarımız, Pernes ve ark (2016)’nın antioksidan etkinin değerlendirildiği IVM çalışma bulgularıyla benzerlik göstermektedir (Pernes ve ark., 2016). Kontrol grubuna göre, Grup E dışındaki tüm nano-ozon katkılı gruplardaki mayozu tamamlayan oosit oranı daha yüksektir. Sonuçlarımız, nano-ozonun *in vitro* kültür ortamında oositlerin gelişimi için yeterli seviyede O₂ desteği sağladığını ve ROS üretiminin kontrolünü sağlayarak, oosit mayozunda etkili olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, oosit maturasyon başarısının tahmin edilmesinde, mayotik sürece giren ve mayozunu tamamlayan oositlerin değerlendirilmesinin önemli olduğu kanısındayız.

5.1. Nano-Ozon Solüsyonunun Antioksidan ve Oksidan İlişkili Enzim Seviyelerine Etkisi

Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin oluşumu önemli yer tutmaktadır. Bu radikaller, organizmada normal metabolik olaylar sırasında ya da dış faktörlerin etkisiyle de oluşabilmektedir. Belirli düzeyde kaldıkları sürece, hücresel savunma mekanizmasında rol oynayan moleküllerdir. Ancak serbest radikal üretimi artar ve antioksidan sistemi yetersiz kalırsa hücrenin yapısında bulunan biyomoleküllerle reaksiyona girerler (Ayala ve ark., 2014; Tsikas, 2023). Özellikle lipitler, serbest radikallerin hasarına son derece hassas yapılardır ve lipit peroksidasyona sebep olurlar. Reaksiyon sonucunda çok çeşitli ürünler oluşur. Bu ürünlerden MDA, oksidatif stresin biyokimyasal indikatörü olarak kullanılmaktadır (Tsikas, 2017). Köpek oositlerinin lipit içeriğinin fazla olmasından dolayı, OS ve lipit peroksidasyona oldukça duyarlıdır (Lopes ve ark., 2011; Songsasen, & Wildt, 2007). Bu nedenle köpek oosit çalışmalarında MDA seviyesinin değerlendirilmesi, OS belirlenmesi açısından önemlidir.

OS ilişkili zararlı radikallerin toksik etkilerini azaltmak için, GSH ve SOD antioksidan savunma sisteminin önemli enzimleridir. Hücreleri ROS toksisitesinden koruyan ve H₂O₂’nin suya dönüşümünden sorumlu antioksidan enzim GSH’tır (Adeoye ve ark., 2018). GSH, oositlerde ve embriyolarda lipit peroksidasyona karşı etki gösteren, DNA hasarının onarılmasında etkili enzimatik olmayan bir antioksidandır (Silva, & Silva, 2023). Artan süperoksit radikali, SOD enzimi ile H₂O₂ ve O₂’ye dönüştürülerek ortamdan uzaklaştırılır (Weydert, & Cullen, 2010). H₂O₂, hücre

membranından kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Stabil molekül olsa da özellikle proteinlerdeki Fe^{+2} ile reaksiyona girerek Fe^{+3} 'e yükseltgenir ve hidroksil radikali oluşturur (Fenton reaksiyonu). Hidroksil radikali, biyokimyasal moleküllerle reaksiyona girerek oositlerde oksidatif modifikasyonlara sebep olur (Ayala ve ark., 2014; Shaeib, Banerjee, Maitra, Diamond, & Abu-Soud, 2013).

O_3 , güçlü oksitleyici özellikteki moleküldür. Etki mekanizması dikkate alındığında zararlı oksijen türlerin ve lipid peroksidasyon oluşumuna katıldığı bildirilmektedir (Bocci, 2006; Mudway, & Kelly, 2000). Ancak, O_3 doza bağlı olarak etkisini gösterir. Uygun doz aralığında uygulandığında terapötik etki gösterirken, yüksek doz uygulamaları toksisiteye sebep olabilmektedir (Bocci, Borrelli, Travagli, & Zanardi, 2009). Ozon uygulamasındaki ilk etki, antioksidan sistemi aktifleştirerek kontrollü bir OS'yi indüklemektir (Sagai, & Bocci, 2011). Araştırmalar sonucunda, gerek beşeri gerekse veteriner hekimlikte O_3 farklı doku ve sistemlere ait patolojilerin tedavisinde kullanıldığı görülmektedir (Martínez-Sánchez, Schwartz, & Donna, 2020; Teixeira ve ark., 2013). Ancak, *in vitro* oosit çalışmalarının olmaması dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda, IVM esnasında OS ile baş etmek amacıyla oositler, farklı konsantrasyonlarda antioksidatif özelliği olduğu düşünülen nano-ozon solüsyonuyla inkübe edilmiştir. Bunun sonucunda, kültür ortamında nano-ozonun, oksidan (MDA) ve antioksidan (GSH ve SOD) ilişkili enzim düzeylerine etkisi değerlendirilmiştir.

Reprodüktif sisteme ait patolojilerde, O_3 uygulaması tedavi ve tedaviye yardım amaçlı ajan olarak kullanılmaktadır (Aslan ve ark., 2012; Irollo ve ark., 2019). O_3 etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, deneysel olarak sıçanlarda over iskemi/reperfüzyon modeli oluşturulmuştur. Intraperitoneal olarak sıçanlara O_3 uygulanmış, doku örneklerinden MDA dâhil çeşitli parametreler analiz edilmiştir. Kontrol grubuna göre, O_3 uygulanan grupta MDA seviyeleri daha düşük bulunmuştur (Aslan ve ark., 2012). Başka bir çalışmada ise, sıçanlarda deneysel uterin adezyon modeli oluşturularak, O_3 uygulanmasının postoperatif intraabdominal adezyonlar üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Adezyon oluşumunda OS'in etkili olabileceği düşünüldüğünden, oksidan/antioksidan sistem ilişkili enzim düzeyleri belirlenmiştir. Postoperatif adezyon oluşumunda O_3 uygulamasının, MDA düzeylerini azaltıcı etkiye neden olduğunu bildirmişlerdir (Uysal ve ark., 2012). Çalışmamızda, MDA

seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0,005$). Buna rağmen, nano-ozon katkılı gruplardaki MDA seviyeleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Nano-ozon solüsyonun MDA sonuçlarına etkisi, O_3 ile yapılan çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (Aslan ve ark., 2012; Uysal ve ark., 2012). Sonuçlarımız, nano-ozon katkısının lipit peroksidasyon mekanizmasını etkileyerek düşük seviyede MDA oluşumuna neden olduğunu göstermektedir. Böylece, nano-ozonun kültür ortamında OS'yi minimum seviyede tutarak oositlerin gelişimi için uygun bir ortam sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Biyolojik sistemlerde GSH, antioksidan savunma sisteminde görevli temel enzimlerden biridir. GSH, serbest radikallere elektron vererek nötralize ederler veya aktif radikalleri temizlerler (Ighodaro, & Akinloye, 2018). Köpek *in vitro* oosit çalışmalarında, antioksidan özellikte sisteamin ve sisteinin kombinasyon halinde kullanılmasıyla, GSH seviyelerinde artış olduğunu bildirilmektedir (Hosseini ve ark., 2007). Kim ve ark (2007), *in vitro* kültür ortamına antioksidan olarak β -merkaptotanol ekleyerek GSH konsantrasyonlarını değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda, β -merkaptotanol katkısının, *in vitro* köpek oositlerinde GSH sentezini artırdığı ortaya çıkmıştır (Kim ve ark., 2007). Çalışmamızda GSH seviyeleri, en düşük kontrol grubunda, en yüksek Grup E'de tespit edilmiştir. Grup D dışındaki diğer nano-ozon katkılı gruplarda, konsantrasyon arttıkça GSH seviyeleri artmıştır. Nano-ozon konsantrasyonuna bağlı kalmaksızın, nano-ozonlu gruplarda kontrol grubuna göre daha yüksek GSH seviyeleri bulunmuştur. Çalışmamız, antioksidan katkılı oosit çalışmalarıyla benzer sonuçları göstermektedir (Hosseini ve ark., 2007; Kim ve ark., 2007). Farklı alanlarda O_3 uygulamasının antioksidan etkisi de değerlendirilmiştir. Böbrekleri oksidatif hasardan korumak amacıyla L-karnitin ve /veya O_3 kullanılmıştır. Her iki antioksidanın da, böbrek dokusunda GSH düzeyini arttırdığı sonucuna varılmıştır (Eroğlu, Makav, Adalı, & Çitil, 2020). O_3 uygulamasının meyvelerin antioksidan özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. O_3 'ün GPx'i aktive ederek yüksek GSH seviyelerinin oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Piechowiak, Grzelak-Błaszczuk, Sójka, & Balawejder, 2020; Zhang ve ark., 2020). Çalışmamızdaki nano-ozonun, ortamdaki serbest radikallerin uzaklaştırılması için, kültür ortamında GSH seviyelerini artırarak antioksidan etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

SOD, hücrelerde serbest radikallerin ya da ROS oluşumunu inhibe ederek etki gösterir. (Ighodaro, & Akinloye, 2018). Sıçanlarda deneysel uterin adezyon modeli oluşturularak O₃ uygulaması yapılmıştır. O₃'ün oksidan/antioksidan sistem ilişkili enzim düzeylerine etkisi belirlenmiştir. O₃ uygulamasının, SOD ve GPx seviyelerinin artışına neden olarak oksidatif/antioksidatif durumu modüle ettiği belirtilmektedir (Uysal ve ark., 2012). O₃'ün eritrosit SOD ve CAT enzim aktivitelerindeki değişimleri değerlendirilmiş ve çalışmada, O₃ uygulaması yüksek SOD aktivitesine neden olmuştur (Inal, Dokumacioglu, Özcelik, & Ucar, 2011). Çalışmamızda, SOD seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır (p>0,005). Fakat, Grup B dışındaki tüm nano-ozon katkılı gruplardaki SOD seviyeleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Nano-ozon solüsyonun SOD sonuçlarına etkisi, O₃ ile yapılan çalışma sonuçlarıyla benzerdir (Inal ve ark., 2011; Uysal ve ark., 2012). Nano-ozonun etkisiyle kültür ortamında SOD aktivitesinin yükselmesi, nano-ozon ile SOD biyosentezi arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. SOD aktivitesinin belirlenmesi, süperoksit radikallerine karşı antioksidan savunma sisteminin değerlendirilmesi açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Hidroksil radikali, H₂O₂'nin özellikle proteinlerdeki hem grubundaki serbest demir (ferröz form, Fe⁺²) ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşur. Bu reaksiyon ile ferröz form ferrik forma yükseltgenir (Ayala ve ark., 2014; Shaeib ve ark., 2013). Oositler üzerinde en zararlı ve etkili ROS türü hidroksil radikali olarak kabul edilmektedir (Shaeib ve ark., 2013). Antioksidanlar varlığında ferrik formun, ferröz forma indirgenmesi gerçekleşir (Büyüktuncel, 2013; Somwongin ve ark., 2018). Antioksidan kapasitenin belirlenmesi için FRAP yöntemi kullanılmaktadır. Çeşitli alanlarda yapılan çalışmalarda O₃ uygulaması sonucunda, FRAP değerlerinin arttığını göstermektedir (Ali, Ong, & Forney, 2014; Joanna Brodowska ve ark., 2014). Çalışmamızda, Grup B hariç tüm nano-ozon katkılı gruplarda FRAP değeri, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Konsantrasyon artıkça nano-ozonlu grupların FRAP değerlerinde yükselme görülmüştür. Sonuçlarımız, O₃ uygulaması yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Ali ve ark., 2014; Joanna Brodowska ve ark., 2014). FRAP değerlerindeki yükselme, kültür ortamında artan ROS'ların nano-ozonla reaksiyona girmesinin sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Nano-ozonun kültür

ortamında, hem hidroksil radikali üreterek oksidan, hem de süperoksit radikallerini indirgeyerek antioksidan etki gösterebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, FRAP analizinin *in vitro* köpek oosit çalışmalarında, antioksidan etkideki değişiklikleri tahmin etmede kullanılabilir bir yöntem olduğu kanısındayız.

5.2. Nano-Ozon Solüsyonunun Oosit Maturasyonu İlişkili Gen Ekspresyonlarına Etkisi

Memeli oositlerinde mayotik hücre döngüsünün yeniden başlaması ve devam etmesi MPF aktivitesi tarafından düzenlenir. GV oositlerinin mayozu devam edememesi, düşük MPF aktivitesinden kaynaklanmaktadır (Adhikari, & Liu, 2014; Saint-Dizier ve ark., 2004). Oositlerin GV'den GVBD'ye geçişi ve mayozu tamamlaması MPF aktivasyonu ile gerçekleşir. MPF aktivitesi, Siklin B1 ve CDK1'in durumuna bağlıdır (Tripathi ve ark., 2010). Farklı memeli oositlerinde, MPF ve onu oluşturan yapılar (Cdk1 ve Siklin B1) eksprese edilmiştir (Sugiura, Naito, Endo, & Tojo, 2006; Quetglas, Adona, de Bem, Pires, & Leal, 2010). Köpek oosit maturasyon regülasyonunda etkili moleküler mekanizmalarla ilgili çalışmaların eksikliği nedeniyle, mayoz döngüsünde etkili olan moleküller belirsizliğini korumaktadır. Yakın zamanda yapılan moleküler çalışmada, ilk kez evcil köpek oositlerinde MAPK, MPF, CDK1 ve Siklin B1 protein lokalizasyonu belirlenmiştir. Bu proteinlerin, köpek oositlerinde mayozun yeniden başlaması ve hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli olduğu vurgulanmıştır (Pereira ve ark., 2019). Bu çalışmada, nano-ozonla kültüre köpek oositlerinde MPF ekspresyonunu test edebilmek için, MPF regülasyonundan sorumlu alt birim genleri, CDK1 ve Siklin B1'in ekspresyonu değerlendirildi.

Memeli oositlerinde mayoz sürecinin başlaması ve devam etmesine siklin bağımlı kinazlar (CDKs) aracılık eder. (Adhikari, & Liu, 2014). Çok sayıda siklin bağımlı kinaz tanımlanmış, bunların hepsinin hücre döngüsünün farklı aşamalarında rol aldığı bildirilmiştir (Ding ve ark., 2020). Fare oositlerinde, mayozun başlamasında CDK1 ve CDK2 fonksiyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Oositlerde CDK2 geninin yokluğu, fare oositlerinin olgunlaşmasına olumsuz etkisi görülmezken, CDK1 genine sahip olmayan fare oositlerinin GV aşamasında kaldığı, mayotik iğ oluşumu ve kromozom yoğunlaşmasının meydana gelmediği görülmüştür. Sonuç olarak, mayozun yeniden başlamasında gerekli olan tek siklin bağımlı kinazın CDK1 olduğu ileri

sürülmüştür (Adhikari ve ark., 2012). CDK1 proteinlerinin, sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirmesi, GVBD oluşumu ile ilişkilendirilmiş, CDK1 mRNA ekspresyon seviyesi en yüksek MII aşamasındaki oositlerde tespit edilmiştir (Pereira ve ark., 2019; Sun, & Zhu, 2022). Domuz oositlerinde CDK1'in inhibiyonu, GV'den GVBD'ye geçişi engellemiştir. CDK1 aktivitesinin domuz oositlerinin GVBD aşamasına ilerlemesi için gerekli olduğu ortaya koyulmuştur. Ek olarak, kumulus ekspansiyonunda ve oositlerin transkripsiyonel aktivitesi için CDK1'in önemli olduğu sonucuna varılmıştır (Oqani ve ark., 2017).

Farklı antioksidan maddeler kullanılarak *in vitro* kültüre edilen oositlerde, maturasyon ilişkili faktörlerin değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur. Park ve ark (2021), domuz oositlerini kullanarak mayoz sürecinde luteolin etkisini araştırmışlar, oosit maturasyonu altında yatan mekanizmaları belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu çalışma sonucunda, antioksidan maddenin, oosit maturasyonu ile ilişkili olan CDK1 ve Siklin B1 gen ekspresyon seviyelerinde artışa sebep olduğu ortaya çıkmıştır (Park ve ark., 2021). Benzer şekilde, fare oositlerinde de *in vitro* L-karnitin katkısının oosit kalitesi ve çeşitli genlerin (MAPK, GDF-9 ve CDK1) ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi incelenmiştir. Kontrol grubuna göre, L-karnitin ile kültüre edilen fare oositlerinde CDK1 ekspresyon seviyelerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Zare ve ark., 2015). Çalışmamızdaki bütün gruplarda CDK1 geni ekspresyonu belirlenmiş, konsantrasyona bağlı olarak gen ekspresyon seviyeleri değişiklik göstermiştir. Nano-ozonlu gruplarda, konsantrasyon arttıkça gen ekspresyon seviyeleri artmış, Grup C'de en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Grup C'den sonra konsantrasyon arttıkça CDK1 gen ekspresyon seviyelerinde azalma meydana gelmiş, en düşük Grup E'de bulunmuştur. Gen düzeyinde antioksidan katkılı *in vitro* köpek oosit çalışmalarının olmaması nedeniyle, çalışma verileri farklı memeli oosit çalışmalarıyla karşılaştırılmıştır. Çalışma sonuçlarımız, farklı türlerde yapılan antioksidan katkılı *in vitro* oosit çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir (Park ve ark., 2021; Zare ve ark., 2015). Tüm gruplarda, CDK1 gen ekspresyonunun tespit edilmesi, köpek oositlerinin GV'den GVBD aşamasına geçişi için gerekli olduğunu düşündürmektedir (Pereira ve ark., 2019). CDK1 ekspresyon seviyelerinde artış görülmesi, mayozun yeniden başlayarak oositlerin MI-MII aşamasına ulaşmasında etkili olduğu kanısındayız.

GV oositlerinde CDK1 inaktiftir. CDK1'in aktifleşmesi yeterli miktarda Siklin B1 varlığına bağlıdır (Han, & Conti, 2006). Bu nedenle, köpek oositlerinin maturasyonu ile ilgili çalışmalarda hem CDK1 hem de Siklin B1'in birlikte değerlendirilmesinin daha etkili sonuçlar verebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Siklin B1, hücre döngüsünün S fazında sentezlenir. Mayozun başlamasıyla, CDK1 ile kompleks yapı (MPF) oluşturarak, G2/M geçişi sırasında aktivite gösterir (Kim ve ark., 2023). Mayozun yeniden başlamasında Siklin B1'in rolü, fare oositlerinde çalışılmıştır. Siklin B1 geni bulunmayan fare oositlerinin mayoz bölünmeye devam ettiği, CDK1 geninin ise farklı siklinler tarafından aktive edildiği ortaya çıkmıştır (Li ve ark., 2018). Aksine, köpek oositlerinde mayotik döngünün kesintiye uğramasının, azalan Siklin B1 ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Pereira ve ark., 2019). Bulguların türler arasında değişiklik göstermesi, Siklin B1'in mayoz bölünme esnasında farklı aşamalarda görev yaptığını göstermektedir.

In vitro koşullarda oositlerin çeşitli faktörlere maruz kalması, OS'ye neden olabilmekte ve apoptozisi indükleyebilmektedir (Du Plessis ve ark., 2008). Artan OS'nin, oosit gelişimi (BMP-15 ve GDF-9) ve maturasyonu ile ilişkili (MAPK ve Siklin B1) gen ekspresyonlarında azalmaya neden olduğu domuz oositlerinde bildirilmiştir (Wang ve ark., 2023). Aynı çalışmada, antioksidan madde özelliği olan melatonin kullanılarak, *in vitro* sistemlerdeki olumsuz etkilerin ortadan kaldırılması, gen düzeyindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kullanılan antioksidan maddenin, siklin B1 gen ekspresyon seviyelerini arttırdığı sonucuna varılmıştır (Wang ve ark., 2023). IVM esnasında kültür ortamına L-karnitin eklenerek fare oositleri inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna göre, antioksidan katkılı ortamda kültüre edilen oositlerde maturasyonla ilişkili gen (C-mos proto-onkogen ürünü (Mos) ve Siklin B1) ekspresyon seviyelerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Zare, Abouhamzeh, Masteri Farahani, Salehi, & Mohammadi, 2017). Çalışmamızdaki Siklin B1 gen ekspresyonu bütün gruplarda belirlenmiştir. Nano-ozon konsantrasyonuna bağlı olarak, gruplar arasında Siklin B1 gen ekspresyon seviyeleri değişiklik göstermiştir. Nano-ozonlu gruplarda, konsantrasyon arttıkça gen ekspresyon seviyeleri artmış, Grup C'de en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Grup C'den sonra konsantrasyon arttıkça Siklin B1 gen ekspresyon seviyesinde azalma meydana gelmiş, en düşük Grup E'de bulunmuştur. Çalışma sonuçlarımızın, farklı türlerde *in vitro* antioksidan katkısının maturasyon

ilişkili genlere etkisinin değerlendirildiği çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. Siklin B1 gen ekspresyonunda belirlenen değişiklikler, CDK1 ile paralellik göstermektedir. Memeli oositlerinin mayozunda rol oynayan farklı siklinlerin olması göz önünde bulundurulduğunda, köpek oositlerinin mayotik mekanizmasında Siklin B1 ve CDK1'in değerlendirilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir. Kültür ortamına eklenen nano-ozonun, maturasyonda yer alan sinyal mekanizmalara etki ederek oositin mayozunu düzenlediğini düşünmekteyiz. Gruplara göre CDK1 ve Siklin B1 ekspresyonunun artışı, oosit morfoloji sonuçlarına paralellik gösterdiği görülmektedir. Bu çalışma aynı zamanda, CDK1 ve Siklin B1'in protein düzeyinde belirlenmesinden sonra, ilk kez gen düzeyinde belirlenmiş olup, Pereira ve ark (2019)'nın çalışma sonuçlarını konfirme ettiği kanısındayız.

Sonuç olarak, kontrol grubunda mayoz sürecine giren oosit oranı fazla olmasına rağmen, maturasyonu tamamlamadaki başarısının düşük olduğu görülmektedir. Nano-ozon katkılı gruplarda ise, oositlerin hem mayozu başlatma hem de maturasyonu tamamlama yeteneği yüksektir. Artan konsantrasyonla birlikte GVBD'den MII aşamasına ulaşan oosit oranında artış görülse de yüksek konsantrasyonlar oranların azalmasına neden olmuştur. Nano-ozon, kültür ortamında antioksidan ilişkili enzimlerin konsantrasyonunu arttırmış, lipid peroksidasyon oluşumunu engelleyerek zararlı radikallerin ve OS oluşumunu azaltmış ya da önlemiştir. Bu durum, oosit maturasyonunun başarılı şekilde sürdürülmesi için kültür ortamını uygun hale getirmiş olabilir. Oosit maturasyonu ilişkili genlerin yüksek seviyelerde ekspresyonu, nano-ozonun mayotik mekanizmalarda etkili olduğunu göstermektedir. Bu bilgilerle, köpek oosit IVM çalışmalarında düşük doz nano-ozonun kullanılması gerektiği, en uygun ve etkili dozun 0,5 µg/ml ve 1 µg/ml olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda, aygır spermasının dondurma ve saklanması düşük dozda ozon kullanımının sperm parametrelerini olumlu etkilediği bildirilmiştir (Pereira ve ark., 2022). Yine, çalışma grubumuzun tamamladığı bir başka araştırmada da benzer sonuçlar alınmış, koç sperm kriyoprezervasyonunda kullanılan düşük doz nano-ozon solüsyonu, antioksidan yolları aktive ederek pro-oksidatif etki meydana getirdiği ortaya konmuştur. Yüksek konsantrasyonların da hücre için zararlı oksidatif etkiyi indüklediği tarafımızca bildirilmiştir (Toker ve ark., 2023, basım aşamasında).

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, nano-ozonun, oosit IVM'si sırasında antioksidatif etkiler gösterdiği, maturasyon ilişkili faktörlerin ekspresyon seviyelerini artırdığı ve MII aşamasına ilerlemeyi sağlayarak oosit maturasyonunu etkilediğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Ghani, M. A., Abe, Y., Asano, T., Hamano, S., & Suzuki, H. (2010). Effect of bovine cumulus-oocyte complexes-conditioned medium on in-vitro maturation of canine oocytes. *Reproductive Medicine and Biology*, 10(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/s12522-010-0069-y>
- Abdel-Ghani, M. A., Shimizu, T., & Suzuki, H. (2014). Expression pattern of vascular endothelial growth factor in canine folliculogenesis and its effect on the growth and development of follicles after ovarian organ culture. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(5), 734–739. <https://doi.org/10.1111/rda.12357>
- Abdel-Rahman Mohamed, A., Khater, S. I., Metwally, M. M. M., Bin Emran, T., Nassan, M. A., Abd El-Emam, M. M., ... El-Shetry, E. S. (2022). TGF- β 1, NAG-1, and antioxidant enzymes expression alterations in Cisplatin-induced nephrotoxicity in a rat model: Comparative modulating role of Melatonin, Vit. E and Ozone. *Gene*, 820, 146293. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146293>
- Adeoye, O., Olawumi, J., Opeyemi, A., & Christiania, O. (2018). Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assisted Reproduction*, 22(1), 61–66. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180003>
- Adhikari, D., & Liu, K. (2014). The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.07.027>
- Adhikari, D., Zheng, W., Shen, Y., Gorre, N., Ning, Y., Halet, G., ... Liu, K. (2012). Cdk1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes. *Human Molecular Genetics*, 21(11), 2476–2484. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds061>
- Al-Gubory, K. H., Fowler, P. A., & Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(10), 1634–1650. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.06.001>
- Ali, A., Ong, M. K., & Forney, C. F. (2014). Effect of ozone pre-conditioning on quality and antioxidant capacity of papaya fruit during ambient storage. *Food Chemistry*, 142, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.039>
- Altman, N. (2007). *The oxygen prescription: the miracle of oxidative therapies*. Inner Traditions/Bear & Co.
- Andersen, A. C., & Simpson, M. E. (1973). *The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle)*. Los Altos, USA, Geron-X, Inc.
- Apparicio, M., Alves, A. E., Pires-Butler, E. A., Ribeiro, A. P., Covizzi, G. J., & Vicente, W. R. (2011). Effects of hormonal supplementation on nuclear maturation and cortical granules distribution of canine oocytes during various reproductive stages. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(5), 896–903. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01761.x>
- Apparicio, M., Mostachio, G. Q., Motheo, T. F., Alves, A. E., Padilha, L., Pires-Butler, E. A., ... Vicente, W. R. (2015). Distribution of cortical granules and meiotic maturation of canine oocytes in bi-phasic systems. *Reproduction, Fertility, and Development*, 27(7), 1082–1087. <https://doi.org/10.1071/RD14022>

- Argudo, D. E., Tenemaza, M. A., Merchán, S. L., Balvoa, J. A., Méndez, M. S., Soria, M. E., ... Perea, F. P. (2020). Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance. *Theriogenology*, 155, 232-239. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.044>
- Aryan, H., Mardenli, O., & Groza, I. (2022). Morphocytometric evaluation of equine oocytes following *in vitro* maturation. Bulletin of University of Agricultural Sciences And Veterinary Medicine Cluj-Napoca. *Veterinary Medicine*, 80(1). <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:2022.0022>
- Aslan, M. K., Boybeyi, Ö., Şenyücel, M. F., Ayva, Ş., Kısa, Ü., Aksoy, N., ... Çakmak, M. (2012). Protective effect of intraperitoneal ozone application in experimental ovarian ischemia/reperfusion injury. *Journal of Pediatric Surgery*, 47(9), 1730–1734. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.03.082>
- Astudillo, I., Aspee, K., Palomino, J., Peralta, O. A., Parraguez, V. H., & De Los Reyes, M. (2023). Meiotic development of canine oocytes from poly-ovular and mono-ovular follicles after *in vitro* maturation. *Animals*, 13(4), 648. <https://doi.org/10.3390/ani13040648>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bahrami, M., Morris, M. B., & Day, M. L. (2019). Amino acid supplementation of a simple inorganic salt solution supports efficient *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes. *Scientific reports*, 9(1), 11739. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48038-y>
- Balta, P., Kumral, N. A., & Sabancı, A. Ü. (2020). Nano-ozon solüsyon formülasyonun kuru kayısılarda zararlı *Carpoglyphus lactis* (L.) (Acari: *Carpoglyphidae*)'in biyolojik aktivitelerine etkisi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34 (1) , 53-70. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/bursauludagziraat/issue/54627/619016>
- Barati, F., Ehsani, M., Otoi, T., Fallah, A. A., & Dehkordi, S. H. (2022). Reproductive cycle and *in vitro* maturation of canine oocyte: A meta-analysis approach. *Theriogenology*, 188, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.018>
- Barber, M. R., Lee, S. M., Steffens, W. L., Ard, M., & Fayrer-Hosken, R. A. (2001). Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology*, 55(8), 1705–1717. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00514-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00514-3)
- Barros, V. R. P., Monte, A. P. O., Santos, J. M. S., Lins, T. L. B. G., Cavalcante, A. Y. P., Gouveia, B. B., ... Matos, M. H. T. (2020). Effects of melatonin on the *in vitro* growth of early antral follicles and maturation of ovine oocytes. *Domestic Animal Endocrinology*, 71, 106386. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.106386>
- Basini, G., Simona, B., Santini, S. E., & Grasselli, F. (2008). Reactive oxygen species and anti-oxidant defences in swine follicular fluids. *Reproduction, Fertility, and Development*, 20(2), 269–274. <https://doi.org/10.1071/rd07147>
- Bilodeau-Goeseels, S. (2011). Cows are not mice: the role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 78(10-11), 734–743. <https://doi.org/10.1002/mrd.21337>

- Bocci, V. A. (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of Medical Research*, 37(4), 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>
- Bocci, V., Borrelli, E., Travagli, V., & Zanardi, I. (2009). The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Medicinal Research Reviews*, 29(4), 646–682. <https://doi.org/10.1002/med.20150>
- Bouftas, N., & Wassmann, K. (2019). Cycling through mammalian meiosis: B-type cyclins in oocytes. *Cell Cycle*, 18(14), 1537–1548. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1632139>
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 975–999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
- Büyüktuncel, E. (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17(2), 93–103. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/marupj/issue/17908/188416>
- Carbone, M. C., Tatone, C., Delle Monache, S., Marci, R., Caserta, D., Colonna, R., & Amicarelli, F. (2003). Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Molecular Human Reproduction*, 9(11), 639–643. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag090>
- Cardilli, D. J., Sousa-Oliveira, K., Franchi-João, C., Azevedo-Voorwald, F., Machado-Silva, M. A., Oliveira, J. A., ... Pérez-Gutiérrez, J. F. (2021). Immunolocalization and effect of low concentrations of Insulin like growth factor-1 (IGF-1) in the canine ovary. *Veterinary Medicine and Science*, 7(1), 46–56. <https://doi.org/10.1002/vms3.347>
- Cerezetti, M. B., González, S. M., Ferraz, C. R., Verri, W. A., Jr, Rabelo, E. A., Seneda, M. M., & Morotti, F. (2021). Impact of the antioxidant quercetin on morphological integrity and follicular development in the in vitro culture of Bos indicus female ovarian fragments. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 57(9), 856–864. <https://doi.org/10.1007/s11626-021-00629-8>
- Chang, H., Li, J., Zhang, C., & Qian, W. (2022). Octocrylene exposure impairs mouse oocyte quality by inducing spindle defects and mitochondria dysfunction. *Toxicology*, 479, 153306. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153306>
- Chastant-Maillard, S., Chebrou, M., Thoumire, S., Saint-Dizier, M., Chodkiewicz, M., & Reynaud, K. (2010). Embryo biotechnology in the dog: a review. *Reproduction, Fertility, and Development*, 22(7), 1049–1056. <https://doi.org/10.1071/RD09270>
- Chastant-Maillard, S., Saint-Dizier, M., Grimard, B., Chebrou, M., Thoumire, S., & Reynaud, K. (2012). Are oocytes from the anestrous bitch competent for meiosis?. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), 74–79. <https://doi.org/10.1111/rda.12007>
- Chastant-Maillard, S., Viaris de Lesegno, C., Chebrou, M., Thoumire, S., Meylheuc, T., Fontbonne, A., ... Reynaud, K. (2011). The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation. *Reproduction, Fertility, and Development*, 23(3), 391–402. <https://doi.org/10.1071/RD10064>
- Combelles, C. M., Holick, E. A., Paoletta, L. J., Walker, D. C., & Wu, Q. (2010). Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles. *Reproduction*, 139(5), 871–881. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0390>

- Concannon, P. W. (2009). Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 (2), 3–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x>
- Concannon, P. W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124 (3-4), 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.028>
- Concannon, P. W., McCann, J. P., & Temple, M. (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility*, 39, 3–25.
- Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology & Medicine*, 95, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>
- de Araujo, C. H. M., Nogueira, D., de Araujo, M. C. P. M., Martins, W.deP., Ferriani, R. A., & dos Reis, R. M. (2009). Supplemented tissue culture medium 199 is a better medium for in vitro maturation of oocytes from women with polycystic ovary syndrome women than human tubal fluid. *Fertility and Sterility*, 91(2), 509–513. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.082>
- de Avila Rodrigues, B., & Rodrigues, J. L. (2003). Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology*, 60(1), 59–66. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01301-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01301-8)
- De Lesegno, C. V., Reynaud, K., Pechoux, C., Thoumire, S., & Chastant-Maillard, S. (2008). Ultrastructure of canine oocytes during in vivo maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 75(1), 115–125. <https://doi.org/10.1002/mrd.20763>
- De Los Reyes, M., de Lange, J., Miranda, P., Palominos, J., & Barros, C. (2005). Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 64(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.11.008>
- De Los Reyes, M., Palomino, J., Villagra, A., Ramirez, G., Peralta, O. A., Parraguez, V. H., & Aspee, K. (2023). Effect of progesterone on in vitro meiotic maturation of canine oocytes associated with Cx37 and Cx43 gene expression. *Theriogenology*, 204, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.04.005>
- DiLuigi, A., Weitzman, V. N., Pace, M. C., Siano, L. J., Maier, D., & Mehlmann, L. M. (2008). Meiotic arrest in human oocytes is maintained by a Gs signaling pathway. *Biology of Reproduction*, 78(4), 667–672. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066019>
- Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., ... Cui, Q. (2020). The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1960. <https://doi.org/10.3390/ijms21061960>
- Donato, G. G., Appino, S., Bertero, A., Poletto, M. L., Nebbia, P., Robino, P., ... Nervo, T. (2023). Safety and effects of a commercial ozone foam preparation on endometrial environment and fertility of mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 121, 104222. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104222>
- Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186, 421–431. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-i](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-i)

- Du Plessis, S. S., Makker, K., Desai, N. R., & Agarwal, A. (2008). Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*, 3(4), 539–554. doi:10.1586/17474108.3.4.539
- Duque Rodriguez, M., Cittadini, C. O., Teplitz, G. M., De Stefano, A., Lombardo, D. M., & Salamone, D. F. (2021). Canine IVM with SOF medium, insulin-transferrin-selenium, and low O₂ tension improves oocyte meiotic competence and decreases reactive oxygen species levels. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 694889. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.694889>
- Durrant, B. S., Pratt, N. C., Russ, K. D., & Bolamba, D. (1998). Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49(5), 917–932. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00041-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00041-7)
- El-Raey, M., Geshi, M., Somfai, T., Kaneda, M., Hirako, M., Abdel-Ghaffar, A. E., ... Nagai, T. (2011). Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, 78(4), 250–262. <https://doi.org/10.1002/mrd.21295>
- England, G. C., Russo, M., & Freeman, S. L. (2009). Follicular dynamics, ovulation and conception rates in bitches. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 (2), 53–58. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01416.x>
- Eppig, J. J. (1996). Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility, and Development*, 8(4), 485–489. <https://doi.org/10.1071/rd9960485>
- Erkan-Alkan, P., Güneş, M., Özakin, C., & Sabancı, A. (2021). Nanoparticle liposomes: a new strategy in bacterial infections. *Klimik Journal*, 34(2), 99-102. 10.36519/kd.2021.3633
- Eroğlu, H. A., Makav, M., Adalı, Y., & Çitil, M., (2020). Effects of ozone and L-carnitine on kidney MDA, GSH, and GSHPx levels in acetaminophen toxicity. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26(1), 127-134. 10.9775/kvfd.2019.22456
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, 11(1), 81–128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
- Evecen, M., Baran, A., Alkan, S., Özdaş, Ö. B., & Tek, Ç. (2002). The effects of BSA and FCS on in vitro maturation of bitch oocytes. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 26(6), 1453-1458.
- Evecen, M., Cirit, U., Demir, K., Ozdaş, O. B., Taş, M., Birler, S., & Pabuccuoğlu, S. (2010). Effects of estrous cycle stage and transport temperature of ovaries on in vitro maturation of canine oocytes. *Animal Reproduction Science*, 117(1-2), 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.03.004>
- Fahiminiya, S., Reynaud, K., Labas, V., Batard, S., Chastant-Maillard, S., & Gérard, N. (2010). Steroid hormones content and proteomic analysis of canine follicular fluid during the preovulatory period. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 132. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-132>

- Fan, Z., Yang, M., Regouski, M., & Polejaeva, I. A. (2017). Effects of three different media on in vitro maturation and development, intracellular glutathione and reactive oxygen species levels, and maternal gene expression of abattoir-derived goat oocytes. *Small Ruminant Research*, 147, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.12.041>
- Ferencova, I., Vaskovicova, M., Drutovic, D., Knoblochova, L., Macurek, L., Schultz, R. M., & Solc, P. (2022). CDC25B is required for the metaphase I-metaphase II transition in mouse oocytes. *Journal of Cell Science*, 135(6), jcs252924. <https://doi.org/10.1242/jcs.252924>
- Ferré-Pujol, P., Nguyen, X. K., Nagahara, T., Bui, T. T. M., Wakai, T., & Funahashi, H. (2019). Removal of cumulus cells around 20 h after the start of in vitro maturation improves the meiotic competence of porcine oocytes via reduction in cAMP and cGMP levels. *The Journal of Reproduction and Development*, 65(2), 177–182. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-130>
- Firmani, L. (2018). *The G protein-coupled receptor, GPR3, promotes the acquisition of oocyte meiotic competence*. (Doktora Tezi, Connecticut Üniversitesi – Storrs) <https://opencommons.uconn.edu/dissertations/1694>
- Flohé, L., & Otting, F. (1984). Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology*, 105, 93–104. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05013-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05013-8)
- Forman, H. J. (2016). Redox signaling: An evolution from free radicals to aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 97, 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.003>
- Forman, H. J., Maiorino, M., & Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, 49(5), 835–842. <https://doi.org/10.1021/bi9020378>
- Fujii, M., Otoi, T., Murakami, M., Tanaka, M., Une, S., & Suzuki, T. (2000). The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 62(3), 305–307. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.305>
- Gao, Z., Deng, W., & Zhu, F. (2019). Reference gene selection for quantitative gene expression analysis in black soldier fly (*Hermetia illucens*). *PloS One*, 14(8), e0221420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221420>
- Garcia, P., Aspee, K., Ramirez, G., Dettleff, P., Palomino, J., Peralta, O. A., ... De Los Reyes, M. (2019). Influence of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on in vitro maturation of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), 373–380. <https://doi.org/10.1111/rda.13371>
- Gebicka, L., & Krych-Madej, J. (2019). The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 197, 110699. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110699>
- Groppetti, D., Aralla, M., Bronzo, V., Bosi, G., Pecile, A., & Arrighi, S. (2015). Periovarian time in the bitch: what's new to know?: Comparison between ovarian histology and clinical features. *Animal Reproduction Science*, 152, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.11.008>
- Guedea-Betancourt, J. J., Quezada-Casasola, A., Núñez-Gastélum, J. A., Orozco-Lucero, E., Escárcega-Ávila, A. M., Soler Valls, A. J., & Carrera-Chávez, J. M. (2022). Effect of *Moringa oleifera* seed extract on antimicrobial activity and in vitro fertilization ability of cryopreserved ram semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(12), 1564–1571. <https://doi.org/10.1111/rda.14233>

- Gupta, A., & Chaube, S. K. (2020). Cilostamide and rolipram prevent spontaneous meiotic resumption from diplotene arrest in rat oocytes cultured in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 878, 173115. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173115>
- Gupta, S., Choi, A., Yu, H. Y., Czerniak, S. M., Holick, E. A., Paoletta, L. J., ... Combelles, C. M. (2011). Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. *Reproduction, Fertility, and Development*, 23(5), 673–680. <https://doi.org/10.1071/RD10270>
- Guraya, S. S. (1965). A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog. *The Journal of Experimental Zoology*, 160(1), 123–135. <https://doi.org/10.1002/jez.1401600111>
- Haenisch-Woehl, A., Kölle, S., Neumüller, C., Sinowatz, F., & Braun, J. (2003). Morphology of canine cumulus-oocyte complexes in pre-pubertal bitches. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 32(6), 373–377. <https://doi.org/10.1046/j.0340-2096.2003.00514.x>
- Han, S. J., & Conti, M. (2006). New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle*, 5(3), 227–231. <https://doi.org/10.4161/cc.5.3.2395>
- Hatoya, S., Sugiyama, Y., Nishida, H., Okuno, T., Torii, R., Sugiura, K., ... Inaba, T. (2009). Canine oocyte maturation in culture: significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. *Theriogenology*, 71(4), 560–567. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.013>
- He, C., & Ma, X. (2015). Distal fallopian tube recanalization using ozone treatment: a clinical study in two hundred tubal obstruction Chinese patients. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(2), 2958–2961.
- He, C., Wang, J., Zhang, Z., Yang, M., Li, Y., Tian, X., ... Liu, G. (2016). Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte's quality under in vitro conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 939. <https://doi.org/10.3390/ijms17060939>
- Hewitt, D. A., Watson, P. F., & England, G. C. (1998). Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*, 49(6), 1083–1101. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00058-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00058-2)
- Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74(1), 214–226. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)
- Hollinshead, F., & Hanlon, D. (2019). Normal progesterone profiles during estrus in the bitch: A prospective analysis of 1420 estrous cycles. *Theriogenology*, 125, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.018>
- Horner, K., Livera, G., Hinckley, M., Trinh, K., Storm, D., & Conti, M. (2003). Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental Biology*, 258(2), 385–396. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00134-9](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00134-9)
- Hossein, M. S., Kim, M. K., Jang, G., Oh, H. J., Koo, O., Kim, J. J., ... Hwang, W. S. (2007). Effects of thiol compounds on in vitro maturation of canine oocytes collected from different reproductive stages. *Molecular Reproduction and Development*, 74(9), 1213–1220. <https://doi.org/10.1002/mrd.20674>

- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Hytönen, M. K., & Lohi, H. (2016). Canine models of human rare disorders. *Rare Diseases*, 4(1), e1241362. <https://doi.org/10.1080/21675511.2016.1241362>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Inal, M., Dokumacioglu, A., Özcelik, E., & Ucar, O. (2011). The effects of ozone therapy and coenzyme Q₁₀ combination on oxidative stress markers in healthy subjects. *Irish Journal of Medical Science*, 180(3), 703–707. <https://doi.org/10.1007/s11845-011-0675-7>
- Irollo, A. M., Gangale, M. F., Calabrese, G., Stortini, E., Zanconi, S., Aiello, R., ... De Simone, M. L. (2019). H.A.R.O.T. Human assisted reproduction ozone therapy: the use of Oxygen-Ozone therapy as an adjunct in the therapy of couple sterility. *Ozone Therapy*, 4(3), 64–67. <https://doi.org/10.4081/ozone.2019.8700>
- Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 48(284), 124–127.
- Joanna Brodowska, A., Śmigielski, K., Nowak, A., Brodowska, K., Catthoor, R., & Czyżowska, A. (2014). The impact of ozone treatment on changes in biologically active substances of cardamom seeds. *Journal of Food Science*, 79(9), C1649–C1655. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12591>
- Kably Ambe, A., Ruiz Anguas, J., Carballo Mondragón, E., Corona de Lau, C., & Karchmer Krivitsky, S. (2004). Correlation between follicle levels of superoxide dismutase and oocyte quality, fertilization rates and embryo development. *Ginecologia y Obstetricia de Mexico*, 72, 335–344.
- Khadrawy, O., Gebremedhn, S., Salilew-Wondim, D., Rings, F., Neuhoﬀ, C., Hoelker, M., ... Tesfaye, D. (2020). Quercetin supports bovine preimplantation embryo development under oxidative stress condition via activation of the Nrf2 signalling pathway. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(10), 1275–1285. <https://doi.org/10.1111/rda.13688>
- Khazaei, M., & Aghaz, F. (2017). Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during in vitro maturation of oocytes. *International Journal of Fertility & Sterility*, 11(2), 63–70. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2017.4995>
- Kim, B. S., Lee, S. R., Hyun, B. H., Shin, M. J., Yoo, D. H., Lee, S., ... Ryoo, Z. Y. (2010). Effects of gonadotropins on in vitro maturation and of electrical stimulation on parthenogenesis of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(1), 13–18. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01128.x>
- Kim, H. M., Kang, M. K., Seong, S. Y., Jo, J. H., Kim, M. J., Shin, E. K., ... Han, S. J. (2023). Meiotic cell cycle progression in mouse oocytes: Role of cyclins. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13659. <https://doi.org/10.3390/ijms241713659>

- Kim, J. J., Park, K. B., Choi, E. J., Hyun, S. H., Kim, N. H., Jeong, Y. W., & Hwang, W. S. (2017). Relationship between time post-ovulation and progesterone on oocyte maturation and pregnancy in canine cloning. *Animal Reproduction Science*, 185, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.08.004>
- Kim, M. K., Fibrianto, Y. H., Oh, H. J., Jang, G., Kim, H. J., Lee, K. S., ... Hwang, W. S. (2004). Effect of beta-mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on in vitro maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. *Journal of Veterinary Science*, 5(3), 253–258.
- Kim, M. K., Fibrianto, Y. H., Oh, H. J., Jang, G., Kim, H. J., Lee, K. S., ... Hwang, W. S. (2005). Effects of estradiol-17beta and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 63(5), 1342–1353. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.019>
- Kim, M. K., Hossein, M. S., Oh, H. J., Fibrianto, H. Y., Jang, G., Kim, H. J., ... Lee, B. C. (2007). Glutathione content of in vivo and in vitro matured canine oocytes collected from different reproductive stages. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 69(6), 627–632. <https://doi.org/10.1292/jvms.69.627>
- Kim, Y. G., Kim, D. H., Song, S. H., Lee, K. L., Yang, B. C., Oh, J. S., ... Kong, I. K. (2015). Wee1B depletion promotes nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 83(4), 546–552. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.017>
- Kochan, J., Nowak, A., Młodawska, W., Prochowska, S., Partyka, A., Skotnicki, J., & Nizański, W. (2020). Comparison of the morphology and developmental potential of oocytes obtained from prepubertal and adult domestic and wild cats. *Animals*, 11(1), 20. <https://doi.org/10.3390/ani11010020>
- Kooistra, H. S., & Okkens, A. C. (2001). Role of changes in the pulsatile secretion pattern of FSH in initiation of ovarian folliculogenesis in bitches. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 57, 11–14.
- Kwak, S. S., Cheong, S. A., Jeon, Y., Lee, E., Choi, K. C., Jeung, E. B., & Hyun, S. H. (2012). The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology*, 78(1), 86–101. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.024>
- Larson, G., Karlsson, E. K., Perri, A., Webster, M. T., Ho, S. Y., Peters, J., ... Lindblad-Toh, K. (2012). Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23), 8878–8883. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203005109>
- Ledan, E., Polanski, Z., Terret, M. E., & Maro, B. (2001). Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Developmental Biology*, 232(2), 400–413. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0188>
- Lee, H., Elahi, F., Lee, J., Lee, S. T., Hyun, S. H., & Lee, E. (2017). Supplement of cilostamide in growth medium improves oocyte maturation and developmental competence of embryos derived from small antral follicles in pigs. *Theriogenology*, 91, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.015>

- Lee, H. S., Seo, Y. I., Yin, X. J., Cho, S. G., Lee, S. S., Kim, N. H., ... Kong, I. K. (2007). Effect of follicle stimulation hormone and luteinizing hormone on cumulus cell expansion and in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(6), 561–565. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00818.x>,
- Li, J., Tang, J. X., Cheng, J. M., Hu, B., Wang, Y. Q., Aalia, B., ... Liu, Y. X. (2018). Cyclin B2 can compensate for Cyclin B1 in oocyte meiosis I. *The Journal of Cell Biology*, 217(11), 3901–3911. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802077>
- Li, Y., Dong, Z., Liu, S., Gao, F., Zhang, J., Peng, Z., ... Pan, X. (2022). Astaxanthin improves the development of the follicles and oocytes through alleviating oxidative stress induced by BPA in cultured follicles. *Scientific Reports*, 12(1), 7853. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11566-1>
- Liang, S., Kang, J., Jin, H., Liu, X., Li, J., Li, S., ... Yin, X. J. (2012). The influence of 9-cis-retinoic acid on nuclear and cytoplasmic maturation and gene expression in canine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology*, 77(6), 1198–1205. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.027>
- Lillo, E., Cordisco, M., Trotta, A., Greco, G., Carbonari, A., Rizzo, A., ... Corrente, M. (2023). Evaluation of antibacterial oxygen/ozone mixture in vitro activity on bacteria isolated from cervico-vaginal mucus of cows with acute metritis. *Theriogenology*, 196, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.10.031>
- Liu, M. J., Sun, A. G., Zhao, S. G., Liu, H., Ma, S. Y., Li, M., ... Liu, H. B. (2018). Resveratrol improves in vitro maturation of oocytes in aged mice and humans. *Fertility and sterility*, 109(5), 900–907. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.020>
- Liu, N., Si, X., Ji, Y., Yang, Q., Bai, J., He, Y., ... Wu, Z. (2023). L-proline improves the cytoplasmic maturation of mouse oocyte by regulating glutathione-related redox homeostasis. *Theriogenology*, 195, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.10.023>
- Lopes, G., Alves, M. G., Carvalho, R. A., Luvoni, G. C., & Rocha, A. (2011). DNA fragmentation in canine oocytes after in vitro maturation in TCM-199 medium supplemented with different proteins. *Theriogenology*, 76(7), 1304–1312. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.037>
- Lopes, G., Rocha, A., & Sousa, M. (2010). Comparative ultrastructural analysis of diestrous and anestrous canine Grade 1 cumulus-oocyte complexes. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.018>
- Lopes, G., Sousa, M., Luvoni, G. C., & Rocha, A. (2007). Recovery rate, morphological quality and nuclear maturity of canine cumulus-oocyte complexes collected from anestrous or diestrous bitches of different ages. *Theriogenology*, 68(6), 821–825. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.011>
- Luberda, Z. (2005). The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology*, 5(1), 5–17.
- Luciano, A. M., Franciosi, F., Modina, S. C., & Lodde, V. (2011). Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). *Biology of Reproduction*, 85(6), 1252–1259. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092858>

- Luo, D., Zhang, J. B., Li, S. P., Liu, W., Yao, X. R., Guo, H., ... Kim, N. H. (2020). Imperatorin ameliorates the aging-associated porcine oocyte meiotic spindle defects by reducing oxidative stress and protecting mitochondrial function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 592433. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.592433>
- Luvoni, G. C. (2000). Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reproduction, Nutrition, Development*, 40(5), 505–512. <https://doi.org/10.1051/rnd:2000114>
- Luvoni, G. C., Chigioni, S., Allievi, E., & Macis, D. (2005). Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 63(1), 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.004>
- Luvoni, G. C., Luciano, A. M., Modina, S., & Gandolfi, F. (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.
- Marangos, P., & Carroll, J. (2004). The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. *Reproduction*, 128(2), 153–162. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00192>
- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48-78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>
- Martínez-Sánchez, G., Schwartz, A., & Donna, V. D. (2020). Potential cytoprotective activity of ozone therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. *Antioxidants*, 9(5), 389. <https://doi.org/10.3390/antiox9050389>
- Matos, L., Stevenson, D., Gomes, F., Silva-Carvalho, J. L., & Almeida, H. (2009). Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Molecular Human Reproduction*, 15(7), 411–419. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap034>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- Mehlmann, L. M. (2005). Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Developmental Biology*, 288(2), 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.030>
- Meng, T. G., Lei, W. L., Li, J., Wang, F., Zhao, Z. H., Li, A., ... Ou, X. H. (2020). Degradation of Ccnb3 is essential for maintenance of MII arrest in oocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 521(1), 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.124>
- Merin, O., Attias, E., Elstein, D., Schwalb, H., Bitran, D., Zimran, A., & Silberman, S. (2007). Ozone administration reduces reperfusion injury in an isolated rat heart model. *Journal of Cardiac Surgery*, 22(4), 339–342. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8191.2007.00419.x>
- Mesalam, A. A., El-Sheikh, M., Joo, M. D., Khalil, A. A. K., Mesalam, A., Ahn, M. J., & Kong, I. K. (2020). Induction of oxidative stress and mitochondrial dysfunction by juglone affects the development of bovine oocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 168. <https://doi.org/10.3390/ijms22010168>

- Moawad, A. R., Salama, A., Badr, M. R., & Fathi, M. (2021). Beneficial effects of L-carnitine supplementation during ivm of canine oocytes on their nuclear maturation and development in vitro. *Animals*, 11(2), 581. <https://doi.org/10.3390/ani11020581>
- Mudway, I. S., & Kelly, F. J. (2000). Ozone and the lung: a sensitive issue. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(1-2), 1–48. [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(00\)00003-0](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(00)00003-0)
- Mukherjee, A., Malik, H., Saha, A. P., Dubey, A., Singhal, D. K., Boateng, S., ... Malakar, D. (2014). Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(2), 229–239. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0116-9>
- Nagashima, J., Wildt, D. E., & Songsasen, N. (2010). Follicle size and gonadotropin concentrations influence in vitro growth of preantral dog follicles. *Biology of Reproduction*, 83(1), 27. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/83.s1.27>
- Nagashima, J. B., Hansen, B. S., Songsasen, N., Travis, A. J., & Place, N. J. (2016). Anti-Müllerian Hormone in the domestic dog during the anestrus to oestrous transition. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(1), 158–164. <https://doi.org/10.1111/rda.12660>
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 9613090. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006. doi:10.1039/c4ra13315c
- Nowshari, M. A. (2005). The effect of harvesting technique on efficiency of oocyte collection and different maturation media on the nuclear maturation of oocytes in camels (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*, 63(9), 2471–2481. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.057>
- Oborna, I., Wojewodka, G., De Sanctis, J. B., Fingerova, H., Svobodova, M., Brezinova, J., ... Radzioch, D. (2010). Increased lipid peroxidation and abnormal fatty acid profiles in seminal and blood plasma of normozoospermic males from infertile couples. *Human Reproduction*, 25(2), 308–316. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep416>
- Oh, J. S., Han, S. J., & Conti, M. (2010). Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *The Journal of Cell Biology*, 188(2), 199–207. <https://doi.org/10.1083/jcb.200907161>
- Oqani, R. K., Lin, T., Lee, J. E., Kim, S. Y., Kang, J. W., & Jin, D. I. (2017). Effects of CDK inhibitors on the maturation, transcription, and MPF activity of porcine oocytes. *Reproductive Biology*, 17(4), 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.09.003>
- Orisaka, M., Tajima, K., Tsang, B. K., & Kotsuji, F. (2009). Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research*, 2(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-2-9>
- Otoi, T., Ooka, A., Murakami, M., Karja, N. W., & Suzuki, T. (2001). Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility, and Development*, 13(2-3), 151–155. <https://doi.org/10.1071/rd00098>

- Otoi, T., Shin, T., Kraemer, D. C., & Westhusin, M. E. (2004). Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization. *Reproduction, Nutrition, Development*, 44(6), 631–637. <https://doi.org/10.1051/rnd:2004065>
- Otoi, T., Shin, T., Kraemer, D. C., & Westhusin, M. E. (2007). Role of cumulus cells on in vitro maturation of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(2), 184–189. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00750.x>
- Özüüçli, M. (2020). *Ergin bal arılarında nosema ceranae enfeksiyonlarına karşı ozon ve bitkisel orijinli esansiyel yağlar (THYMOL) ile artemisia absinthium ekstratının etkinliklerinin araştırılması* (Doktora Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü) <http://hdl.handle.net/11452/15159>
- Palomino, J., & De Los Reyes, M. (2016). Temporal expression of GDF-9 and BMP-15 mRNAs in canine ovarian follicles. *Theriogenology*, 86(6), 1541–1549. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.013>
- Pandey, A. N., Tripathi, A., Premkumar, K. V., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(3), 521–528. <https://doi.org/10.1002/jcb.22736>
- Pang, Y., Zhao, S., Sun, Y., Jiang, X., Hao, H., Du, W., & Zhu, H. (2018). Protective effects of melatonin on the in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Animal Science Journal*, 89(4), 648–660. <https://doi.org/10.1111/asj.12970>
- Park, S. H., Jeong, P. S., Joo, Y. E., Kang, H. G., Kim, M. J., Lee, S., ... Sim, B. W. (2021). Luteolin orchestrates porcine oocyte meiotic progression by maintaining organelle dynamics under oxidative stress. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 689826. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.689826>
- Park, Y. S., You, S. Y., Cho, S., Jeon, H. J., Lee, S., Cho, D. H., ... Oh, J. S. (2016). Eccentric localization of catalase to protect chromosomes from oxidative damages during meiotic maturation in mouse oocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 146(3), 281–288. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1446-3>
- Pereira, L. M. C., Bersano, P. R. O., Rocha, D. D., & Lopes, M. D. (2019). Effect of EGF on expression and localization of maturation-promoting factor, mitogen-activated protein kinase, p34cdc2 and cyclin B during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), 325–341. <https://doi.org/10.1111/rda.13365>
- Pereira, L. M. C., Bicuda, S. D., & Lopes, M. D. (2012). Oocyte maturation in bitches. *Animal Reproduction*, 9(3), 205–209.
- Pereira, R. R., Nogueira, B. G., Milan, B., Acacio, B. R., Freitas-Dell'Aqua, C. P., Souza, M. I., & Sampaio, B. F. (2022). Use low ozone dosages has positive effects on the cooling and cryopreservation of equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 108, 103800. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103800>
- Pernes, A. J., Miclea, I., Zahan, M., Miclea, V., Orlovski, D., & Codea, A. R. (2016). The influence of ascorbic acid on in vitro maturation of canine oocytes. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 73(2), 230. doi:10.15835/buasvmcn-asb:12320

- Piechowiak, T., Grzelak-Błaszczak, K., Sójka, M., & Balawejder, M. (2020). Changes in phenolic compounds profile and glutathione status in raspberry fruit during storage in ozone-enriched atmosphere. *Postharvest Biology and Technology*, 168, 111277. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111277>
- Pioltine, E. M., Costa, C. B., Barbosa Latorraca, L., Franchi, F. F., Dos Santos, P. H., Mingoti, G. Z., ... Nogueira, M. F. G. (2021). Treatment of in vitro-matured bovine oocytes with tauroursodeoxycholic acid modulates the oxidative stress signaling pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 623852. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.623852>
- Pirino, G., Wescott, M. P., & Donovan, P. J. (2009). Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle*, 8(4), 665–670. <https://doi.org/10.4161/cc.8.4.7846>
- Pors, S. E., Nikiforov, D., Cadenas, J., Ghezelayagh, Z., Wakimoto, Y., Jara, L. A. Z., ... Andersen, C. Y. (2022). Oocyte diameter predicts the maturation rate of human immature oocytes collected ex vivo. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(10), 2209–2214. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02602-0>
- Porter, L. A., & Donoghue, D. J. (2003). Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Progress in Cell Cycle Research*, 5, 335–347.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Qin, Y., Feng, S., Zheng, M., Liu, X., Zhao, J., Zhao, Q., ... Zhong, Y. (2022). Progesterone promotes in vitro maturation of domestic dog oocytes leading to successful live births. *Life*, 12(11), 1778. <https://doi.org/10.3390/life12111778>
- Quetglas, M. D., Adona, P. R., de Bem, T. H., Pires, P. R., & Leal, C. L. (2010). Effect of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibition on expression, localization and activity of maturation promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) in bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6), 1074–1081. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01498.x>
- Rahman, M. B., Vandaele, L., Rijsselaere, T., Zhandi, M., Maes, D., Shamsuddin, M., & Van Soom, A. (2012). Oocyte quality determines bovine embryo development after fertilisation with hydrogen peroxide-stressed spermatozoa. *Reproduction, Fertility, and Development*, 24(4), 608–618. <https://doi.org/10.1071/RD11237>
- Raja, M. A., Maldonado, M., Chen, J., Zhong, Y., & Gu, J. (2021). Development and evaluation of curcumin encapsulated self-assembled nanoparticles as potential remedial treatment for PCOS in a female rat model. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 6231–6247. <https://doi.org/10.2147/IJN.S302161>
- Ramirez, G., Palomino, J., Aspee, K., & De Los Reyes, M. (2020). GDF-9 and BMP-15 mRNA levels in canine cumulus cells related to cumulus expansion and the maturation process. *Animals*, 10(3), 462. <https://doi.org/10.3390/ani10030462>
- Ren, J., Hao, Y., Liu, Z., Li, S., Wang, C., Wang, B., ... Dai, Y. (2021). Effect of exogenous glutathione supplementation on the in vitro developmental competence of ovine oocytes. *Theriogenology*, 173, 144–155. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.025>

- Reynaud, K., de Lesegno, C. V., Chebrou, M., Thoumire, S., & Chastant-Maillard, S. (2009). Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology*, 72(8), 1120–1131. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.006>
- Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Thoumire, S., Chebrou, M., de Lesegno, C. V., & Chastant-Maillard, S. (2005). In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, 130(2), 193–201. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00500>
- Reynaud, K., Fontbonne, A., Saint-Dizier, M., Thoumire, S., Marnier, C., Tahir, M. Z., ... Chastant-Maillard, S. (2012). Folliculogenesis, ovulation and endocrine control of oocytes and embryos in the dog. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (6), 66–69. <https://doi.org/10.1111/rda.12055>
- Rocha, A. A., Bastos, R., Cunha, I. C., Adona, P. R., & Santos, J. A. (2006). Quantity and quality of oocytes recovered from donor bitches of different ages. *Theriogenology*, 66(6-7), 1465–1467. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.007>
- Rodrigues, B. A., dos Santos, L. C., & Rodrigues, J. L. (2004). Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 67(2), 215–223. <https://doi.org/10.1002/mrd.10394>
- Rodrigues, B. A., & Rodrigues, J. L. (2003). Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(1), 58–62. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00404.x>
- Rose, R. D., Gilchrist, R. B., Kelly, J. M., Thompson, J. G., & Sutton-McDowall, M. L. (2013). Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. *Theriogenology*, 79(1), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.020>
- Rota, A., & Cabianca, G. (2004). In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. *Reproduction, Nutrition, Development*, 44(2), 105–109. <https://doi.org/10.1051/rnd:2004018>
- Sá, N. A. R., Vieira, L. A., Ferreira, A. C. A., Cadenas, J., Bruno, J. B., Maside, C., ... Figueiredo, J. R. (2020). Anethole supplementation during oocyte maturation improves in vitro production of bovine embryos. *Reproductive Sciences*, 27(8), 1602–1608. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00190-x>
- Sabancı, A. U., Erkan Alkan, P., Mujde, C., Polat, H. U., Ornek Erguzeloglu, C., Bisgin, A., ... Temel, S. G. (2022). Nanobubble ozone stored in hyaluronic acid decorated liposomes: Antibacterial, anti-SARS-CoV-2 effect and biocompatibility tests. *International Journal of Nanomedicine*, 17, 351–379. <https://doi.org/10.2147/IJN.S328090>
- Sagai, M., & Bocci, V. (2011). Mechanisms of action involved in ozone therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress?. *Medical Gas Research*, 1, 29. <https://doi.org/10.1186/2045-9912-1-29>
- Saint-Dizier, M., Jaffré, N., Reynaud, K., Remy, B., Thoumire, S., & Chastant-Maillard, S. (2008). Expression of follicle-stimulating hormone and luteinising hormone binding sites in the bitch ovary during the follicular phase. *Reproduction, Fertility, and Development*, 20(8), 925–934. <https://doi.org/10.1071/rd08119>

- Saint-Dizier, M., Renard, J. P., & Chastant-Maillard, S. (2001). Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction*, 121(1), 97–105. doi:10.1530/rep.0.1210097
- 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(2), 205–212. <https://doi.org/10.1002/mrd.20062>
- Salavati, M., Ghafari, F., Zhang, T., & Fouladi-Nashta, A. A. (2012). Effects of oxygen concentration on in vitro maturation of canine oocytes in a chemically defined serum-free medium. *Reproduction*, 144(5), 547–556. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0176>
- Salavati, M., Ghafari, F., Zhang, T., & Fouladi-Nashta, A. A. (2013). Influence of caffeine pretreatment on biphasic in vitro maturation of dog oocytes. *Theriogenology*, 80(7), 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.020>
- Sato, A., Sarentonglaga, B., Ogata, K., Yamaguchi, M., Hara, A., Atchalalt, K., ... Nagao, Y. (2018). Effects of insulin-like growth factor-1 on the in vitro maturation of canine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development*, 64(1), 83–88. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-145>
- Sen, A., & Caiazza, F. (2013). Oocyte maturation: a story of arrest and release. *Frontiers in Bioscience*, 5(2), 451–477. <https://doi.org/10.2741/s383>
- Seyfettinoğlu, S., Şahin, G., Akdoğan, A., Tavmergen Göker, E. N., Akçay, Y., Y. Sözmen, E., & Tavmergen, E. (2021). Role of total antioxidant capacity and oxidative stress in fertilization and embryo selection in the IVF cycle. *Cukurova Medical Journal*, 46(4), 1694–1702. <https://doi.org/10.17826/cumj.979955>
- Shaeib, F., Banerjee, J., Maitra, D., Diamond, M. P., & Abu-Soud, H. M. (2013). Impact of hydrogen peroxide-driven Fenton reaction on mouse oocyte quality. *Free Radical Biology & Medicine*, 58, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.007>
- Shi, J. M., Tian, X. Z., Zhou, G. B., Wang, L., Gao, C., Zhu, S. E., ... Liu, G. S. (2009). Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *Journal of Pineal Research*, 47(4), 318–323. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00717.x>
- Shimaoka, T., Nishimura, T., Kano, K., & Naito, K. (2009). Critical effect of pigWee1B on the regulation of meiotic resumption in porcine immature oocytes. *Cell Cycle*, 8(15), 2375–2384. <https://doi.org/10.4161/cc.8.15.9073>
- Shu, Y. M., Zeng, H. T., Ren, Z., Zhuang, G. L., Liang, X. Y., Shen, H. W., ... Wang, N. N. (2008). Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. *Human Reproduction*, 23(3), 504–513. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem344>
- Silva, A. E., Rodriguez, P., Cavalcante, L. F., Rodrigues, B. A., & Rodrigues, J. L. (2009). The influence of oxygen tension on cumulus cell viability of canine COCs matured in high-glucose medium. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 259–262. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01406.x>

- Silva, B. R., & Silva, J. R. V. (2023). Mechanisms of action of non-enzymatic antioxidants to control oxidative stress during in vitro follicle growth, oocyte maturation, and embryo development. *Animal Reproduction Science*, 249, 107186. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107186>
- Somwongin, S., Chantawannakul, P., & Chaiyana, W. (2018). Antioxidant activity and irritation property of venoms from Apis species. *Toxicon*, 145, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.049>
- Song, H. J., Kang, E. J., Kim, M. J., Ock, S. A., Jeon, B. G., Lee, S. L., & Rho, G. J. (2010). Influence of parthenogenetic activation on nuclear maturation of canine oocytes. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 72(7), 887–892. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0563>
- Song, H. J., Kang, E. J., Maeng, G. H., Ock, S. A., Lee, S. L., Yoo, J. G., ... Rho, G. J. (2011). Influence of epidermal growth factor supplementation during in vitro maturation on nuclear status and gene expression of canine oocytes. *Research in Veterinary Science*, 91(3), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.09.003>
- Songsasen, N., Fickes, A., Pukazhenthi, B. S., & Wildt, D. E. (2009). Follicular morphology, oocyte diameter and localisation of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 65–70. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01424.x>
- Songsasen, N., Wesselowski, S., Carpenter, J. W., & Wildt, D. E. (2012). The ability to achieve meiotic maturation in the dog oocyte is linked to glycolysis and glutamine oxidation. *Molecular Reproduction and Development*, 79(3), 186–196. <https://doi.org/10.1002/mrd.22011>
- Songsasen, N., & Wildt, D. E. (2005). Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 72(1), 113–119. <https://doi.org/10.1002/mrd.20330>
- Songsasen, N., & Wildt, D. E. (2007). Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science*, 98(1-2), 2–22. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.004>
- Songsasen, N., Yu, I., & Leibo, S. P. (2002). Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Molecular Reproduction and Development*, 62(3), 407–415. <https://doi.org/10.1002/mrd.10130>
- Soto-Heras, S., & Paramio, M. T. (2020). Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. *Research in Veterinary Science*, 132, 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.013>
- Spadea, L., Tonti, E., Spaterna, A., & Marchegiani, A. (2018). Use of ozone-based eye drops: A series of cases in veterinary and human spontaneous ocular pathologies. *Case Reports in Ophthalmology*, 9(2), 287–298. <https://doi.org/10.1159/000488846>
- Sugiura, K., Naito, K., Endo, T., & Tojo, H. (2006). Study of germinal vesicle requirement for the normal kinetics of maturation/M-phase-promoting factor activity during porcine oocyte maturation. *Biology of Reproduction*, 74(3), 593–600. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.046375>
- Sun, Y. T., & Zhu, A. Z. (2022). Correlation between CDK1 protein and CDK1 mRNA during oocyte maturation in mouse. *The International Journal of Developmental Biology*, 66(4-5-6), 305–309. <https://doi.org/10.1387/ijdb.220002za>

- Suzukamo, C., Hoshina, M., Moriya, H., Hishiyama, N., Nakamura, S., Kawai, F., ... Kashiwazaki, N. (2009). Kinetics of nuclear status and kinase activities during in vitro maturation of canine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development*, 55(2), 116–120. <https://doi.org/10.1262/jrd.20106>
- Takahashi, M. (2012). Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 58(1), 1–9. [doi:10.1262/jrd.11-138n](https://doi.org/10.1262/jrd.11-138n)
- Tatemoto, H., Muto, N., Sunagawa, I., Shinjo, A., & Nakada, T. (2004). Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biology of Reproduction*, 71(4), 1150–1157.
- Tay, J., Hodgman, R., & Richter, J. D. (2000). The control of cyclin B1 mRNA translation during mouse oocyte maturation. *Developmental Biology*, 221(1), 1–9. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9669>
- Teixeira, L. R., Luna, S. P., Taffarel, M. O., Lima, A. F., Sousa, N. R., Joaquim, J. G., & Freitas, P. M. (2013). Comparison of intrarectal ozone, ozone administered in acupoints and meloxicam for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy. *Veterinary Journal*, 197(3), 794–799. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.015>
- Tesoriero, J. V. (1982). A morphologic, cytochemical, and chromatographic analysis of lipid yolk formation in the oocytes of the dog. *Gamete Research*, 6 (3), 267–279.
- Thongkittidilok, C., Doriguzzi, N., Nagashima, J., Brown, M., Chansaenroj, A., & Songsasen, N. (2020). Cilostamide and forskolin maintain gap junction function of incubated dog follicles. *Theriogenology*, 142, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.034>
- Tiwari, M., & Chaube, S. K. (2017). Carbenoxolone reduces cyclic nucleotides level, destabilizes maturation promoting factor and induces meiotic exit from diplotene arrest in rat cumulus oocytes complexes cultured in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.097>
- Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., Pandey, A. N., Singh, A. K., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2016). Involvement of reactive oxygen species in meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes. *Reactive Oxygen Species*, 1(2), 110–116. <http://dx.doi.org/10.20455/ros.2016.817>
- Toker, M. B., Sabancı, A. Ü., Avcı, G., Aktar, A., Denk, B., Bari, Ö., & Özalp, G. R. (2023). Evaluation of cryopreserved ram sperm with nano-ozone solution post-thaw life span by flow cytometric analyses. *Biopreservation and Biobanking*, (basım aşamasında)
- Toori, M. A., Mosavi, E., Nikseresht, M., Barmak, M. J., & Mahmoudi, R. (2014). Influence of Insulin-Like Growth Factor-I on maturation and fertilization rate of immature oocyte and embryo development in NMRI mouse with TCM199 and α -MEM medium. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(12), AC05–AC8. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9129.5242>
- Tripathi, A., Kumar, K. V., & Chaube, S. K. (2010). Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 223(3), 592–600. <https://doi.org/10.1002/jcp.22108>

- Tsikakos, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
- Tsikakos, D. (2023). GC-MS and GC-MS/MS measurement of malondialdehyde (MDA) in clinical studies: Pre-analytical and clinical considerations. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab*, 30, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2023.08.001>
- Uysal, B., Demirbag, S., Poyrazoglu, Y., Cayci, T., Yesildaglar, N., Guven, A., ... Korkmaz, A. (2012). Medical ozone therapy decreases postoperative uterine adhesion formation in rats. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 286(5), 1201–1207. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2435-y>
- Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y., ... Liu, G. (2014). Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 101(2), 577–586. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.10.041>
- Wang, J., Wang, X. Q., Liu, R. P., Li, Y. H., Yao, X. R., Kim, N. H., & Xu, Y. N. (2023). Melatonin supplementation during in vitro maturation of porcine oocytes alleviates oxidative stress and endoplasmic reticulum stress induced by imidacloprid exposure. *Animals*, 13(16), 2596. <https://doi.org/10.3390/ani13162596>
- Wei, Y., Zhang, T., Wang, Y. P., Schatten, H., & Sun, Q. Y. (2015). Polar bodies in assisted reproductive technology: current progress and future perspectives. *Biology of Reproduction*, 92(1), 19. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.125575>
- Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5(1), 51–66. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.197>
- Wu, G. Q., Jia, B. Y., Li, J. J., Fu, X. W., Zhou, G. B., Hou, Y. P., & Zhu, S. E. (2011). L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology*, 76(5), 785–793. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.011>
- Yang, C. R., Wei, Y., Qi, S. T., Chen, L., Zhang, Q. H., Ma, J. Y., ... Sun, Q. Y. (2012). The G protein coupled receptor 3 is involved in cAMP and cGMP signaling and maintenance of meiotic arrest in porcine oocytes. *Plos One*, 7(6), e38807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038807>
- Yu, S., Guo, H., Luo, Y., & Chen, H. (2021). Ozone protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury: Regulating the heat shock protein 70 (HSP70) expression through activating the JAK2/STAT3 Pathway. *Bioengineered*, 12(1), 6606–6616. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1974760>
- Zare, Z., Abouhamzeh, B., Masteri Farahani, R., Salehi, M., & Mohammadi, M. (2017). Supplementation of L-carnitine during in vitro maturation of mouse oocytes affects expression of genes involved in oocyte and embryo competence: An experimental study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 15(12), 779–786.
- Zare, Z., Masteri Farahani, R., Salehi, M., Piryaee, A., Ghaffari Novin, M., Fadaei Fathabadi, F., ... Dehghani-Mohammadabadi, M. (2015). Effect of L-carnitine supplementation on maturation and early embryo development of immature mouse oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(4), 635–643. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0430-5>

- Zeng, H. T., Ren, Z., Guzman, L., Wang, X., Sutton-McDowall, M. L., Ritter, L. J., ... Gilchrist, R. B. (2013). Heparin and cAMP modulators interact during pre-in vitro maturation to affect mouse and human oocyte meiosis and developmental competence. *Human Reproduction*, 28(6), 1536–1545. <https://doi.org/10.1093/humrep/det086>
- Zeng, J., Lei, L., Zeng, Q., Yao, Y., Wu, Y., Li, Q., ... Lu, J. (2020). Ozone therapy attenuates NF- κ B-mediated local inflammatory response and activation of Th17 cells in treatment for psoriasis. *International Journal of Biological Sciences*, 16(11), 1833–1845. <https://doi.org/10.7150/ijbs.41940>
- Zhang, H., Li, K., Zhang, X., Dong, C., Ji, H., Ke, R., ... Chen, C. (2020). Effects of ozone treatment on the antioxidant capacity of postharvest strawberry. *RSC Advances*, 10(63), 38142–38157. <https://doi.org/10.1039/d0ra06448c>
- Zhang, M., & Xia, G. (2012). Hormonal control of mammalian oocyte meiosis at diplotene stage. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(8), 1279–1288. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0867-3>
- Zhang, Y., Guo, J., Nie, X. W., Li, Z. Y., Wang, Y. M., Liang, S., & Li, S. (2019). Rosmarinic acid treatment during porcine oocyte maturation attenuates oxidative stress and improves subsequent embryo development in vitro. *PeerJ*, 7, e6930. <https://doi.org/10.7717/peerj.6930>
- Zhang, Y., Wang, H. H., Wan, X., Xu, Y., Pan, M. H., & Sun, S. C. (2018). Inhibition of protein kinase D disrupts spindle formation and actin assembly during porcine oocyte maturation. *Aging*, 10(12), 3736–3744. <https://doi.org/10.18632/aging.101667>
- Zhao, M. X., Wen, J. L., Wang, L., Wang, X. P., & Chen, T. S. (2019). Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates the resistance of cells to reactive oxygen species. *Cell Stress & Chaperones*, 24(3), 609–619. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-00993-1>
- Zhou, C., Zhang, X., Chen, Y., Liu, X., Sun, Y., & Xiong, B. (2019). Glutathione alleviates the cadmium exposure-caused porcine oocyte meiotic defects via eliminating the excessive ROS. *Environmental Pollution*, 255(Pt 1), 113194. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113194>

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

>:	Büyük
°:	Derece
<:	Küçük
µg:	Mikrogram
µl:	Mikrolitre
µm:	Mikrometre
µM:	Mikromolar
µmol:	Mikromol
4-HNE:	4-hidroksinonenal
a:	Arter
AC:	Adenilil siklaz
ACT- β:	Aktin beta
ATP:	Adenozin trifosfat
BMP-15:	Kemik morfogenetik protein-15
BSA:	Sığır serum albumin
C:	Santigrat
Ca ²⁺ :	Kalsiyum iyonu
CaCl ₂ 2H ₂ O:	Kalsiyum klorid dihidrat
cAMP:	Siklik adenozin monofosfat
CAT:	Katalaz
Cdc25b:	Siklin bağımlı kinaz 25b
CDK1:	Siklin bağımlı kinaz 1
CDK2:	Siklin bağımlı kinaz 2
cDNA:	Komplementer DNA
CMRL 1066:	<i>Connaught medical research laboratories medium 1066</i>
CO ₂ :	Karbondioksit
COCs:	Kumulus-oosit kompleksi
Cu:	Bakır
CuCl ₂ :	Bakır (II) klorür
DEG:	Dejenere
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DTNB:	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit)
eCG:	Gebe kısrak serum gonadotropini
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF:	Epidermal büyüme hormonu
EtOH:	Etanol
FCS:	Fetal buzağı serumu
Fe ²⁺ :	Ferrik iyonu
Fe ³⁺ :	Ferröz iyonu
FRAP:	Ferrik indirgeyici antioksidan güç
FSH:	Folikül stimüle edici hormon
G:	Gauge
g:	Gram
GAPDH:	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
GDF-9:	Büyüme farklılaşma faktörü-9

GnRH:	Gonadotropin salgılayıcı hormon
GPx:	Glutasyon peroksidaz
GR:	Glutasyon redüktaz
Gs:	G protein-alfa stimülatörü
GSH:	Glutasyon (redükte)
GSSG:	Oksitlenmiş GSH
GV:	Germinal vezikül
GVBD:	Germinal vezikül <i>break down</i>
H₂O:	Su molekülü, Dihidrojen monoksit
H₂O₂:	Hidrojen peroksit
hCG:	İnsan koryonik gonadotropin
HCl:	Hidrojen klorür
hMG:	İnsan menapozal gonadotropini
IGF-1:	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IGF-1R:	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü
IM:	Intramusküler, kas içi
IU:	Internasyonal ünite
IVC:	<i>In vitro</i> embriyo kültürü
IVF:	<i>In vitro</i> fertilizasyon
IVM:	<i>In vitro</i> maturasyon
KCl:	Potasyum klorür
kg:	Kilogram
l:	Litre
LH:	Luteinleştirici hormon
Lig:	Ligamentum
m:	Musculus
MDA:	Malondialdehit
mg:	Miligram
MgCl₂ 6H₂O:	Magnezyum klorid hegzahidrat
MI:	Mayoz I
MII:	Metafaz II
ml:	Mililitre
mm:	Milimetre
mM:	Milimolar
mmol:	Milimol
Mn:	Manganez
Mos:	C-mos proto-onkogen ürünü
MPF:	Maturasyon promoting faktör
mRNA:	Mesajcı Ribonükleik asit
Myt1:	Myelin transkripsiyon faktör 1
Na₂HPO₄:	Disodyum fosfat
NaCl:	Sodyum klorür
NaH₂PO₄:	Sodyum fosfat
NaHCO₃:	Sodyum bikarbonat
NBT:	Nitro-blue tetrazolium
ng:	Nanogram
nm:	Nanometre

nmol:	Nanomol
Nrf2:	Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör-2
O₂:	Oksijen molekülü
O₂⁻:	Süperoksit radikali
O₃:	Ozon
OHE:	Ovariohisterektomi
OS:	Oksidatif stres
Östradiol-17β:	Östradiol 17 beta
PB:	Polar (body) cisimcik
PBS:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDE:	Fosfodiesteraz enzimi
PKA:	Protein kinaz A
pmol:	Pikomol
PRDX:	Peroksiredoksin
Ras/MAPK:	Ras ilişkili mitojenle aktive olan protein kinaz
RNA:	Ribonükleik asit
ROS:	Reaktif oksijen türleri
rpm:	Dakikadaki devir sayısı
SC:	Subkutan, deri altı
SD:	Standart sapma
SIRT1:	Sirtuin 1
SOD:	Süperoksit dismutaz
SOF:	Sentetik oviduktal sıvı
TBA:	Tiyobarbitürik asit
TPTZ:	2,3,5- Tripheniltetrazolium Klorid
v:	Vena
Wee1:	G2 kontrol noktası kinazı 1
YÜT:	Yardımcı üreme teknikleri
Zn:	Çinko
ZP:	Zona pellusida

8. EKLER

Etik Kurul ve İzin Belgeleri

EK 1

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

Sayı: B.30.2.ULU.0.8Z.00.00/
Konu: Araştırma Projeniz

18.01.2022

Sayın Prof. Dr. R. Gözde ÖZALP

Yürüttüğünü olduğunuz “*Köpeklerde Nano-ozon Solüsyonunun In Vitro Nükleer Oosit Maturasyonu Üzerine Etkisi*” isimli çalışmanız Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 18.01.2022 tarihli toplantısında görüşülmüş olup kurul kararı ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY
HADYEK Başkanı

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	Köpeklerde Nano-ozon Soltisyonunun In Vitro Nükleer Oosit Matürasyonu Üzerine Etkisi
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. R. Gözde ÖZALP BUÜ Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Dokt. Öğr. Özge BARI Dr. Ahmet Ümit SABANCI
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Özge BARI'nın Doktora Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01.03.2022 – 01.03.2024
	KULLANILACAK HAYVAN TURU VE SAYISI	15 Adet Dişi Köpek

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	07.01.2022

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2022 - 01 / 08	Tarih : 18.01.2022
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılar değişikliği olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.	

ÜYELER						
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY Başkan	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H			
Dr.Öğr. Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H			
Dr.Öğr. Üyesi Diğdem YÖYEN ERMIŞ Üye	Tıp- İmmunoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. Veli Yılgör ÇIRAK Üye	Veteriner-Parazitoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. Özgür ÖZYİĞİT Üye	Veteriner-Patoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ☒ H			
Doç. Dr. Arda SÖZCÜ Üye	Ziraat- Zootečni	Ziraat Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ☒ H			
Asiye İşıl SEZER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Diş Hekimi	☐ E ☒ H			
Filiz TORUN Üye	Sivil Üye	Emekli	☐ E ☒ H			
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	BUÜ- DEHYUAM	☐ E ☒ H			

9. TEŞEKKÜR

Eğitim ve öğretim hayatım boyunca ve bu mesleği tercih etmem esnasında hayatıma dokunan bütün herkese teşekkür ederim. Doktora eğitimim ve çalışmalarım esnasında çalışmaktan mutluluk duyduğum, değerli tecrübeleri, bilgileri ve farklı bakış açısıyla gerek sosyal gerekse akademik hayatta bana yol gösteren, her konuda desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. R. Gözde ÖZALP'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora çalışmam esnasında bilgi ve deneyimleriyle çalışmama katkı sağlayan, çalışma esnasında rahat ortamı sağlamak için elinden geleni yapan Prof. Dr. Burcu ÜSTÜNER'e teşekkür ederim. Tez çalışmamın ana materyallerini sağlayan, aksamadan ilerlemesine yardımcı olan, ellerinden ne geliyorsa yapmaya çalışan Dr. Ahmet Ümit SABANCI, Dr. Ayşe YAZICI ve Veteriner Hekim Yasemin YARANSÜ'ye, Yıldırım Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü'ne ve çalışanlarına, ayrıca bu süreçte fedakârca destek veren herkese güler yüzleri için teşekkür ediyorum. Örneklerimin analizinde yardımcı olan Prof. Dr. Gülcan AVCI, Doktor Öğretim Üyesi Barış DENK ve Berkay BOZKURT'a teşekkür ederim. Akademik ve klinik alanında gelişmeme katkı sağlayan ana bilim dalı hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Hayatımın her alanında destek olan, hiçbir zaman ellerini omzumdan eksik etmeyen ve her koşulda yanımda olan annem ve babama, aynı mesleği paylaşmaktan onur ve gurur duyduğum, başarılarla birlikte koşacağımız kardeşime çok teşekkür ederim. Bu süreç esnasında desteğini esirgemeyen, bu yolda ilerlemem konusunda cesaretlendiren gizli ve süper kahramanıma teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

■■■■ yılında ■■■■ doğmuştur. Lise öğrenimini ■■■■ yılında ■■■■
■■■■ tamamlamıştır. 2011 yılında, Bursa Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi'nde eğitimine başlamış, 2017 yılında mezun olmuştur. 2018 yılında
mezun olduğu Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Ana
Bilim Dalı'nda doktora eğitimine başlamıştır. YÖK 100/2000 Biyomalzeme ve Doku
Mühendisliği öncelikli alanında bursiyer olarak görev almıştır.