AHMET AKTAR

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANA BİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DÖLERME VE SUNİ
TOHUMLAMA ANA BİLİM DALI

KOYUNLARDA *IN VİTRO* OOSİT MATURASYONU SIRASINDA UYGULANAN MELATONİN HORMONUNUN SICAKLIK STRESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN TÜM GENOM EKSPRESYONU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

AHMET AKTAR

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA
ANA BİLİM DALI

KOYUNLARDA *IN VİTRO* OOSİT MATURASYONU SIRASINDA UYGULANAN MELATONİN HORMONUNUN SICAKLIK STRESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN TÜM GENOM EKSPRESYONU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Ahmet AKTAR

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN

Prof. Dr. Selim ALÇAY

BURSA-2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "**Koyunlarda *In Vitro* Oosit Maturasyonu Sırasında Uygulanan Melatonin Hormonunun Sıcaklık Stresi Üzerine Etkisinin Tüm Genom Ekspresyonu Düzeyinde Araştırılması**" 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.

Ahmet AKTAR
28.06.2024

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

28/06/2024

Adı Soyadı: Ahmet AKTAR

Anabilim Dalı: Veteriner / Dölerme ve Suni Tohumlama

Tez Konusu: Koyunlarda *In Vitro* Oosit Maturasyonu Sırasında Uygulanan Melatonin Hormonunun Sıcaklık Stresi Üzerine Etkisinin Tüm Genom Ekspresyon Düzeyinde Araştırılması

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

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Selim ALÇAY

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN……II
KABUL ONAY SAYFASI ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU ..... **III**
İÇİNDEKİLER ..... **IV**
TÜRKÇE ÖZET ..... **VI**
İNGİLİZCE ÖZET ..... **VII**
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ……VIII
1.GİRİŞ **1**
2.GENEL BİLGİLER **4**
2.1.Koyunlarda Foliküler Gelişim **4**
2.2.Koyunlarda In Vitro Embriyo Üretimi **5**
2.2.1.Oosit Elde Etme Yöntemleri **6**
2.2.1.1.Slicing (Dilimleme) Yöntemi **6**
2.2.1.2.Punksiyon Yöntemi **7**
2.2.1.3.Ovum Pick-Up Yöntemi **8**
2.2.1.4.Laparoskopik Yöntem **8**
2.2.2.Koyun Oositlerinin Morfolojik Özellikleri **8**
2.2.3. *In Vitro* Maturasyon (IVM) **10**
2.2.3.1.In Vitro Maturasyonu Etkileyen Faktörler **11**
2.2.3.1.1.Sıcaklık Faktörü **11**
2.2.3.1.2.Oksidatif Stres **12**
2.2.3.1.3.Antioksidanlar **14**
2.2.3.1.3.1.Melatonin **15**
2.2.3.1.3.1.1.Melatoninin Foliküler Gelişim ve Ovulasyon Üzerine Etkisi **16**
2.2.3.1.3.1.2.Melatoninin Oosit ve Embriyo Kalitesi Üzerine Etkisi **16**
2.2.3.1.3.1.3.Melatoninin In Vitro Maturasyonda Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi **17**
2.3. Çalışmanın Amacı ve Hedefleri **19**
3.GEREÇ VE YÖNTEM **20**
3.1.Çalışma Materyali **20**
3.2.Oositlerin Toplanması **20**
3.3.*In Vitro* Maturasyon **21**
3.4.Gen Ekspresyonu İçin Oosit Seçimi **21**
3.4.1.RNA İzolasyonu **21**
3.4.2.RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi **23**
3.4.3.cDNA (Komplamenter) Sentezi **23**
3.4.4.Primer Dizaynı **24**
3.4.5.Real-Time PCR (qPCR) **24**
3.4.6.Real-Time PCR Analizi **24**
3.5.Fertilizasyon İçin Sperma Hazırlanması **25**
3.6.*In Vitro* Fertilizasyon **26**
3.7.*In Vitro* Kültür **26**
3.8.İstatiksel Analiz **27**
3.9.Tez Çalışması Süresince Kullanılan Stok Solüsyonları **27**
3.10.Çalışma Süresince Kullanılan Medyumlar **29**

4.BULGULAR **33**
4.1.In Vitro Fertilizasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi **34**
4.2.Gen Ekspresyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi **36**
4.2.1.Anti-Apoptotik Gen Ekspresyon Sonuçları **36**
4.2.2.Kumulus Hücrelerinde Embriyo Gelişimi İle İlgili Gen Ekspresyonları **37**
4.2.3.Mitokondri Fonksiyonları İle İlgili Genlerin Ekspresyonu **39**
5.TARTIŞMA VE SONUÇ **41**
6.KAYNAKLAR **50**
7.SİMGELER VE KISALTMALAR **63**
8.EKLER **65**
9.TEŞEKKÜR **67**
10.ÖZGEÇMİŞ **68**

TÜRKÇE ÖZET

Çalışmada koyunlarda in vitro maturasyon sırasında uygulanan melatonin hormonunun sıcaklık stresi üzerine etkisinin embriyonik gelişim ve tüm genom ekspresyon düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır.

In vitro embriyo (IVF) üretim aşamlarından en kritik noktalardan birisi de *in vitro* maturasyon aşamasında oositlerin mature olma oranlarıdır. Bu aşamada meydana gelen streslere bağlı olarak reaktif oksijenlerin artması hücrelerde hasarlara sebep olmaktadır. Melatonin hormonunun sıcaklık stresine karşı koyun oositlerinde meydana gelen embriyonik gelişim ve morfolojisi üzerine etkisi, maturasyon ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. Maturasyon medyumu içerisine farklı sıcaklıklarda 10^{-7} M melatonin hormunu ilave edildi. Mezbahada kesilen koyunların ovaryumlarından oositler elde edildi. Uygun şartlar altında laboratuvar ortamında hazırlanan solüsyonlar ile inkübasyon işlemleri gerçekleştirildi. Embriyonik gelişim aşamaları bölünme, marula, blastosit aşamaları olarak değerlendirildi. Bölünme oranları kıyaslandığında en yüksek oran G39M, en düşük değer G41 elde edildi ve istatiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($P<0,05$). Morula oranlarında ise en yüksek değer G39M gözlenirken en düşük değer G41 elde edildi ($P<0,05$). Elde edilen blastosist oranları en iyi G39M de elde edildi. Buna göre melatonin sıcaklık stresinde bölünme ve marula aşamasında etki gösterirken blastosit aşamasında anlamlı ölçüde azalma oldu. ($P<0,05$)

Melatoninin maturasyon aşamasında oositler üzerine çeşitli gen ekspresyonlarında tüm deney gruplarında olan anti apoptatik gen düzeyleri (BAX, Bcl2), kumulus ve sitoplazmik olgunlaşma (PTX3, HAS2, EGFR, FSHR, LHR), mitokondiryal fonksiyonlar etkisi incelendiğinde, apoptoz faktörleri, olgunlaşma ve mitokondriyal fonksiyonlar (SIRT1, AKT2, Polg2) üzerinde artma ve azalma gözlemlendi. Sonuçların istatiksel analiz sonucunda gen ekspresyonları anlamlı olarak çıktı ($P>0,05$). Bu çalışmada melatoninin *in vitro* maturasyon medyumuna ilave edilmesinin önemi ortaya çıkmış ve kullanılan konsantrasyonların embriyonik gelişimde etkili rol oynadığı kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: IVF, Melatonin, Sıcaklık stresi, Gen Ekspresyonu, Oksidatif Stres, Antioksidan

İNGİLİZCE ÖZET

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MELATONIN HORMONE APPLIED DURING *IN VITRO* OOCYTE MATURATION ON HEAT STRESS IN SHEEP AT THE WHOLE GENOME EXPRESSION LEVEL

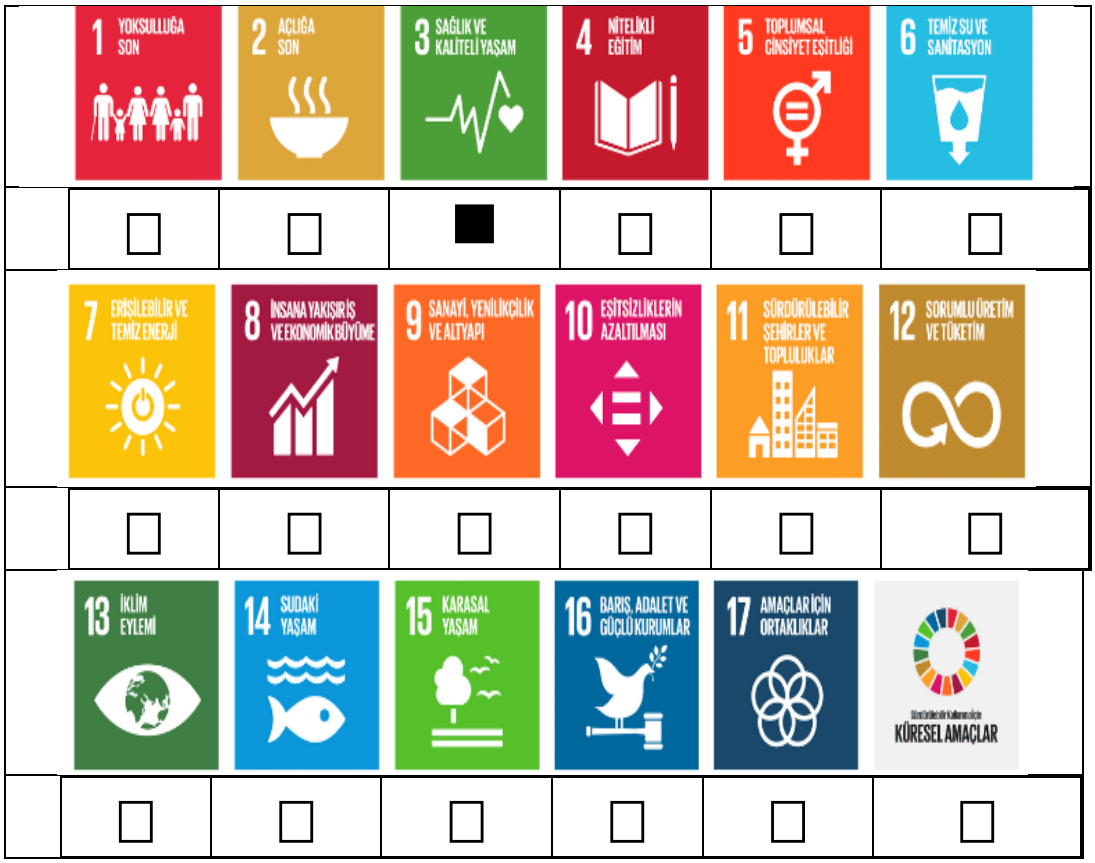
The study aim to investigate the effects of melatonin hormone on embryonic development and whole genome expression levels under heat stress during in vitro maturation in sheep.

One of the most critical points in the stages of *in vitro* embryo (IVF) production is the maturation rate of oocytes during the in vitro maturation phase. Due to the stresses occurring at this stage, the increase in reactive oxygen species causes damage to the cells. The effects of melatonin hormone on embryonic development and morphology in sheep oocytes under heat stress were evaluated, along with the expression levels of maturation-related genes. A concentration of 10^{-7} M melatonin hormone was added to the maturation medium at different temperatures. Oocytes were obtained from the ovaries of sheep slaughtered in a slaughterhouse. Incubation processes were carried out with solutions prepared in the laboratory under suitable conditions. The stages of embryonic development were evaluated as cleavage, morula, and blastocyst stages. When comparing cleavage rates, the highest rate was observed in G39M, while the lowest value was obtained in G41, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). For morula rates, the highest value was observed in G39M, while the lowest value was obtained in G41 ($P<0.05$). The best blastocyst rates were obtained in G39M. Accordingly, melatonin showed an effect at the cleavage and morula stages under heat stress, but there was a significant decrease at the blastocyst stage ($P<0.05$).

In the maturation phase, various gene expressions on oocytes, including anti-apoptotic gene levels (BAX, Bcl2), cumulus and cytoplasmic maturation (PTX3, HAS2, EGFR, FSHR, LHR), and mitochondrial functions (SIRT1, AKT2, Polg2) were examined. Increases and decreases were observed in apoptosis factors, maturation, and mitochondrial functions. The results of the statistical analysis showed that gene expressions were significant between groups ($P<0.05$). This study revealed the importance of adding melatonin to the in vitro maturation medium and concluded that the concentrations used played an effective role in embryonic development.

Keywords: IVF, Melatonin, Heat Stress, Gene Expression, Oxidative Stress, Antioxidant

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ



Doktora tezi olarak sunduğum "Koyunlarda *In Vitro* Oosit Maturasyonu Sırasında Uygulanan Melatonin Hormonunun Sıcaklık Stresi Üzerine Etkisinin Tüm Genom Ekspresyon Düzeyinde Araştırılması " başlıklı tez **3.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

Türkiye, koyun popülasyonu bakımından dünyanın önde gelen ülkelerinden biridir. 2023 yılı verilerine göre, Türkiye'de 42 milyonun üzerinde koyun bulunmaktadır. Bu koyunların %91,6'sını yerli ırklar, %8,4'ünü ise kültür ırkları oluşturmaktadır. Koyunculuk, Türkiye'de özellikle kırsal bölgelerde önemli bir geçim kaynağıdır ve toplam kırmızı et üretiminin %9'u, toplam süt üretiminin ise %5,93'ü koyunculuk sektöründen elde edilmektedir. Ayrıca, koyunlardan yılda 79.754 ton yapağı üretilmektedir. Türkiye'nin mevcut fiziki ve ekonomik durumu, bakım ve besleme koşulları ile sosyo-kültürel değerler göz önüne alındığında, koyunculuk sektörü önemli bir yere sahiptir ancak verimlilik açısından istenilen seviyede değildir. Yerli koyun ırklarının verim düşüklüğü, sektörün gelişimini kısıtlayan temel faktörlerdendir (TUİK 2003).

Günümüzde biyoteknolojik yöntemler, tarım ve hayvancılıkta verimliliği ve sürdürülebilirliği artırmak için önemli araçlar haline gelmiştir. Özellikle genetik mühendislik, *in vitro* embriyo üretimi, suni tohumlama, embriyo transferi ve klonlama gibi teknikler, hayvan ıslah çalışmalarında geniş bir uygulama alanı bulmaktadır. Bu yöntemler sayesinde, genetik çeşitlilik artırılabilir, üstün niteliklere sahip ırklar geliştirilerek hastalıklara dirençli, hızlı büyüyen ve yüksek verim sağlayan hayvanlar elde edilebilir (Bergstein-Galan, Busato, & Abreu, 2018). Örneğin, genetik seçilim ve CRISPR-Cas9 gibi genom düzenleme teknolojileri, istenen genetic özelliklerin doğrudan ve hızlı bir şekilde aktarılmasını mümkün kılarak, geleneksel ıslah yöntemlerine göre daha etkin sonuçlar sunar. Bu teknolojilerin kullanımı, sadece verimliliği artırmakla kalmayıp, aynı zamanda hayvan refahını iyileştirir ve sürdürülebilir tarım uygulamalarına katkı sağlar. Böylece, biyoteknolojik yöntemler, modern hayvancılıkta genetik ilerlemenin anahtarı olarak kabul edilmektedir (Ferre ve ark., 2020).

Reprodüktif biyoteknolojide embriyolarla ilgili çalışmalar, 19. yüzyılın sonlarına kadar uzanır. Embriyo transfer teknolojisinin temelleri, Walter Hope adlı araştırıcının 1891 yılında tavşanlarda ilk embriyo transferini gerçekleştirerek canlı yavru elde etmesiyle atılmıştır. Reprodüktif biyoteknoloji alanında elde edilen gelişmeler

sayesinde östrus senkronizasyonu ve süperovulasyon kavramlarının ortaya çıkmasının ardından, 1950'li yıllarda embriyo transfer uygulamasının cerrahi olarak koyun, domuz ve sığırlarda da yapılabileceği gösterilmiştir (Betteridge,2003).

Koyunlarda genetik ilerleme, *in vitro* embriyo üretimi ve embriyo transferi kullanılarak önemli ölçüde hızlandırılabilir. In vitro embriyo üretimi, yüksek genetik potansiyele sahip koyunların oositlerinin laboratuvar ortamında olgunlaştırılması ve döllenmesi ile gerçekleştirilir. Ardından, elde edilen embriyolar taşıyıcılara transfer edilir (Orland, 2017). Bu yöntem, üstün genetik özelliklere sahip koyunların hızla çoğaltılmasını sağlar. *In vitro* embriyo üretimi, genetik çeşitliliği artırarak hastalıklara dirençli, yüksek verimli ve kaliteli et ve süt üreten koyun ırklarının geliştirilmesine olanak tanır. Bu biyoteknolojik uygulamalar, koyun yetiştiriciliğinde verimlilik ve sürdürülebilirliği artırmada kritik bir rol oynar (Betteridge, 2003).

In vitro embriyo üretimi; oosit maturasyonu, fertilizasyon ve embriyo kültürü aşamalarını kapsayan temel reprodüktif süreçlerin, *in vivo* şartların taklit edildiği laboratuvar ortamında gerçekleştirilmesi olarak tanımlanır. Son yıllarda büyük bir hızla gelişim gösteren reprodüktif biyoteknolojiler, bu ivmeyi *in vitro* embriyo üretimindeki başarılara borçludur (Saacke, Dalton, Nadir, Nebel, & Bame, 2000). Embriyonik gelişim aşamalarının takibi, canlılığın başlangıcı ve epigenetik faktörlerin aydınlatılmasına katkı sağlamıştır. Reprodüktif süreçlerin daha iyi anlaşılması, araştırmacıların bu süreçlere müdahale etmesine de fırsat vermiştir. Bu sayede, kimi infertilite sorunlarının giderilmesi, ikiz gebelikler için embriyo eldesi, cinsiyeti belirlenmiş embriyo eldesi, preimplantasyon genetik tanı ve tedavi, kök hücre araştırmaları, klonlama ve transgenik hayvan üretimi gibi uygulamalar mümkün olmuştur (Abeyta, & Behr, 2014).

In vitro maturasyon (IVM) ortamında sıcaklık stresi, oositlerin olgunlaşma süreci üzerinde ciddi olumsuz etkiler yaratabilir. Optimal sıcaklık, oositlerin doğru şekilde olgunlaşması için kritik bir faktördür. Sıcaklık stresine maruz kalan oositler, hücresel metabolizmada dengesizlikler yaşayabilir ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimiyle karşı karşıya kalabilir (Wilson ve ark., 1998). Bu durum, hücresel yapılar ve DNA üzerinde oksidatif hasara yol açarak oosit kalitesini ve dolayısıyla embriyo gelişim potansiyelini azaltabilir. Ayrıca, sıcaklık stresinin hücre içi sinyal yollarını ve

protein katlanmasını olumsuz etkileyerek, olgunlaşma sürecinde görev alan enzimlerin fonksiyonunu bozabileceği bilinmektedir (Agarwal, Gupta, & Sharma 2005).

In vitro maturasyon ortamında sıcaklığın sıkı bir şekilde kontrol edilmesi, oositlerin sağlıklı bir şekilde olgunlaşması ve yüksek kaliteli embriyoların elde edilmesi için hayati öneme sahiptir. Bu nedenle, laboratuvar koşullarında sıcaklık yönetimine özel önem verilmesi, başarılı in vitro fertilizasyon (IVF) ve embriyo transferi (ET) sonuçları için gereklidir (Takahashi, 2011).

In vitro maturasyon sırasında sıcaklık stresinin olumsuz etkileri, antioksidanlar kullanılarak kontrol altına alınabilir. Sıcaklık stresi, oositlerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine neden olarak hücresel hasara yol açabilir ve bu da olgunlaşma ve embriyo gelişim potansiyelini düşürebilir. Antioksidanlar, ROS'un neden olduğu oksidatif stresi azaltarak hücresel yapıları korur ve oosit kalitesini iyileştirir (Ozdaş ve ark., 2013). Bu bileşikler, hücre içinde denge sağlayarak proteinlerin doğru katlanmasını ve enzimlerin fonksiyonlarını destekler. Çeşitli çalışmalarda, kültür ortamına eklenen antioksidanların, sıcaklık stresinin olumsuz etkilerini hafiflettiği ve embriyo gelişim oranlarını artırdığı gösterilmiştir. Böylece, IVM süreçlerinde antioksidan kullanımı, sıcaklık dalgalanmalarının yol açtığı olumsuz etkileri minimize ederek, daha sağlıklı ve kaliteli embriyoların elde edilmesini sağlar (Sagirkaya ve ark., 2007).

Bu zamana kadar birçok çalışma yapılmış ve çeşitli antioksidan maddeler denenmiştir. Sunulan bu tez çalışmasında sıcaklık üzerine denenmiş ve olumlu etkilerin alındığı görülmüş olan melatonin hormununun en etkili olan dozu ele alınarak, koyun oositlerinin sıcaklık stresi altında mature olma durumları hem embriyonel gelişme düzeyleri hem de gen ekspresyon düzeyinde etkileri karşılaştırılmıştır. Çalışmamız sonucunda kazanacağımız bilgi ve birikimler ile koyunlarda in vitro embriyo üretimi uygulamalarının daha ileriye taşınarak, genetik ilerleme ve ıslahın hızlandırılması, yüksek damızlık değerine sahip hayvanların yetiştirilmesi, koyun oositlerinin daha başarılı bir şekilde IVM olması için büyük yararlar sağlanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Koyunlar, *Bovidae* ailesine ait ve *Ovis* cinsini oluşturan memelilerdir. Koyunların reprodüktif fizyolojisi, mevsimsel poliöstrik yapılarıyla karakterizedir. Bu, koyunların üreme döngüsünün yılın belirli dönemlerinde, genellikle sonbahar ve kış aylarında aktif olduğu anlamına gelir. Üreme mevsiminin başlangıcında, günlerin kısalmasıyla birlikte melatonin hormonu salınımı artar. Melatonin, hipotalamustan GnRH (gonadotropin salgılatıcı hormon) salınımını uyarır, bu da adenohipofizden FSH (folikül uyarıcı hormon) ve LH (luteinleştirici hormon) salınımını tetikler. FSH ve LH, yumurtalık foliküllerinin gelişimini ve ovulasyonunu sağlar, böylece üreme döngüsü başlar ve devam eder (Hafez, & Hafez, 2021).

2.1. Koyunlarda Foliküler Gelişim

Koyunlarda follikülogenezis, ovaryum foliküllerinin büyüme ve gelişme sürecini ifade eder ve bu süreç, doğum öncesi dönemde primordial foliküllerin oluşumu ile başlar. Primordial foliküller, ince bir granüloza hücre tabakası ile çevrelenmiş oositlerden oluşur. Doğumdan sonra, bu foliküller dinlenme halinde kalır ve ergenlik dönemine kadar aktifleşmez. Ergenlikten itibaren, her östrus döngüsünde bir grup primordial folikül büyümeye başlar ve primer, sekonder ve antral folikül evrelerinden geçer (Avdi, Chemineau, & Driancourt 1997).

Folikülogenezisin ilk aşamasında, primordial foliküller primer foliküllere dönüşür. Bu aşamada, granüloza hücreleri çoğalır ve oositin etrafında çok katmanlı bir yapı oluşturur. Ardından, sekonder folikül evresinde, granüloza hücreleri arasında birikmeye başlayan antrum sıvısı ile birlikte folikül büyümeye devam eder. Bu dönemde, teka hücreleri de farklılaşarak folikülün dış tabakasını oluşturur ve hormon üretiminde görev alır (Houghton ve ark., 1995; Rubianes, & Menchaca, 2003).

Antral folikül evresinde, foliküller FSH ve LH gibi gonadotropinlere duyarlı hale gelir. FSH, granüloza hücrelerinin çoğalmasını ve antrumun genişlemesini teşvik ederken, LH teka hücrelerinden androjenlerin salınımını uyarır. Bu androjenler, granüloza hücrelerinde östrojenlere dönüştürülür. Östrojenler, folikülün büyümesini destekler ve üreme döngüsünün diğer aşamalarını hazırlar (Aerts, & Bols, 2010; Vinoles, Forsberg, Banchero, & Rubianes, 2001).

Ovulasyon sırasında, dominant folikül çatlar ve olgun oosit serbest kalır. Bu süreç, LH dalgası tarafından tetiklenir ve oositin yumurtalıktan salınmasını sağlar. Serbest kalan oosit, tüplere geçer ve döllenmeye hazır hale gelir (Bartlewski, Beard, & Rawlings, 1999). Ovulasyondan sonra, çatlayan folikül korpus luteum olarak bilinen yapıya dönüşür ve progesteron hormonu salgılar. Progesteron, döllenme ve erken embriyo gelişimi için uygun bir ortam sağlar (Bartlewski, Beard, Cook, & Rawlings, 1998).

Koyunlarda folikülogenezis süreci, hormonların hassas bir şekilde dengelendiği ve koordine edildiği karmaşık bir biyolojik olaydır. Bu süreç, genetik, çevresel ve beslenme faktörleri tarafından da etkilenir (Driancourt, 2001). Örneğin, beslenme durumu ve ek besin takviyeleri, foliküllerin gelişimini ve ovulasyon oranını artırabilir. Koyunlarda bu süreç, üreme verimliliğinin ve dolayısıyla sürü üretkenliğinin temelini oluşturur (McNatty ve ark., 1995; Scaramuzzi ve ark., 2006).

2.2. Koyunlarda *In Vitro* Embriyo Üretimi

Koyunlarda *in vitro* embriyo üretimi (IVEP), reprodüktif biyoteknolojide önemli bir ilerleme olarak kabul edilir ve genetik üstünlüklerin hızla çoğaltılmasına imkan tanır. Bu süreç, oositlerin *in vitro* ortamda maturasyon, döllenmesi (IVF) ve embriyo kültürü aşamalarını kapsar. İlk adımda, donör veya mezbahada kesilen koyunlardan toplanan oositler laboratuvar ortamında uygun koşullar altında olgunlaştırılır. Olgunlaşan oositler, daha sonra sperm ile döllenir ve oluşan zigotlar, gelişimlerini sürdürmek üzere kültür ortamına yerleştirilir. Embriyolar, belirli bir gelişim aşamasına ulaştığında, taşıyıcı annelere transfer edilir veya kriyoprezervasyon (dondurma) için saklanır. IVEP, genetik materyalin korunması, değerli genotiplerin çoğaltılması ve üreme verimliliğinin artırılması açısından büyük avantajlar sunar (Cognié, Baril, Poulin, & Mermillod, 2003; Kruip, & den Daas, 1997; Paramio, & Izquierdo, 2014).

Erken embriyonik gelişim ile gebeliğin oluşumu ve devamlılığı oosit kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Foliküler gelişim, yani oositin büyüme aşaması, oositin kalitesi ve gelişim potansiyelini etkiler. İn vitro fertilizasyonda kullanılacak primer oositler genellikle mezbahada kesilen hayvanların yumurtalıklarından elde

edilir (Wani, 2002).

Ancak bazı durumlarda, özellikle yüksek verimli ve damızlık hayvanlardan, ovum pick-up yöntemi ile süper follikülasyon veya normal siklus aktivitesine müdahale etmeksizin mevcut folliküllerin aspirasyonu ile de oosit toplanmaktadır. Genellikle memeli yumurtalıklarından oldukça fazla sayıda oosit toplanmasına rağmen, bu oositlerin sadece küçük bir kısmı IVM, IVF ve *in vitro* kültür (IVC) aşamalarını başarıyla geçerek embriyo oluşturabilir. Bu durumun başlıca sebepleri, oosit kalitesinin yeterince yüksek olmaması ve embriyo kültür koşullarının embriyo gelişimi için optimal seviyede olmamasıdır (Kane, 2003).

2.2.1. Oosit elde etme yöntemleri

Oosit elde etme yöntemleri, in vitro embriyo üretimi süreçlerinde kritik bir aşamayı temsil eder ve başarı oranını doğrudan etkiler. Oosit elde etme yöntemi, in vitro embriyo üretiminde kritik bir adımdır (Katska-Ksiazkiewicz, Ooiela, & Rynska, 2007). Bu nedenle, oosit toplama yönteminin temel amacı, her bir yumurtalıktan çok sayıda ve yüksek kaliteli oosit elde etmektir (Wani, Wani, Khan, & Salahudin, 2000). Foliküler gelişim, yani oositin büyüme süreci, oositin kalitesini ve gelişim potansiyelini etkiler. Oosit kalitesi, erken embriyonik gelişim, gebelik oluşumu ve devamlılığı ile dolayısıyla IVF ortamında gelişim yeteneği üzerinde etkili bir rol oynar (Krisher 2004). Koyunlarda oosit toplama yöntemleri genellikle punksiyon, slicing veya aspirasyon yöntemleri ile toplanabilir. Yapılan çalışmalarda ovaryumlardan punksiyon ve slicing yöntemlerinin, aspirasyon yöntemine nazaran daha çok sayıda ve iyi kalite de koyun oositi elde edildiği belirlenmiştir (Wani, Wani, Khan, & Sidiqi, 1999). Bununla beraber koyunlarda ovum pick-up (OPU) ve laparoskopik yöntemlerle de oosit elde etmek mümkündür (Teixeira ve ark., 2011).

2.2.1.1. *Slicing* (dilimleme) yöntemi

Slicing yöntemi, ovaryumlardan oosit toplamak için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, özellikle post-mortem elde edilen ovaryumlar için uygundur ve araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Slicing, folikülleri doğrudan

keserek oositleri serbest bırakmayı hedefler. Slicing yöntemi genellikle mezbahadan alınan veya ötenazi uygulanmış koyunların ovaryumları kullanılarak uygulanır. Ovaryumlar, 30-35 °C sıcaklık, %0.9' luk NaCl veya PBS (fosfat tamponlu tuz solüsyonu) içerisinde steril koşullarda laboratuvara getirilir. Ovaryumlar, steril bir diseksiyon kabına yerleştirilir. Yine aynı koşulda ve sıcaklıkta bulunan fizyolojik tuz çözeltisi (%0.9'luk NaCl veya PBS) içinde tutulur. Ovaryumlar, bistüri veya ince neşter kullanılarak küçük dilimlere (slices) ayrılır. Her dilimleme işleminde, foliküller kesilerek içerdikleri foliküler sıvı ve oositler serbest bırakılır. Dilimlenmiş ovaryum parçaları, bir petri kabı içinde foliküler sıvı toplama solüsyonu ile yıkanır ve parçalar nazikçe karıştırılarak oositlerin serbest kalması sağlanır. Petri kabındaki foliküler sıvı, mikroskop altında incelenir. Oositler, pipetleme veya ince iğne kullanılarak başka bir kapta toplanır. Toplanan oositler, daha sonra yıkanır ve maturasyon ortamına aktarılır (Baldassarre, & Karatzas, 2004).

2.2.1.2. Punksiyon yöntemi

Oosit punksiyon (aspirasyon) yöntemi, canlı hayvanlardan oosit toplamak için kullanılan minimal invaziv bir tekniktir. Bu yöntem, ultrason rehberliğinde transvajinal veya laparoskopik olarak gerçekleştirilir ve genellikle süperovulasyon protokolleri ile desteklenir. Donör koyunlar, genellikle FSH veya gebe kısrak serum gonadotropini (eCG) gibi hormonlarla süperovulasyon protokolüne tabi tutulur. Bu, çok sayıda folikülün aynı anda gelişmesini sağlar. İşlem sırasında hayvanın rahat ve hareketsiz kalmasını sağlamak için sedasyon veya genel anestezi uygulanır. Ultrason cihazı kullanılarak ovaryumlar ve foliküller görüntülenir. Ultrason probu, vajina veya karın boşluğu yoluyla yerleştirilir. İnce bir aspirasyon iğnesi, ultrason probuna bağlı kılavuz yardımıyla foliküllere yönlendirilir. İğne, foliküle girerek foliküler sıvıyı ve içindeki oositleri aspire eder. Aspire edilen foliküler sıvı, bir toplama tüpüne aktarılır. Bu işlem her folikül için tekrarlanır. Toplanan foliküler sıvı, mikroskop altında incelenir ve oositler pipetleme yöntemi ile izole edilir. Oositler, steril kültür ortamında birkaç kez yıkanarak temizlenir ve in vitro maturasyon (IVM) ortamına aktarılır (Baldassarre, & Karatzas, 2004; Paramio, & Izquierdo, 2014).

2.2.1.3. Ovum Pick-Up (OPU) yöntemi

Canlı hayvanlardan oosit toplamak için kullanılır. Donör koyunlar, genellikle hormonlarla süperovulasyon protokolü ile hazırlanır. Ultrason rehberliğinde, ince bir iğne kullanılarak transvajinal olarak foliküllere ulaşılır. Foliküler sıvı aspire edilerek oositler elde edilir. Aspire edilen foliküler sıvıdan oositler mikroskop altında toplanır ve yıkanır. Minimal invaziv bir yöntemdir. Aynı hayvandan tekrarlanabilir şekilde oosit elde edilebilir. Genetik olarak üstün bireylerden düzenli oosit toplama imkanı sunar (Baldassarre, 2021).

2.2.1.4. Laparoskopik yöntem

Canlı hayvanlardan oosit toplamak için kullanılır. Donör koyunlar, genellikle hormonlarla süperovulasyon protokolü ile hazırlanır. Genel anestezi altında, karın boşluğuna küçük insizyonlar yapılır ve laparoskopik aletler kullanılarak ovaryumlar görüntülenir. Foliküller, ince bir aspirasyon iğnesi ile delinerek foliküler sıvı ve oositler aspire edilir. Aspire edilen foliküler sıvıdan oositler mikroskop altında toplanır ve yıkanır. Yüksek kaliteli oosit elde edilir. Tekrarlanabilir bir prosedürdür. Hayvanın tekrar tekrar kullanılmasına olanak tanır (Fantinati ve ark., 2005).

2.2.2. Koyun oositinin morfolojik özellikleri

Koyun oositleri, tipik olarak küresel şekildedir ve çapları yaklaşık 120-130 mikrometre arasında değişir. Bu boyut, oositin gelişim aşamasına bağlı olarak biraz farklılık gösterebilir. Oositin dış kısmında, *zona pellucida* adı verilen kalın, glikoprotein bazlı bir tabaka bulunur. Bu tabaka, oositin korunmasını sağlar ve spermle birleşme sırasında önemli bir rol oynar (Sugiura, Pendola, & Eppig, 2005). Zona pellucida, ışık mikroskobu altında homojen ve şeffaf bir yapı olarak görünür. Oositin iç kısmındaki sitoplazma, homojen bir dağılım gösterir ve granüler bir yapıya sahiptir. Sitoplazma, metabolik olarak aktif olan organeller ve çeşitli inklüzyonları içerir (Duranthon, & Renard, 2001). Mikrotübüller, mitokondriler ve diğer hücresel yapılar bu alanda yoğunlaşmıştır. Koyun oositleri, ovaryumdan toplandığında genellikle

kumulus hücreleriyle çevrilidir. Bu hücreler, oositin beslenmesine ve olgunlaşmasına yardımcı olur. Kumulus hücreleri, ovulasyon sırasında oositin serbest bırakılmasına kadar oositin etrafında kalır ve hücreler arası bağlantılarla oosite bağlıdır (Cirit ve ark., 2008). Oositlerin çevresini saran kumulus hücre tabakasının kalınlığı, oositlerin mayotik kapasitesini yansıtır. Kalın kumulus oosit kompleksi (COC) tabakaları, korona radiata hücrelerinin oositlerin nükleer olgunlaşmasını tamamlamak için yeterli olduğunu gösterir. Bu hücreler, oosit kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılır ve oositlerin mayoz I aşamasına kadar gelişimi için gerekli faktörleri salgılar (Kidson, 2004).

Oosit olgunlaşmamışken, çekirdek büyük ve belirgin bir germinal vesicle (GV) olarak görünür. Olgunlaşma sürecinde, çekirdek bölünür ve polar cisimcik adı verilen küçük hücresel yapılar oluşturur. Bu süreç, oositin olgunlaşmasının bir göstergesidir. Oosit olgunlaştıkça, birinci polar cisimcik oluşur ve bu, oositin metafaz II aşamasına girdiğini gösterir (Sagirkaya ve ark., 2007).

Polar cisimcik, küçük ve yuvarlak bir yapı olarak oositin periferinde bulunur ve genellikle mikroskop altında gözlemlenebilir. Bazen koyun oositlerinin sitoplazmasında yağ damlacıkları gibi inklüzyonlar bulunabilir. Bu damlacıklar, enerji rezervi olarak işlev görebilir ve oositin metabolik aktivitelerini destekler (Keskintepe ve ark., 2002).

Koyun oositlerinin mikroskop altında incelenmesi, yukarıda bahsedilen yapıların detaylı bir şekilde gözlemlenmesine olanak tanır. Stereo mikroskobu kullanılarak zona pellucida, kumulus hücreleri ve sitoplazma granülleri kolaylıkla görülebilir. Elektron mikroskobu, oositin iç yapılarının daha detaylı incelenmesini sağlar ve hücresel organellerin yerleşimi hakkında daha fazla bilgi verir. Bu özellikler, koyun oositlerinin morfolojik olarak tanımlanmasına yardımcı olur ve oosit kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bir rol oynar. Oositlerin bu detaylı incelenmesi, in vitro maturasyon (IVM) ortamına aktarılacak olan oositlerin kalitesi belirlenmiş olur (Birler ve ark., 2002a; Birler ve ark, 2002b; Wani ve ark., 2000).

2.2.3. *In Vitro* maturasyon (IVM)

In vitro maturasyon (IVM), koyun oositlerinin laboratuvar ortamında olgunlaştırılması sürecidir. Bu teknik, embriyo üretimi ve genetik ilerleme sağlamak amacıyla reprodüktif biyoteknolojinin önemli bir parçasıdır. Koyunlarda IVM, özellikle hayvan ıslahı ve araştırma çalışmalarında yaygın olarak kullanılır (Byrd, Flores-Foxworth, Applewhite, & Westhusin, 1997). IVM'nin başarısı, kullanılan kültür ortamının bileşimi, inkübasyon koşulları ve oositlerin toplandığı evre gibi birçok faktöre bağlıdır. İnkübasyon sırasında sıcaklığın 38-39°C aralığında tutulması gereklidir. Bu sıcaklık, koyun oositlerinin optimal gelişimi için idealdir. Oositler, %5 CO_2 ve %95 hava içeren nemli bir ortamda inkübe edilir (Birler ve ark., 2001). Bu gaz kompozisyonu, medyumun pH dengesini ve oositlerin metabolik ihtiyaçlarını karşılar. Oositlerin olgunlaşma süresi genellikle 24-48 saat arasında değişir. Bu süre zarfında oositler, germinal vezikül (GV) evresinden metafaz II (MII) evresine geçer. IVM için kullanılan bazal kültür medyumları genellikle TCM-199, MEM veya DMEM'dir. Bu medyumlar, oositlerin olgunlaşması için gerekli olan temel besinleri sağlar. Oosit maturasyonu için FSH (Folikül Stimüle Edici Hormon), LH (Luteinize Edici Hormon) ve östradiol gibi hormonlar kültür ortamına eklenir (Barry, Malison, Lapp, & Procarione, 1995). Bu hormonlardan, FSH oosit maturasyonunu ve foliküler hücrelerin desteğini teşvik eder, LH Oositlerin olgunlaşma sürecini başlatır ve tamamlar. Östradiol ise foliküler ortamı taklit eder ve oosit olgunlaşmasını destekler. Fetal bovine serum (FBS) veya serum yerine kullanılan albümin, büyüme faktörleri ve diğer ek bileşenler de ortamın verimliliğini artırır. Antioksidanlar da eklenerek oksidatif stresin etkileri azaltılabilir. IVM'nin başarısını değerlendirmek için oositlerin morfolojik özellikleri incelenir. MII evresine ulaşmış oositlerde ikinci polar cisimcik gözlemlenir (Deleuze, & Goudet, 2010). Olgunlaşmanın en önemli göstergesi, oositin ikinci polar cisimciği ekstrüde etmesi ve kumulus-oosit kompleksinin genişlemesidir. Kumulus hücreleri, oositlerin çevresinde bulunur ve olgunlaşma sırasında önemli destek sağlar. Kumulus-oosit kompleksi (COC), ko-kültür sistemlerinde sıklıkla kullanılır. Granüloza hücreleri veya diğer somatik hücrelerle yapılan ko-kültürler, oositlerin olgunlaşma oranını ve kalitesini arttırmaktadır (Aghaz, Hajarian, Shabankareh, & Abdolmohammadi, 2015; Gilchrist, & Thompson, 2007).

2.2.3.1. *In Vitro* maturasyonu etkileyen faktörler

In vitro maturasyon (IVM) süreci, çeşitli çevresel ve biyokimyasal faktörlerden etkilenir. Bu faktörlerin optimize edilmesi, oositlerin başarılı bir şekilde olgunlaşmasını sağlamak için kritik öneme sahiptir. Kültür ortamı bileşenleri, hormonlar, büyüme faktörleri ve antioksidanlar gibi bileşenler, oositlerin beslenmesi ve gelişimi için gereklidir. Örneğin, TCM-199 gibi bazal medyumlar, oositlerin ihtiyaç duyduğu besin maddelerini sağlar. Folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) gibi hormonlar, foliküllerin gelişimini ve oosit olgunlaşmasını teşvik eder. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi büyüme faktörleri ise hücre büyümesini destekler. Sıcaklık, gaz kompozisyonu ve nem oranı gibi fiziksel koşullarda maturasyon medyumunu etkileyen faktörlerdir (Tanghe, Van Soom, Nauwynck, Coryn, & de Kruif A, 2002).

2.2.3.1.1. Sıcaklık faktörü

In vitro maturasyon (IVM) sürecinde sıcaklık, oositlerin olgunlaşması üzerinde kritik bir etkiye sahiptir. Optimal sıcaklık koşulları, sağlıklı oosit gelişimi için gereklidir. Genellikle 38-39°C olarak kabul edilir. Bu, koyunların doğal vücut sıcaklığına yakındır. Optimal sıcaklık, oositlerin normal biyolojik süreçlerinin sürdürülmesi için gereklidir. Bu aralık, hücresel metabolizmayı destekler ve genellikle en iyi olgunlaşma sonuçlarını sağlar.

Sıcaklık stresi spermatogenezi, folikül gelişimini, oosit olgunlaşmasını, erken embriyonik gelişimi, fötal ve plasenta büyümesini ve laktasyonu bozar. İnsan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri vardır ve hayvancılık sektöründe de ciddi sorunlara neden olur (Mustafi, Chakraborty, Dey, & Raha, 2009; Wolfenson, Roth, & Meidan, 2000). İn vitro maturasyon (IVM) sırasında sıcaklık, oositlerin olgunlaşması üzerinde kritik bir rol oynar. Sıcaklık dalgalanmaları ve optimal sıcaklıktan sapmalar, hem morfolojik hem de genetik düzeyde çeşitli değişikliklere yol açabilir. Optimal sıcaklıktan sapmalar, sitoplazmik olgunlaşmada anormalliklere yol açabilir. Sitoplazmik organellerin (mitokondri, endoplazmik retikulum vb.) dağılımı ve fonksiyonu

bozulabilir. Optimal sıcaklık mikrotübül dinamiklerini ve iğ ipliklerinin oluşumunu destekler. Yüksek sıcaklık mikrotübül stabilitesini bozarak anormal iğ iplikleri ve kromozom disfonksiyonuna yol açar. Hücre zarının geçirgenliğini değiştirir ve hücre içi homeostazisi bozar. Anormal sıcaklık, pro-apoptotik genlerin (BAX, CASPASE) aktivitesini artırabilir ve hücre ölümüne yol açabilir. Aynı zamanda DNA'da hasara (kırıklar, oksidatif hasar) yol açabilir. Bu hasarlar, genomik stabiliteyi bozabilir ve hücre fonksiyonlarını olumsuz etkileyebilir. Sıcaklık değişiklikleri, kültür ortamında glukoz tüketimi ve laktat üretimini etkileyebilir. Metabolik stres, oositlerin enerji dengesini bozabilir. Sıcaklık stresi, ROS üretimini artırır ve yüksek ROS düzeyleri, hücresel hasara ve oksidatif strese yol açar (Silva, Marques, & Chaveiro, 2010).

2.2.3.1.2. Oksidatif stres (OS)

Sağlıklı bir organizmada, ROS ve antioksidanlar arasında bir denge vardır. Bu denge bozulduğunda oksidatif stres gelişir. Oksidatif stres, özellikle ROS olmak üzere, oksidan maddelerin antioksidanlardan daha fazla olması durumunda meydana gelir (Silva ve ark., 2010). ROS'un başlıca bileşenleri hidroksil (OH), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksittir (O^2-) (Agarwal ve ark., 2005). ROS ve reaktif azot türleri (RNS), pro-oksidan moleküller olarak aerobik metabolizmada yer alır. Serbest radikaller, iki ucu keskin bir kılıç gibidir. Fizyolojik seviyelerde sperm aktivitesi (kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve hiperaktivasyon), döllenme ve embriyo gelişimi için gereklidir. Ancak, fizyolojik seviyelerin üzerindeki konsantrasyonlar, sperm ve oosit hasarına, deformitelere ve düşük yapma, intrauterin büyüme geriliği ve kısırlığa yol açabilir. Fizyolojik koşullar altında, vücudun doğal antioksidanları serbest radikalleri nötralize etmek için yeterlidir. Patofizyolojik koşullar altında ise, endojen (doğal) antioksidanlar serbest radikallerin aşırı artışını önleyemez. Bu nedenle, dışarıdan antioksidan alımı gereklidir (Zhong, & Zhou, 2013).

Yardımcı üreme teknolojilerinin uygulanması, hücre içi ROS üretiminin durmasına veya azalmasına ve oksidatif strese yol açabilir. Bu etki, memeli oositlerinin gelişim gücünü azaltır ve mitokondriyal disfonksiyona neden olur. Bu eksiklikler, memelilerde kötü gebelik sonuçlarına, tekrarlayan gebelik kayıplarına, embriyonik ölümlere ve düşük doğum ağırlığı gibi üreme bozukluklarına yol açar

(Meng ve ark., 2020).

İn vivo ortamda yumurtalık kanalı ve folikül sıvılarında bulunan antioksidan savunma sistemi elementleri, oositleri ve embriyoları reaktif oksijen türlerinin negatif etkilerinden korur. Ancak, in vitro ortamda, hücredeki ROS miktarındaki artış, hücrenin tolere edebileceği miktarı aşarsa, oksidatif stres oluşturur. Oksidatif stres, hücre metabolizmasının bozulmasına ve artan kusurlu hücrelerin ortaya çıkmasına neden olarak, embriyo gelişiminin zarar görmesinin etiyolojisinde kritik bir rol oynar (Khazaei, & Aghaz, 2017; Premkumar, & Chaube, 2016; Tiwari ve ark., 2016)

Oksidatif stres (OS), prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bir dengesizlikten de kaynaklanır. Bu oran, ROS gibi pro-oksidan seviyelerinin artmasıyla veya antioksidan savunma mekanizmalarında bir azalma ile değişebilir (Cindrova-Davies ve ark., 2007; Ruder, & Hartman, 2009). ROS, serbest radikallerin (hidroksil iyonu, süperoksit vb.), Radikal olmayanların (ozon, tek oksijen, lipid peroksitler, hidrojen peroksit) ve oksijen türevlerinin toplanmasını gösteren geniş bir molekül sınıfını temsil eder (Agarwal, & Prabakaran, 2005). Oldukça reaktif ve kararsızdırlar. Bu nedenle, ROS, bir elektron elde etmek ve kararlı hale gelmek için nükleik asitler, lipitler, proteinler ve karbonhidratlarla reaksiyona girebilir. Bu reaksiyonlar, sonunda hücre hasarına neden olan müteakip zincir reaksiyonlarının bir kademesini indükler (Attaran ve ark, 2000; Szczepańska, Koźlik, Skrzypczak, & Mikołajczyk, 2003). ROS, hücre zarlarından yayılabilir ve geçebilir ve çoğu hücresel molekül türünü (nükleik asitler, proteinler ve lipitler) değiştirebilir, mitokondriyal değişikliklere (Kowaltowski, & Vercesi, 1999), oositlerde mayotik tutukluğa (Nakamura, Yamagata, Sugino, Takayama, & Kato, 2002), embriyonik bloğa ve hücre ölümüne (Hashimoto, Minami, Yamada, & Imai, 2000) yol açar. Öte yandan, OS, hücresel redoks devrelerini bozan, redoks tarafından düzenlenen hücresel süreçlerde bozulmalara neden olan ve / veya hücresel makromoleküllere oksidatif olarak zarar veren artan ROS seviyeleri olduğunda ortaya çıkar (Devine, Perreault, & Luderer, 2012).

Sonuç olarak, döllenme ve gebelik oranlarının azalmasına yol açar. Koyunlarda in vitro embriyo üretim teknolojisi ile elde edilen başarı oranlarının düşük olduğu bildirilmiştir. Olgunlaşma evresine ulaşan olgunlaşmamış oositlerin %70-90'ı olgunlaşır ve bunların %50-80'i döllenir, ancak bunların sadece %20 ila %50'si

blastosit aşamasına ulaşır. Hücre membranlarında lipid yapıları üzerinde etki eden reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu bu negatif etkileri azaltmak için çeşitli antioksidanlar kullanılmaktadır.

2.2.3.1.3. Antioksidanlar

Vücuttaki hücrelerde ve dokularda, serbest radikallerin oluşumunu ve oksidatif etkilerini önleyebilen bir savunma sistemi bulunmaktadır. Bu savunma sisteminde işlev gören maddelere antioksidanlar denir (Şimşek, 1999). Antioksidanlar, işlevsel yapılarına göre; Radikalleri temizleyerek etki eden "serbest radikallerin oluşumunu önleyenler" ve radikallerle dengeli bir ürün oluşturarak reaksiyonları sona erdiren "zincir kırıcı antioksidanlar" olarak ikiye ayrılır. Serbest radikal oluşumunu engelleyen antioksidanlar içinde metal iyon bağlayıcılar (albumin, transferrin, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz) kendi içlerinde ayrılmışlardır; zincir kırıcılar, lipid çözünür (alfa tokofeol, ubikinon, beta karoten) ve su çözünür (glutatyon, sistein, askorbat) olarak ayrılır (Şimşek, 1999). Ayrıca, selenyum ve çinko gibi antioksidan enzimlerin kofaktörleri olarak işlev gören maddeler de bulunmaktadır (Hezavehei ve ark., 2018).

Enzimatik antioksidanlar, aşırı ROS'u nötralize eder ve hücresel yapıya zarar vermesini engeller. Enzimatik antioksidanlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), çeşitli peroksidazlar ve peroksiredoksinler (PRDX'ler), peroksitleri su ve alkole dönüştürebilen glutatyon peroksidazları (GPX'ler) gibi bileşenlerden oluşur (Agarwal ve ark., 2005). SOD enzimleri, süperoksit anyonunun (O2-) O_2 ve H_2O_2'ye dönüşümünü katalize ederken, CAT H_2O_2'yi O_2 ve H_2O'ya dönüştürür. SOD enzimi üç izoenzim olarak bulunur (Tripathi ve ark., 2011). SOD1, SOD2 ve SOD3. SOD1, sitozolde metal kofaktörler olarak bakır (Cu) ve çinko (Zn) içerir. SOD2, manganez (Mn) içeren mitokondriyal bir izoformdur, oysa SOD3, ekstraselüler formu kodlar. Se, Cu ve Zn gibi besinler bazı antioksidan enzimlerin aktiviteleri için gereklidir, ancak bunların kendileri antioksidan etkileri yoktur. Enzimatik olmayan antioksidanlar, glutatyon (GSH), vitamin C, taurin, hipotaurin, vitamin E, Zn, selenyum (Se), beta karoten ve karotenden oluşur (Pandey, & Chaube, 2014). GSH, hücre içi fizyoloji ve metabolizmada birçok önemli işlevi olan bir tripeptit tiyol bileşiğidir. GSH'nin en

önemli rollerinden biri, hücrelerdeki redoks durumunu koruyarak oksidatif yaralanmaların neden olduğu zararlı etkilere karşı koruma sağlamaktır. GSH'nin ROS'a karşı koruyucu etkisi, GPx ve GSH redüktaz gibi ilişkili enzimlerle olan etkileşimleri ile kolaylaştırılır (Khazaei, & Aghaz, 2017).

Sonuç olarak antioksidanlar, ROS tarafından indüklenen oksidatif strese karşı ana savunma faktörleridir. Birçok raporda, IVM ortamına antioksidan takviyesinin, oosit olgunlaşması sırasında GSH depolamasını artırıp oksidatif stresi hafifleterek sitoplazmik olgunlaşmayı iyileştirdiği ve embriyonun erken gelişim aşamalarında oksidatif saldırganlıklara karşı daha fazla korunmasına katkıda bulunduğunu bilinmektedir (Khazaei, & Aghaz, 2017).

2.2.3.1.3.1. Melatonin

Melatonin, serbest radikalleri ortadan kaldırabildiği ve reaktif oksijen türlerini (ROS) daha az zararlı türlere dönüştürebildiği için güçlü antioksidan özellikleriyle tanınır. Bu şekilde melatonin lipidleri, proteinleri ve DNA'yı oksidatif hasardan korur. Cipolla-Neto, & Do Amaral, 2018). Güçlü bir serbest radikal temizleyici olarak, melatoninin antioksidan kaskadı, yani melatonin ve onun sekonder ve tersiyer metabolitleri, onu diğer klasik antioksidanlardan ayırır. Melatoninin metabolitlerinin, ROS ile etkileşimini takiben, serbest radikalleri süpürme yeteneklerini korudukları göz önüne alındığında, bir melatonin molekülü, sadece bir veya daha az ROS'u detoksifiye eden klasik antioksidanların aksine, on ROS'a kadar süpürme kapasitesine sahiptir (Hardeland, 2017). Bu şekilde melatonin, serbest radikallerle etkileşim yoluyla hidroksile edilebilir; bu, ani bir intramoleküler yeniden düzenlemeye neden olur ve ardından üçüncü bir halkanın oluşumuna yol açar, böylece siklik 3-hidroksimelatonin (c3OHM) olarak adlandırılan bir metabolite yol açar. Benzer şekilde, c3OHM ayrıca iki OH tarafından melatoninin başka bir ana metaboliti olan N^{1}-asetil-$N^{2'}$ye dönüştürülebilen güçlü bir serbest radikal temizleyicidir (Hardeland, 2017).

Öte yandan melatonin, yalnızca sirkadiyen ritimlerin kontrolünde yer almayan, aynı zamanda bağışıklık tepkisinin düzenlenmesine, karsinojenezin inhibisyonuna,

kök hücrelerin çoğalmasına ve yaşlanmanın modülasyonuna katılan pleiotropik bir moleküldür (Olcese, 2020).

2.2.3.1.3.1.1. Melatoninin folikül gelişimi ve ovulasyon üzerindeki etkisi

Dişi üremesindeki melatonin fonksiyonları, ovaryumdaki doğrudan etkilerine dayanmaktadır (Tamura ve ark., 2012). Sıçanların granüloza hücrelerinde, luteal hücrelerde, antral foliküllerde ve korpus luteumda MT1 ve MT2 reseptörlerinin ekspresyonu, memeli üreme süreçlerinin düzenlenmesinde önemli rollere sahip olduğunu gösterir. Aslında melatonin, kemirgenlerde ve insanlarda granüloza hücrelerinin steroidogenezini ve folikül fonksiyonunu modüle eder (Rai, & Gosh, 2021).

Folikülogenez, ovaryum folikül oluşumunun karmaşık bir sürecidir ve temel olarak dolaşımdaki FSH seviyelerine bağlıdır. Ovaryum foliküllerinin oluşumu, oosit olgunlaşmasında yer alan genlerin ekspresyonunu modüle eden ikinci haberciler olarak hareket ettikleri için düşük ROS seviyelerine de dayanır. Bununla birlikte, aşırı ROS, foliküldeki granüloza ve oosit hücrelerine zarar verebilecek oksidatif stres üretebilir (Haldar, & Chowdhury, 2021). Bu nedenle melatonin, oositin pro-oksidan-antioksidan dengesinin korunması için gereklidir, böylece dişi gameti oksidatif hasardan korur ve sağlıklı bir folikülogenezi düzenler (Haldar, & Chowdhury, 2021; Rai, & Gosh, 2021). Melatonin, foliküler sıvıda yüksek konsantrasyonlarda (kan seviyelerinden üç kat daha yüksek) bulunur ve burada mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK) aktivasyonu yoluyla granüloza hücre proliferasyonunu uyarır (Minguini ve ark., 2019). Melatonin, folikül büyümesiyle orantılı olarak artar (Tamura, Tanabe, Jozaki, Taketani, & Sugino, 2019). Böylece foliküller büyüdükçe melatonin konsantrasyonu da artar.

2.2.3.1.3.1.2. Melatoninin oosit kalitesi ve embriyo kalitesine etkisi

Çok sayıda in vitro çalışma, oosit olgunlaşmasını, oosit fertilizasyonunu ve embriyo gelişimini artırmak için kültür ortamını melatonin ile desteklemiştir (Tamura ve ark., 2019). Bu yaklaşım, oksidatif stresin oositlerde apoptozu hızlandırdığını ve

dolayısıyla fertilizasyon kapasitelerini etkilediğini varsayar. Aslında, hayvan çalışmaları oksidatif stresin oositin sadece sekiz saat in vitro inkübasyondan sonra oluştuğunu göstermiştir; bununla birlikte, oosit kültür ortamının melatonin ile desteklenmesi, fare oositlerinde zamana bağlı bir şekilde böyle bir stresi önemli ölçüde hafifletti ve böylece apoptozun başlamasını geciktirdiği bildirilmiştir. Ayrıca, melatonin takviyesi de embriyo kalitesini önemli ölçüde iyileştirmiştir (Lord, Nixon, Jones, & Aitken, 2013). Sonuçlar, ROS üretimini, apoptozu ve DNA hasarını azaltarak domuz oositlerinin kalitesini ve gelişimini artırabildiğini göstermektedir (Lin ve ark., 2018). Benzer şekilde, düşük melatonin dozları, sığır blastosistlerinin üretimini ve kalitesini iyileştirirken, DNA metiltransferaz 3a (DNMT3A), okludin (OCC) ve kaderin (CDH1) ve azalan aquaporin 3 (AQP3) ekspresyonu, apoptoza karşı artan bir dirence yol açar (Marques ve ark., 2018).

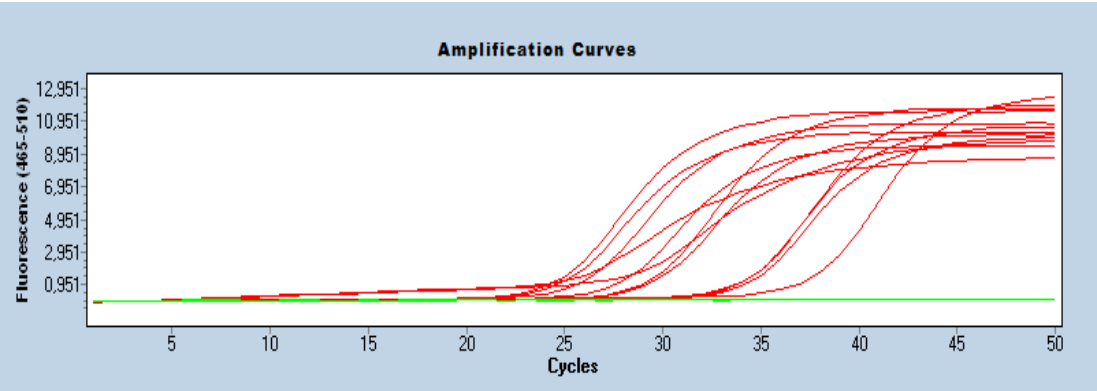
Ovaryum yaşlanması, kademeli olarak tükenen primordiyal folikül sayısı ve azalan oosit kalitesi ile karakterize edilir ve böylece fertilitede ilerleyen bir azalmaya neden olur (Li ve ark., 2012). 10 haftalık dişi farelerle yapılan bir araştırma, 100 µg/mL melatonin içeren su verilmesinin ovaryum yaşlanmasını geciktirdiğini göstermiştir. Fareler 43 haftalık olana kadar tutulan bu takviye, yavru eş kontrol farelerine kıyasla tedavi edilen farelerde daha yüksek sayıda ilkel, birincil ve antral foliküllerin yanı sıra daha iyi döllenme ve blastosist oranları ile sonuçlanmıştır (Tamura ve ark., 2017). Ek olarak, melatonin yaşlı farelerde telomer uzunluğunu önemli ölçüde artırmıştır ve sirtuinler (SIRT1, SIRT3) ve otofaji ile ilgili gen mikrotübül ile ilişkili protein hafif zincir 3 (LC3) gibi yaşlanma ile ilgili genlerin ekspresyonunu geliştirmiştir. Melatoninin ayrıca yaşlanma sırasında genellikle aşağı regüle edilen ribozomla ilişkili 40 geni yukarı regüle edebildiği gösterilmiştir, bu sonuçlar melatoninin ovaryum yaşlanmasını geciktirme kapasitesini göstermektedir (Tamura ve ark., 2017).

2.2.3.1.3.1.3. Melatoninin *in vitro* maturasyonda gen ekspresyonlarına etkisi

Reseptör aracılı etkilerine ek olarak melatonin, amfifilik yapısı nedeniyle sitoplazmik membrandan geçebilir ve gen ekspresyonunu düzenlemek için spesifik DNA sekanslarına bağlanabilir (Fischer, Kleszczynski, Hardkop, Kruse, &

Zillikens, 2013). Önceki çalışmalar, melatoninin hücrelere nüfuz ettikten sonra güçlü bir serbest radikal temizleme özelliğine sahip olduğunu (Melhuish Beaupre, Brown, Gonçalves, & Kennedy, 2021; Varoni, Soru, Pluchino Intra, & Iriti, 2016), granüloza hücrelerinin bütünlüğünü korumak için bir antioksidan görevi görerek çekirdek, mitokondri ve plazma zarlarındaki oksidatif stresi azalttığını bildirmiştir (Olcese, 2020; Tanabe ve ark., 2015). Oksidatif stres , reaktif oksijen türleri (ROS) konsantrasyonları ile antioksidan aktivite arasındaki dengesizlik ile karakterize edilir ve normal metabolizma sırasında üretilen serbest radikallerin kademeli olarak birikmesiyle sonuçlanır (He ve ark., 2016). ROS, oosit olgunlaşmasından fertilizasyona , embriyo gelişimine ve hamileliğe kadar birçok fizyolojik süreci etkiler (Agarwal ve ark., 2005). Hücrelerin ROS birikimine karşı savunma mekanizmaları enzimatik veya enzimatik olmayabilir. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), ve katalaz (CAT) gibi enzimler antioksidan savunmayla ilgilidir. Sığır oositlerinde melatonin, *CAT, SOD* ve *GPX* ekspresyonunu yukarı doğru düzenler (Zhao ve ark., 2017). *In vitro* foliküler gelişim sırasındaki oksidatif stres oosit kalitesini olumsuz etkiler (Agarwal, Sengupta, & Durairajanayagam, 2018; Kala, Shaikh, & Nivsarkar, 2017). Bu şekilde kültür ortamındaki antioksidanların varlığı oksidatif stresi azaltabilir ve *in vitro* oosit kalitesini koruyabilir (Luddi ve ark., 2016).

Melatonin, HSP70'in gen ekspresyonunu önemli ölçüde yükseltir. Benzer şekilde SPKH1 ve BCL2'nin anti-apoptotik ile ilgili genlerini önemli ölçüde etkiler. Pro apoptotik ilişkili genler için sıcaklık stresi farklı aktivitelere sahiptir. Melatonin Kaspaz 3'ü aşağı regüle ederken ve p53 ile BAX genlerini yukarı regüle eder. Mitokondri fonksiyonlarıyla ilişkili SIRT1, AKT2 ve Polg2'nin gen ekspresyonuna gelince melatonin ekspresyonlarını büyük ölçüde yukarı regüle etmektedir (Li ve ark., 2015). Sığır in vitro olgunlaşma sistemlerinde melatonin takviyesi, olgunlaşma ile ilgili genlerin (GDF9), kumulus hücresi genişlemesiyle ilişkili genlerin (PTX3 ve HAS1) ve epigenetik modifikasyon geninin yukarı regüle olmasını desteklemektedir (Tian ve ark., 2014). Olgunlaşma ortamına melatonin eklenmesi, sığırlarda oosit olgunlaşma oranını ve kumulus hücre genişlemesini iyileştirmektedir (El-Raey ve ark., 2011; Şekil 1).



Şekil 1. Ekspresyonu yapılan genlerin amplifikasyon eğrileri.

2.3. Çalışmanın Amacı ve Hedefleri

Hayvan türlerinde olduğu gibi koyun yetiştiriciliğinde de genetik materyalin korunması ve verim özelliği yüksek olan bireylerden daha fazla yararlanabilmesi spermanın dondurulması ile mümkündür. Dondurulmuş sperma ile yapılan suni tohumlama, embriyo transferi, *in vitro* fertilizasyon (IVF), klonlama ve intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi diğer yardımcı üreme tekniklerinden faydalanarak hayvan ıslahında istenilen noktalara gelinebilir.

Günümüzde halen koyun embriyosu üretiminde istenilen sonuçların elde edilememesinde, *in vitro* maturasyon ve *in vitro* embriyo üretiminde etkisi olan sıcaklık stresi ve reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkileridir. Başarı oranını arttırılabilmesi kültür ortamlarına ilave edilen antioksidan maddeler aracılığıyla mümkün olmaktdır. Tamamen özgün olan bu tezde; koyunlarda i*n vitro* maturasyon sırasında uygulanan melatonin hormonunun sıcaklık stresi üzerine etkisinin tüm genom çapında incelenerek *in vitro* embriyo üretiminde başarının arttırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla;

1. Melatonin antioksidan özelliğinden yararlanarak maturasyon ortamına eklenmesi
2. Maturasyon ortamında açığa çıkan ROS'lara melatonin gen düzeyindeki etkisi
3. Maturasyon sonrası embriyo gelişim aşamalarının değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan bu tez çalışması Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarında Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun 12.10.2021 tarih ve B.30.2.ULU.0.8Z.00.00/152 sayılı onayı ile gerçekleştirildi.

Tezin yapılması esnasında kullanılan tüm kimyasal madde listesi markası ile beraber Tablo 18'de verilmiştir.

3.1. Çalışma Materyali

Çalışmada kullanılan ovaryumlar Bursa Et-Balık mezbahasında kesimi gerçekleştirilen koyunlardan alınarak zaman kaybedilmeden 35 ºC'de 500 ml %0.9'luk fizyolojik tuzlu su içeren termoslara alınmıştır. İstenilen ovaryum miktarı alındıktan sonra hemen vakit kaybetmeden kısa süre içerisinde Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı IVF laboratuvarına getirilmiştir.

3.2. Oositlerin Toplanması

Ovaryum çevrelerinde bulunan fazla doku ve yağlar kesilerek uzaklaştırdı. Diğer kan ve kalıntılardan arındırmak amacı ile de üç kez 37 ºC'deki PBS den geçirilmiştir. Bu süreç zarfında ovaryumlar işlemene alınan kadar 37 ºC'de su banyosında muhafaza edildi. Ovaryumların yüzeyinde bulunan foliküller bisturi ile belirli aralıklarla kesilerek öncelikle foliküler sıvının dışarı çıkması sağlandı. Geri kalan kısım ise 20 ml'lik enjektöre alınan oosit yıkama medyumu (Tablo 12) ile basınçlı bir şekilde ve her bir foliküle yaklaşık 7-8 ml kullanılarak petri kabına akıtıldı. Oositler stereo-mikroskop altında incelenerek hamilton enjektör yardımıyla seçildi. Seçim işleminde: oosit etrafında üç dört sıra kumulus hücresi olması, kumulusların sıkı bir şekilde ve hasar görmemiş biçimde oositi çevrelemesi, oosit çaplarının uygun ve vitellus dağılımının homojen olması gibi kriterler dikkate alındı.

3.3. *In Vitro* Maturasyon

Maturasyon için elde edilen oositler üç kez oosit yıkama medyumunda geçirildi. Daha sonra bir kez maturasyon medyumundan (Tablo 13) geçirilerek güzelce yıkandı. Maturasyon medyumudan geçirildikten sonra daha önce hazırlanmış ve inkube edilmiş olan dört kuyucuklu olgunlaştırma petrileri içerisine alındı. Bu petrilerin her bir kuyucuğunda 500 µl üzerinde mineral yağ kaplı medyum bulunmaktadır. Her bir kuyucuğa 50 oosit olacak şekilde yerleştirilip 19-24 saat 39 ºC ve 41 ºC sıcaklıkta neme doyurulmuş %5 CO_2'li atmosferde olan inkübatörlerde inkübe edildi. Bu aşama sonucunda oositler GV aşamasından MII aşamasına geldi ve maturasyon işlemi sağlandı.

Medyumları hazırlanması esnasında oositlerin maturasyonu için dört farklı çalışma grubuna ayrılmıştır. Çalışma medyumları her gün taze olarak hazırlandı. Her bir kuyucuğa önceden tartılıp hesaplanan melatonin miktarları final hacimde 10^{-7} M olucak şekilde eklenildi.

G39 ºC : 10^{-7} M melatonin içermeyen 39 ºC'de kontrol grubu

G39M ºC : 10^{-7} M melatonin içeren 39 ºC'de çalışma grubu

G41 ºC : 10^{-7} M melatonin içermeyen 41 ºC' de kontrol grubu

G41M ºC : 10^{-7} M melatonin içeren 41 ºC' de çalışma grubu hazırlanarak gruplar elde edildi.

3.4. Gen Ekspresyonu İçin Maturasyonu Tamamlanmış Oositlerin Seçilmesi

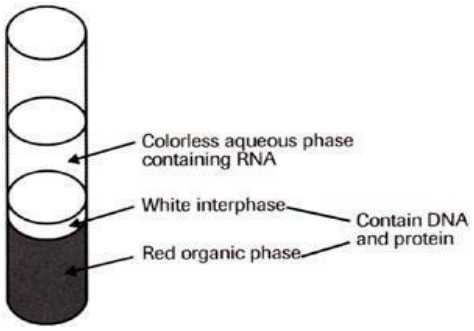
Kumulus genişlemeleri 24 saat sonrasında; genişlememiş, kısmen genişlemiş ya da tamamen genişlemiş biçiminde stereo mikroskobu altında belirlendi. Kumulusları tamamen genişlemiş olan oositlerin bir kısmı gen ekspresyonu işlemleri için 0.5 ml *eppendorf* tüplere alınarak -80 ºC'de muhaza edildi.

3.4.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu, *Tripure Isolation Reagent* ile yapıldı. Oosit örnekleri bulunan tüplere 1 ml *TriPure*^{TM} eklendi ve tüpler homojenizatör kullanılarak seramic beadler

yardımıyla homojenize edildi. Bu aşamda tüpteki doku homojen bir görünüm alarak parçalandı ve tripure isolation reagent etkisiyle pembe bir renk görünümü aldı. Homojenize edilen tüpler buza alındı ve 2 dakika bekletildi. Ardıdan 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Homojenizatörde hızın ve sürenin etkisiyle ısınan tüpleri soğutmak için bu işlemler gerçekleştirildi. Tüplere 200 µl kloroform eklendi ve 5 dakika bekletildi. Kloroform homojen hale gelen dokuda faz oluşumunu sağlamaktadır. Böylece RNA, DNA ve protein ayrı fazlarda elde edilmiş oldu. 12.000 rpm'de 4 ºC' de 20 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda 3 faz meydana geldi (Şekil 2).

1. Faz (Sulu faz): RNA içeren kısım. (Renksiz)
2. Faz: DNA içeren kısım. (Beyaz renkli)
3. Faz (Organik faz): Protein İçeren kısım. (Kırmızı renkli)



Şekil 2. Santrifüj sonu meydana gelen fazların görünümü

RNA izolasyonu için renksiz olan 1.faz yeni bir tüpe aktarıldı. Yeni tüpe 500 µl izopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İzopropanol RNA'yı, DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak için kullanıldı. Ardından 12.000 rpm' de 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı ve süpernatant atıldı. Oluşan çökelti üzerine 1 ml %75 etonol (EtOH) eklendi. 7500 g' de 4 ºC'de 5 dakika daha santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. 57 ºC'de EtOH uçuruldu. Kalan çökelti 50-100 µl *RNAse-free* su eklenerek pipetaj yapıldı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi.

3.4.2. RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi

İzole edilmiş olan RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi. İdeal saflıktaki kaliteli RNA'nın A260/A280 absorbans oranının 1,8-2,0 olası beklenir. Değerlendirmeler yapılırken bu göz önünde bulunduruldu.

3.4.3. cDNA (Komplementer) sentezi

cDNA sentezi, *Thermo Scientific™ RevertAid RT Reverse Transcription* Kit kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi. RNA örneği cDNA dönüşümü için 1000 ng konsantrasyonunda kullanıldı. Her örnek için RNA + Random Hexamer primer (0,5 µl) + Oligo dT (0,5 µl) + Nükleaz free su' dan 12 µl' e eklendi. Hazırlanan 12 µl RNA örneği karışımı 65 ^{o}C' de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından buz üzerinde soğutuldu (Tablo 1).

Tablo 1. Ayrı ayrı her bir reaksiyon için hazırlanan bileşenler

Bileşenler	Hacim
RNA örneği	12 µl
5X Reaksiyon Buffer	4 µl
Ribolock RNAse İnhibitör (20 U/µL)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
Revertaid RT (200 U/µL)	1 µl
Toplam Hacim	20 µl

Son hacim 20 µl olacak şekilde yukarıda belirtilen reaksiyon bileşenleri RNA örnekleri üzerine eklenerek 0,2 µl' lik pcr tüplerinde karıştırıldı ve Thermal Cycler cihazına yerleştirildikten sonra aşağıda belirtilen program ile reaksiyon gerçekleştirildi. Cihaz protokolü 25 ^{o}C' de 5 dakika, 42 ^{o}C' de 60 dk ve son olarak 70 ^{o}C' de 5 dakika şeklinde uygulandı. (Thermal Cycler Cihazı, Veriti™ 96 well Thermal Cycler, Thermo Fischer Scientific, Waltman, USA) Elde edilen cDNA'lar Real-Time PCR için hazır halde -20 ^{o}C' de saklandı.

3.4.4. Primer dizaynı

Seçilen target gen bölgeleri ve referans gen bölgeleri için kullanılacak olan primerler, Ovis cinsine spesifik olarak mRNA panel olarak çalışıldı. Çalışılacak olan her gen bölgesi için primer seti 96 well platelere gömülü olarak alınan setler kullanıldı. Referans gen olarak GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz) ve ACT- β (Aktin β) kullanıldı.

3.4.5. Real-Time PCR (qPCR)

Sentezlenen cDNA' lar, belirtilen gen bölgeleri için dizayn edilen paneller ile *LightCycler*® 480 SYBR Green I Master kullanılarak Roche LightCycler 480 II cihazı ile çalışıldı. Çalışmada kullanılacak olan her bir primer, spesifik olduğu koyun cDNA'sı ile hazırlanıp cihaza yüklendi. Reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için bileşenlerin her birinden (cDNA hariç) eklendi ve reaksiyon sayısı ile çarpılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Platelere her bir reaksiyon için 17 µl reaksiyon karşımından transfer edildi. 3 µl cDNA örneği her bir kuyucuğa son reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan platelerin üzeri kapatılarak plate santrifüj cihazı ile santrifüj edildip cihaz protokolü ile çalışma yapıldı (Tablo 2).

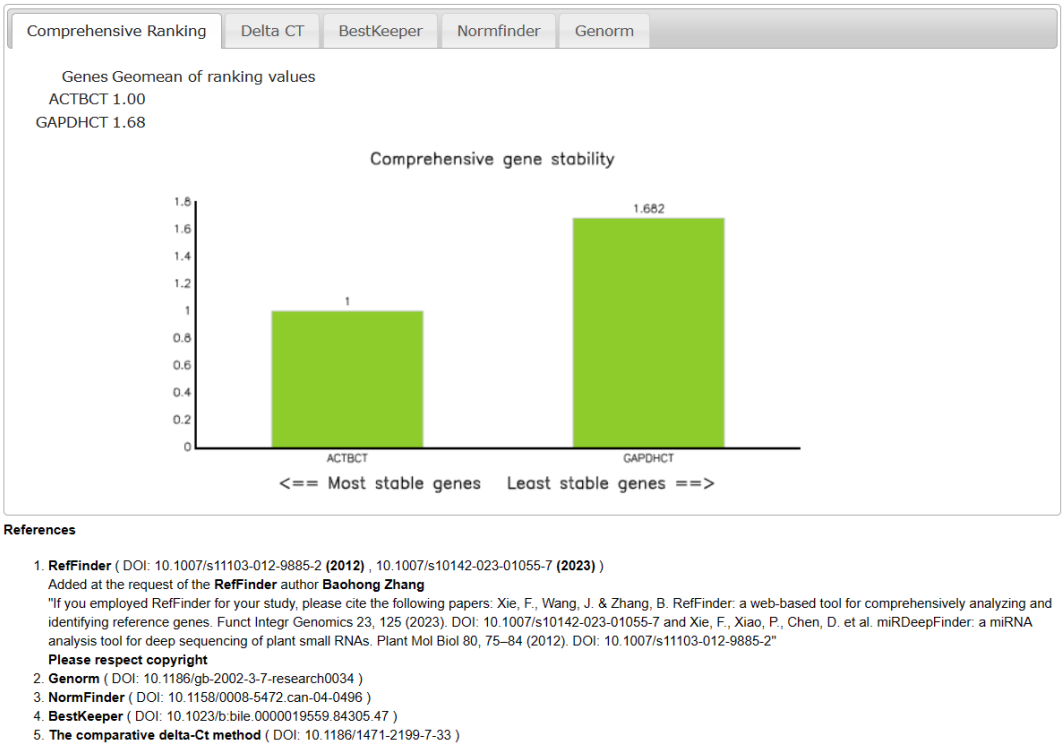
Tablo 2. PCR cihazı termal programı

Program Adı	**PRE-İNKÜBASYON**	**AMPLİFİKASYON**			**MELTING CURVE**			**SOĞUTMA**
Analiz Modu	Yok	Kuantifikasyon Modu			Erime Eğrisi Modu			Yok
Döngü Sayısı	1	45			1			1
Hedef Sıcaklık [°C]	95	95	60	72	95	65	97	40
Süre (sn)	300	10	20	5	5	60	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	-

3.4.6. Real-Time PCR analizi

Real Time PCR analizi sonunda elde edilen veriler absolut ve relative

kantitasyon (Absolute Quantification ve Advanced Relative Quantification) yöntemleri ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlarda relative kantitasyon yapabilmek için target gen Ct değerleri ACT- β (Aktin β) ile normalize edilerek ekspresyon değerleri bulundu. İki aday referans genin güvenilirliği RefFinder online analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3).



Şekil 3. İki aday gen güvenilirliği analizi

3.5. Fertilizasyon İçin Sperma Hazırlanması

Hiperaktif spermatozoonları ayrıştırmak amacıyla kullanılacak olan percoll gradient tekniği için 10 ml deney tüpü hazırlandı. Percoll-SOF gradients %90 ve %45'lik olmak üzere iki tabaka halinde tüplere yerleştirildi. 2 ml 1:1 oranında karıştırılmış percoll-SOF ve HSOF (%45'lik percoll-SOF) konik dipli 10 ml'lik santrifüj tüpü içinde bulunan 2 ml hacmindeki %90'lık percoll-SOF üzerine dikkatlice iki solüsyon karışmayacak şekilde tabakalandırılarak koyuldu. Fertilizasyon amacı ile önceden dondurulmuş sperma kullanıldı. Çözdürülen spermadan 200 µl alınarak, sperma %45'lik percoll solüsyonunu üstüne tabakalandırılarak koyuldu. Sperma

koyulduktan sonra hazırlanmış olan tüpler 1140 g santrifüj gücünde 15 dakika santrifüje edildi. Santrifüj işleminden sonra üstteki percoll tabakaları dikkatli bir şekilde alınıp atıldı. Tüpün dip kısmında spermatozoonlar tarafından oluşturulan pellet tekrar 2 ml HSOF ile sulandırıldı ve 500 g santrifüj gücünde 6 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant alınarak atıldı. Tüpte geriye kalan spermatozoon sayısı belirlendi.

3.6. *In Vitro* Fertilizasyon

In vitro maturasyonu takiben genişlemiş kumulusa sahip olan oositler olgunlaşma ortamından alındı ve kumulus hücreleri ile korana hücreleri HSOF içinde 3–5 dakika hafifçe pipetlenerek uzaklaştırıldı. Oositler kumulus hücreleri uzaklaştırıldıktan sonra %2 sheep serum (SS) destekli bikarbonat tamponlu sentetik ovidukt sıvısı içinde (BSOF) bir kez yıkandı. Temizlenmiş olan oositler üzeri 400 µl mineral yağ ile örtülmüş 500 µl BSOF + SS içeren 4 kuyucuklu petrinin kuyucuklarına aktarılacaktır. Her bir kuyucuk içinde 50 oosit koyuldu. Fertilizasyon petrilerine aktarılan oositler percoll gradient tekniği ile elde edilmiş olan sperma ile fertilize edildi. Fertilizasyon ortamına spermatozoonlar final konsantrasyonu 0,6–1 x 106 sperm/ml olacak şekilde ayarlandı. Fertilizasyon süreci neme doyurulmuş %5 CO_2'li atmosferde ve 39 ºC ve 41 ºC sıcaklıkta 19–21 saat süre ile gerçekleştirildi.

3.7. *In Vitro* Kültür

BSOF + SS ortamında 19–21 saat sürdürülen *in vitro* fertilizasyon işleminden sonra zigot olarak varsayılan hücreler iki kez HSOF içinde yıkandıktan sonra bir kez de SOF içinden geçirildi. Önceden hazırlanmış ve inkübe edilmiş dört kuyucuklu petrilerin her bir bölmesi içine 400 µl mineral yağ ile örtülmüş 500 µl SOF I konuldu. Fertilizasyon ortamından alınıp yıkanarak üzerindeki spermatozoonlardan arındırılmış olan olası zigotlar önceden 39 ºC ve 41 ºC sıcaklıktaki neme doyurulmuş ortamda (%5 CO_2) ekilibre edilmiş petriler içine alındı. Her bir kuyucuk içine 50 hücre koyuldu. İnkübasyonun dördüncü gününde elde edilen embriyolar SOF II stoğa aktarıldı. Embriyonik gelişimler takip edildi.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde SPSS 23 programı kullanıldı. Embriyonik değerlendirmeler Ki Kare testi ile değerlendirildi. Gen ekpresyon değerlendirilmeleri ise One-Way ANOVA ve Tukey testleri ile değerlendirildi. Tüm değerlendirmelerde $P<0,05$ düzeyinin istatiksel fark anlamında önemli olduğu kabul edildi. Çalışmada sonuçların anlamlı olması için hem embriyonik hem de gen ekpresyonlarında her bir grup en az 5 kez tekrarlandı.

3.9. Tez Çalışması Süresince Kullanılan Stok Solüsyonları

Tablo 3. Bikarbonat Stok Solüsyonu

Bikarbonat Stok (B)	
$NaHCO_3$	1,05 g
Milli-Q su son hacim	50 ml

Solüsyon hazırlandıktan sonra 0.22 µm filtreden geçirilip sterilize edildi. 4 ºC sıcaklıktaki buzdalobında muhafaza edildi. (2 Hafta)

Tablo 4. Hepes Stok Solüsyonu

Hepes Stok (H)	
Na Hepes	1,627 g
Hepes (Free Acid)	1,5 g
Milli-Q su son hacim	50 ml

Solüsyon hazırlandıktan sonra 0.22 µm filtreden geçirilip sterilize edildi. 4 ºC sıcaklıktaki buzdalobında muhafaza edildi. (2 Ay)

Tablo 5. Tuz Karışımı Stok Solüsyonu

Tuz Karışımı Stok (S2)	
NaCl	3,147 g
KCl	0,267 g
NaH_2PO_4	0,027 g
Milli-Q su son hacim	50 ml

Solüsyon hazırlandıktan sonra 0.22 µm filtreden geçirilip sterilize edildi. 4 ºC sıcaklıktaki buzdalobında muhafaza edildi. (3 Ay)

Tablo 6. Laktat Stok Solüsyonu

Laktat Stok (L)	
Na Lactate	2,35 ml
Milli-Q su son hacim	50 ml

Solüsyon hazırlandıktan sonra 0.22 µm filtreden geçirilip sterilize edildi. 4 ºC sıcaklıktaki buzdalobında muhafaza edildi. (2 Ay)

Tablo 7. Glükoz Stok Solüsyonu

Glükoz Stok (G)	
Glucose	279 mg
Milli-Q su son hacim	25 ml

Solüsyon hazırlandıktan sonra 0.22 µm filtreden geçirilip sterilize edildi. 4 ºC sıcaklıktaki buzdalobında muhafaza edildi. (2 Ay)

Tablo 8. Kalsiyum Stok Solüsyonu

Kalsiyum Stok (C)	
$CaCl_2.2H_2O$	630 mg
Milli-Q su son hacim	25 ml

Solüsyon hazırlandıktan sonra 0.22 µm filtreden geçirilip sterilize edildi. 4 ºC sıcaklıktaki buzdalobında muhafaza edildi. (3 Ay)

Tablo 9. Magnezyum Stok Solüsyonu

Magnezyum Stok (M)	
$MgCl_2.6H_2O$	250 mg
Milli-Q su son hacim	25 ml

Solüsyon hazırlandıktan sonra 0.22 µm filtreden geçirilip sterilize edildi.
4 ºC sıcaklıktaki buzdalobında muhafaza edildi. (3 Ay)

Tablo 10. Antibiyotik Stok Solüsyonu

Antibiyotik Stok (PS)	
Penicilin	187,5 mg
Hepes (Free Acid)	125 mg
Milli-Q su son hacim	25 ml

Solüsyon hazırlandıktan sonra 0.22 µm filtreden geçirilip sterilize edildi. 500 µl'lik hacimlere bölünüp ependorları içinde -20 ºC sıcaklıkta derin dondurucuda muhazafa edildi.

Tablo 11. Percoll SOF Solüsyonu Hazırlanması

Percoll SOF Solüsyonu	
S2 Stok	5 ml
Na Hepes	137 mg
Hepes (Free Acid)	126 mg
D Stok	0,5 ml
M Stok	0,5 ml
Percoll	50 ml

Percoll-SOF'un pH'sı 7,2-7,4, osmotik basıncı 280-300 mOsmol/kg'a ayarlandı. Filtre edilmeden 4ºC sıcaklıktaki buzdolabında 1 ay boyunca muhafaza edilerek kullanıldı.

3.10. Çalışması Süresince Kullanılan Medyumlar

Tablo 12. Oosit Yıkama Medyumu Hazırlanışı

Oosit Yıkama Medyumu	
TCM 199	2,475 g
H Stok	21 ml
B Stok	4 ml
Kanamisin	19 mg
Heparin	2,5 mg
Milli-Q su son hacim	250 ml

Hazırlanan solüsyon 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. 4ºC sıcaklıktaki buzdolabında muhafaza edilerek 3 ay kullanıldı. Oosit elde edilmesi sırasında kullanılacak bu medyum, uygulama yapılmadan bir saat önce buzdolabından çıkartıldı ve içerisine 300 mg/100 ml oranında BSA Fract V ve % 1 oranında PS ilave edildi. Medyumun ozmotik basıncı 283±10 mOsmol/kg'a, pH'sı 7,2–7,4'e, ayarlanarak 0.22 µm filtreden geçirildi ve 37ºC sıcaklıktaki etüv de kullanılana kadar bekletildi.

Tablo 13. Oosit Olgunlaştırma Medyumu Hazırlanışı

Oosit Olgunlaştırma Medyumu	
TCM 199	95 mg
$NaHCO_3$	22 mg
Milli-Q su son hacim	10 ml
Karışımdan 9 ml alınarak aşağıda bulunan kimyasallar ilave edildi	
FSS	1 ml
Na Pyruvat	0,33 mg
Gentamisin	0,55 mg
FSH	10 µg/ml
LH	25 µg/ml
EGF	25 µg/ml
Melatonin*	10^{-7}M

*Melatonin sadece çalışma gruplarına eklendi. Hazırlanan solüsyonun pH'sı 7,9'a ozmotik basıncı 283±10 mOsmol/kg'a ayarlandı ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. Oositleri aktarmadan en az 6 saat önce 39ºC sıcaklık ve %5 CO_2 ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Medyum günlük olarak hazırlandı ve kullanıldı.

Tablo 14. Hepes Tamponlu SOF Medyumu Hazırlanışı

Hepes Tamponlu Sof Solüsyonu (HSOF)	
S2 Stok	5 ml
H Stok	4,2 ml
B Stok	0,8 ml
D Stok	0,5 ml
M Stok	0,5 ml
L Stok	0,5 ml
G Stok	2 ml
PS Stok	0,5 ml
Na Pyruvate	1,8 mg
Glutamine	0,250 µl
BSA (Fraction V)	150 mg
Kanamisin	3,8 mg
Milli Q Su	50 ml
Phenol Red	0,5 mg

pH'sı 7,2-7,4, osmotik basıncı 283±10 mOsmol/kg'a ayarlandı. 0.22 µm filtreden geçirildi. 4ºC sıcaklıktaki buzdolabında 1 ay boyunca muhafaza edilerek kullanıldı.

Tablo 15. *In Vitro* Fertilizasyon Medyumu Hazırlanışı

In Vitro Fertilizasyon Solüsyonu (BSOF)	
S2 Stok	1 ml
B Stok	1 ml
D Stok	0,2 ml
M Stok	0,1 ml
L Stok	0,3 ml
PS Stok	0,1 ml
Na Pyruvate	1,08 mg
Glutamine	50 µl
Kanamisin	3,8 mg
Milli Q Su	50 ml

Hazırlanan solüsyondan 40 µl çıkartıldı ve 40 µl PHE, heparin, sperma ilave edildi. PH'sı 7,9'a ozmotik basıncı 283±10 mOsmol/kg'a ayarlandı ve 0,22µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. Oositleri aktarmadan en az 6 saat önce 39 ºC sıcaklık ve %5 CO_2 ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Medyum günlük olarak hazırlandı ve kullanıldı.

Tablo 16. *In Vitro* Kültür I Medyumu Hazırlanışı

In Vitro Kültür Solüsyonu (SOF-I)	
S2 Stok	1 ml
B Stok	1 ml
D Stok	0,1 ml
M Stok	0,1 ml
L Stok	0,1 ml
PS Stok	0,1 ml
Na Pyruvate	0,36 mg
Glutamine	15,8 µl
Kanamisin	0,8 mg
Phenol Red	0,1 mg
BSA (Fatyy Acid Free)	40 mg
MEM-amino asit	200 µl
MEM-non esansiyel	100 µl
Amino asit	
Milli Q Su	10 ml

Medyumun ozmotik basıncı 283±10 mOsmol/kg'a, pH'sı 7,9'a ayarlanarak 0.22 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Oositleri aktarmadan en az 6 saat önce 39ºC sıcaklık ve %5 CO2 ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Medyum günlük olarak hazırlandı ve kullanıldı.

Tablo 17. *In Vitro* Kültür II Medyumu Hazırlanışı

In Vitro Kültür Solüsyonu (SOF-II)	
S2 Stok	1 ml
B Stok	1 ml
D Stok	0,1 ml
M Stok	0,1 ml
L Stok	0,1 ml
PS Stok	0,1 ml
Na Pyruvate	0,36 mg
Glutamine	15,8 µl
Kanamisin	0,8 mg
Phenol Red	0,1 mg
MEM-amino asit	200 µl
MEM-non esansiyel	100 µl
Amino asit	
Milli Q Su	10 ml

Karışımdan 500 µl çıkartıldı ve 500 µl FCS ve 240 µl G STOK eklendi. Medyumun ozmotik basıncı 283±10 mOsmol/kg'a, pH'sı 7,9'a ayarlanarak 0.22 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Oositleri aktarmadan en az 6 saat önce 39ºC sıcaklık ve %5 CO2 ayarlı inkübatörde inkübe edildi. Medyum günlük olarak hazırlandı ve kullanıldı.

Tablo 18. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sarf Malzeme Adı	Marka
Follicle Stimulating Hormone (FSH) From Ovine Pituitaries	Sigma
Luteinizing hormone from ovine pituitaries	Sigma
Fötal Sheep Serum 500 ml	Sigma
Bovine Serum Albumin Fraction V Fatty Acid Free 5 g	Sigma
Bovine Serum Albumin Fraction V 50 g	Sigma
Medium 199 powder	Sigma
Medium 199 liquid 100 ml	Sigma
MEM Aminoacid Solution(50x) 100 ml	Sigma
MEM Non Essential Aminoacid Solution(100x) 100 ml	Sigma
Hyaluronidase 30 mg	Sigma
Heparin	Sigma
Di-Sodium Hydrogen Phosphate (Na2HPO4) 500 g	Sigma
Sodium phosphate dibasic dihydrate (Na2HPO4.2H2O)	Sigma
Potassium hydrogen phosphate (KH2PO4) 100g	Sigma
Sodyum Klorür (NaCl) 500 g	Sigma
KCl cell culture tested	Sigma
NaH2PO4 anhidrous	Sigma
Glucose Anhydrous 100 g	Sigma
Sodium Lactat syrup %60 (w/w) embryo tested	Sigma
Embryo Tested Water 500ml	Sigma
Percoll 500 ml	Sigma
Mineral Oil Embryo Tested 1lt	Sigma
Gentamicin Sülfate 50 mg	Sigma
Kanamycin Monosulfate	Sigma
Penicilin G 10.000.000 units	Sigma
Penicillin -Streptomycin Solution (100 x) 100 ml	Sigma
Calium Chloride dihydrate cell culture tested	Sigma
MgCl2.6H2O	Sigma
Na- HEPES cell culture tested	Sigma
Na-Pyruvat	Sigma
Hepes (free acid) (Embryo tested)	Sigma
Melatonin	Sigma
TriPure Isolation Reagent	Roche
Isopropanol	Merck
EtOH	Merck
Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Thermo
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche
Custom LNA mRNA Panels	Qiagen
Filtreli pipet uçları (10,100,1000 µl)	ISOLAB
0,2 mL PCR tüpü	Thermo
1,5 mL steril mikrosantrifüj tüpü	ISOLAB
MagNA Lyser Green Beads	Roche

4. BULGULAR

In vitro maturasyon ortamda kullanılan oositler üzerine yapılan çalışmada kültür ortamına maturasyon zamanında farklı sıcaklılarda eklenen melatonin dozu *in vitro* fertilizasyon ve blastosist oluşumu üzerine olan etkisinin incelenmesi amacıyla 4 farklı grup oluşturuldu. G39 ve G41 kontrol grupları, G39M ve G41M 10^{-7} M melatonin içeren *in vitro* maturasyon medyumları kullanılarak *in vitro* fertilizasyon ve blastosist üzerine etkileri incelendi. Tüm gruplarından elde edilen maturasyon sonrası oositler melatoninin sitoplazmik olgunlaşma, kumulus genişlemesi, sıcaklık stresi ve mitokondriyal fonksiyonlarına ilişkin gen ekspresyonları incelenerek maturasyon sonrası sıcaklık stresi, ROS gelişiminin güçlü antioksidan özelliği olan melatonin bağlantısı incelendi (Şekil 4; Şekil 5). Aynı zamanda elde edilen oositlerin Bax, Bcl-2 gibi apoptoz faktörlerinin ekspresyon düzeyleri de incelenerek melatoninin bu faktörler üzerine etki edip etmediği araştırıldı. Maturasyon sonrası alınan oositler tüm gruplarda biyolojik tekrar yapılarak elde edildi. RNA izolasyonları çok sayıda oositten elde edilerek gerçek zamanlı PCR işlemleri yapılmış ve her bir örneğe 3 PCR tekrarı yapıldı. Normalizasyonlar GAPDH ve ACT- β ekspresyonuna göre düzenlendi. Bağıl ekspresyonlar da kontrol grubuna (0 melatonin) göre normalize edilerek yorumlandı. *In vitro* maturasyon için çalışmada G39 için 440, G39M için 438, G41 için 438, G41M için de 358 oosit kullanıldı. Toplamda 1676 oosit kullanıldı. Maturasyon sonrası her gruptan 100 adet oosit gen ekspresyon analizi için alındı. Geriye kalan mature oosit sayıları, bölünen hücre, marula, blastosist hücre sayıları sonuçları Tablo 19′da verildi.

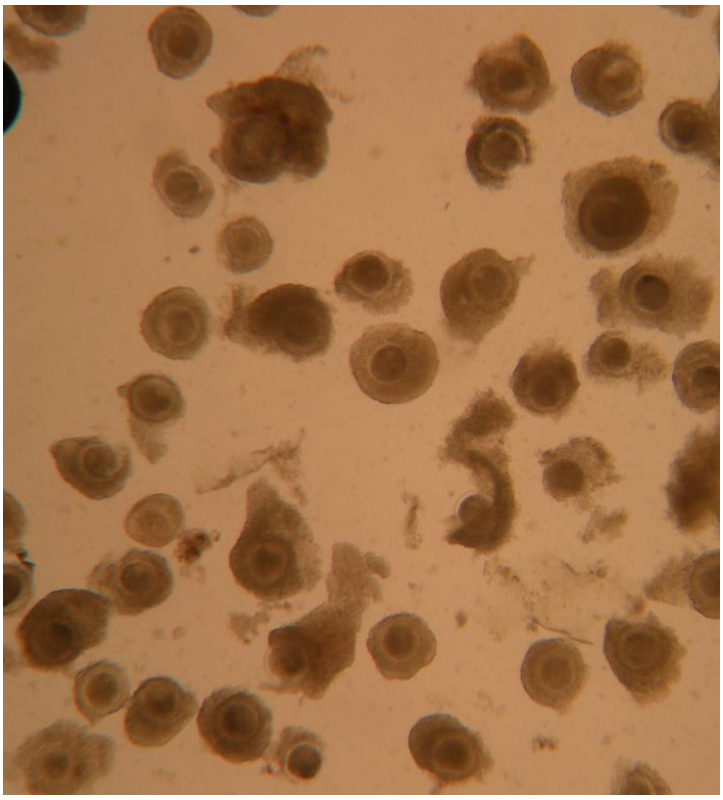
Tablo 19. *In Vitro* Fertilizasyon sonucunda elde edilen değerler

Grup	n	Bölünme %	Morula %	Blastosist %
G39	338(5)	102^{a} (%30)	36^{a} (%35,30)	16^{a} (%15,68)
G39M	340(5)	136^{b} (%40,23)	62^{b} (%45,69)	28^{b} (%20,59)
G41	138(5)	29^{c} (%21,01)	4^{c} (%2,89)	0^{c} (%0)
G41M	258(5)	85^{a} (%32,94)	29^{a} (%34,12)	14^{a} (%16,48)

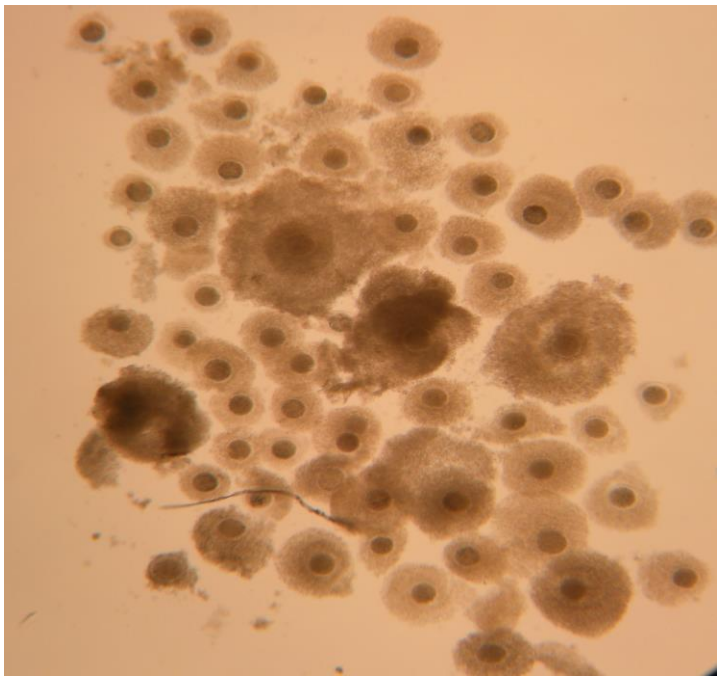
a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası fark önemlidir ($P<0.05$)
n: Maturasyon sonrası mature olup fertilizasyona alınan oosit sayısı

4.1. *In Vitro* Fertilizasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

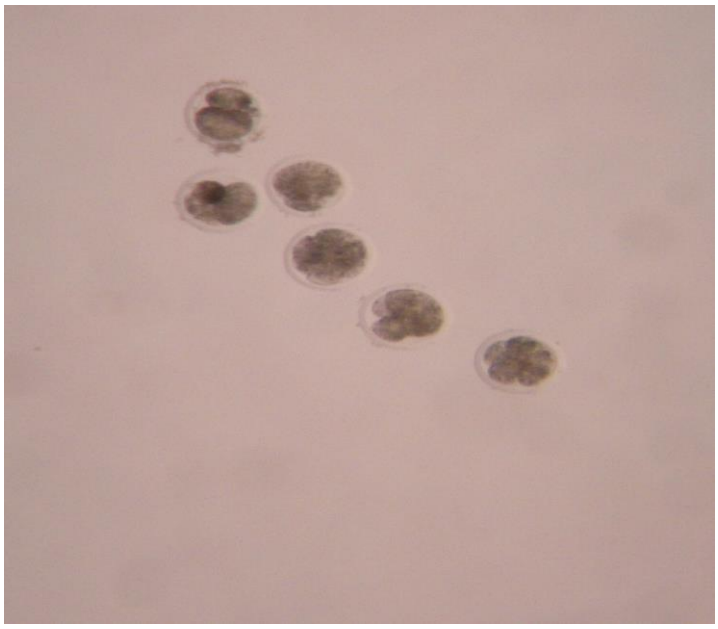
Oositlerin IVM aşamasında melatonin ile muamelesinin bölünme ve blastosist oranlarına olan etkileri incelendi. Bu amaçla IVM ortamına 2 farklı sıcaklıkta melatonin eklendi. Bölünme oranları kıyaslandığında en yüksek oran G39M ile G41M ve en düşük değer G41 elde edildi ve istatiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($P<0.05$). Morula oranlarında ise en yüksek değer G39M gözlenirken en düşük değer G41elde edildi ($P<0.05$; Şekil 6). Elde edilen blastosist (Şekil 7) oranları en iyi G39M de elde edildi. Buna göre melatonin sıcaklık stresinde bölünme ve marula aşamasında etki gösterirken blastosit aşamasında anlamlı ölçüde azalma olmuştur ($P<0,05$).



Şekil 4. Slicing Sonrası Seçilmiş Oositlerin Görüntüsü



Şekil 5. Mature Olmuş Oositlerin Görüntüsü



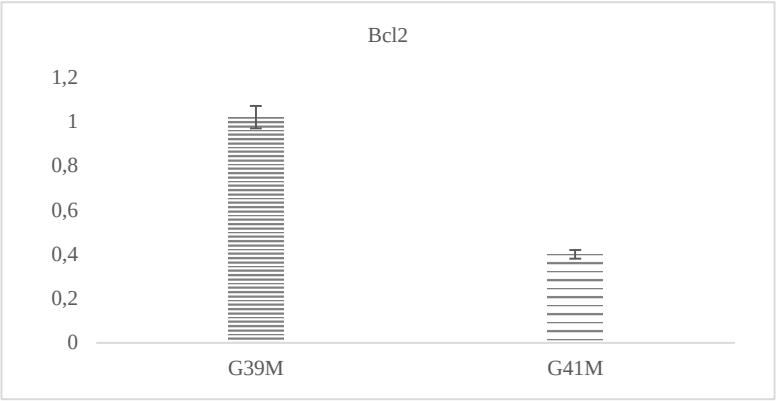
Şekil 6. *In vitro* Kültürün Farklı Aşamalarındaki Embriyolar

Şekil 7. Kültürün 7. Günü Expanding Blastosist

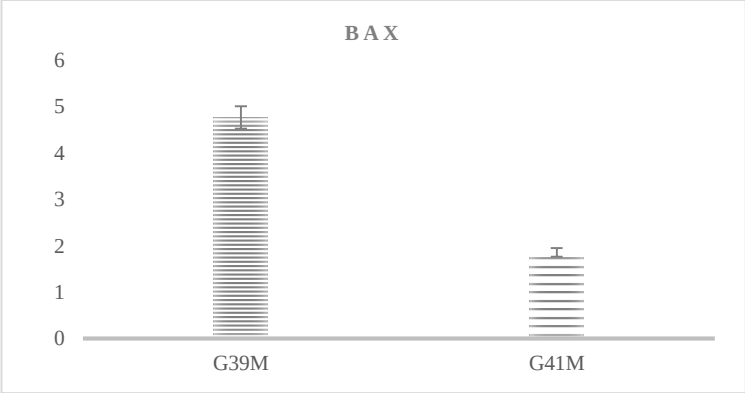
4.2. Gen Ekspresyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

4.2.1. Anti apoptotik gen ekspresyon sonuçları

Apoptoz yollarının entegrasyonu, anti-apoptotik BCL-2 ve Pro-apoptotik BAX, üyeleriyle BCL-2 protein ailesinin fonksiyonunda karmaşık bir dengeye bağlıdır. Çalışmamızda yapmış olduğumuz değerlendirmeler sonucunda BAX gen düzeyinde istatiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($P<0,05$). Bcl2 geni ise yukarı doğru regüle olmuş olup anlamlı bir fark çıkmamıştır. Gruplara ait gen ekpresyon değerleri grafiksel olarak verilmiştir (Grafik 1-2).



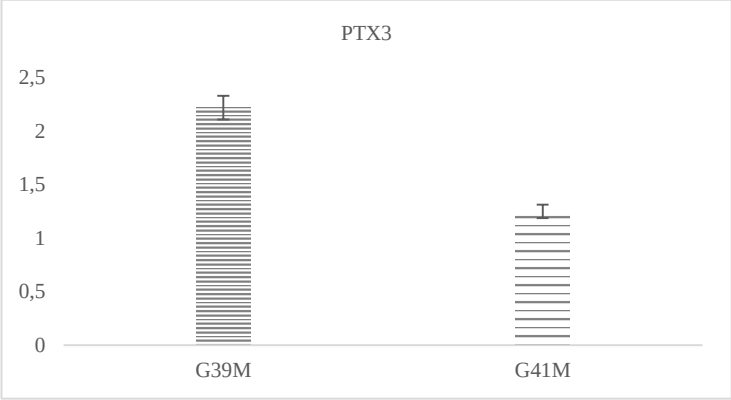
Grafik 1. Gruplara ait Bcl2 genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. G39M, G39 ile G41M, G41 ile karşılaştırılmış olup aralarında fark yoktur (P> 0,05).



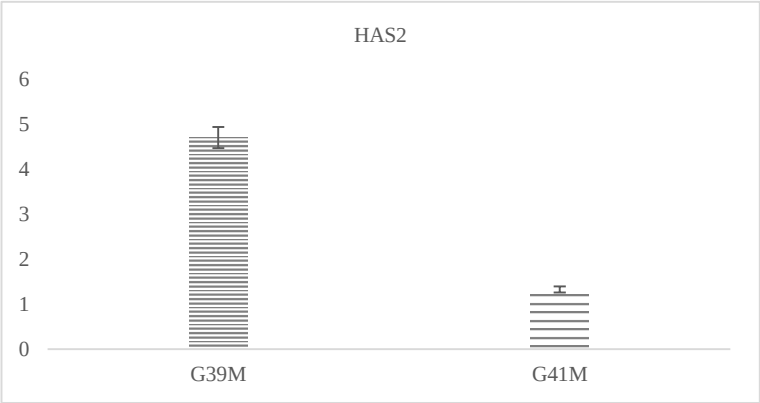
Grafik 2. Gruplara ait BAX genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. G39M, G39 ile G41M, G41 ile karşılaştırılmış olup aralarındaki fark anlamlıdır (P< 0,05).

4.2.2. Kumulus hücrelerinde embriyo gelişimi ile ilgili gen ekspresyonları

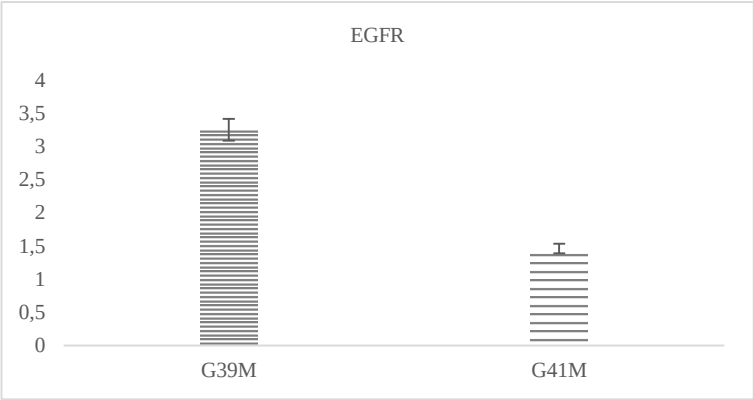
Çalışma gruplarında oositlerde PTX3 (pentraksin 3), HAS2 (hyaluronan sentaz 2) ve EGFR'nin (epidermal büyüme faktörü reseptörü) gen ifadeleri kumulus hücre genişlemesindeki melatonin tedavisi ile yukarı regüle edilirken (P <0.05), melatonin FSHR (folikül uyarıcı hormon reseptörü) veya LHR (lüteinizan hormon reseptörü) ekspresyonları üzerinde anlamlı bir etkiye sahip değildi (Grafik 3-7).



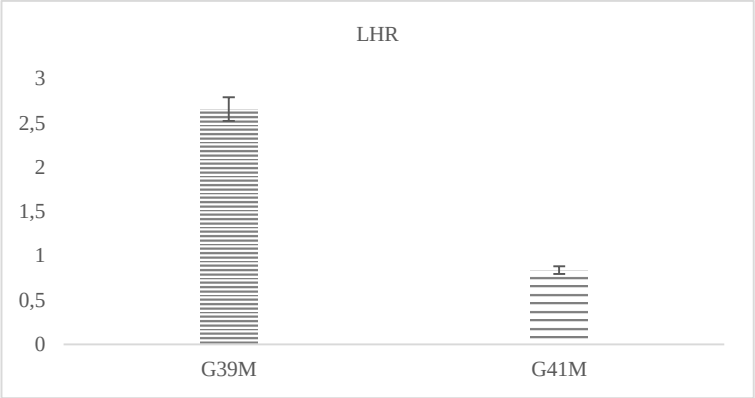
Grafik 3. Gruplara ait PTX3 genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. G39M, G39 ile G41M, G41 ile karşılaştırılmış olup aralarındaki fark anlamlıdır (P< 0,05).



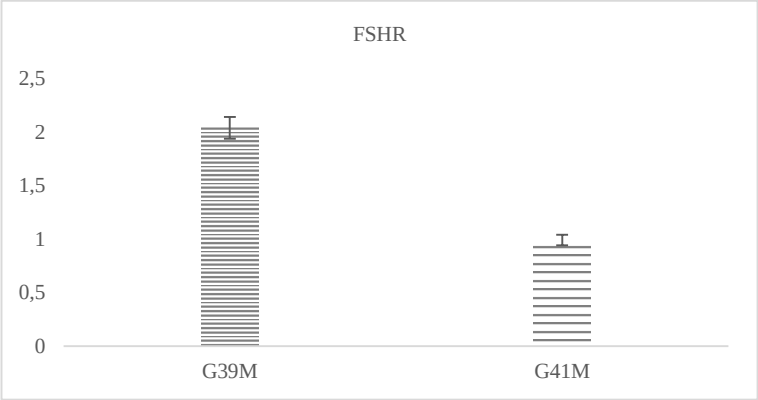
Grafik 4. Gruplara ait HAS2 genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. G39M, G39 ile G41M, G41 ile karşılaştırılmış olup aralarındaki fark anlamlıdır (P< 0,05).



Grafik 5. Gruplara ait EGFR genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. G39M, G39 ile G41M, G41 ile karşılaştırılmış olup aralarındaki fark anlamlıdır (P< 0,05).



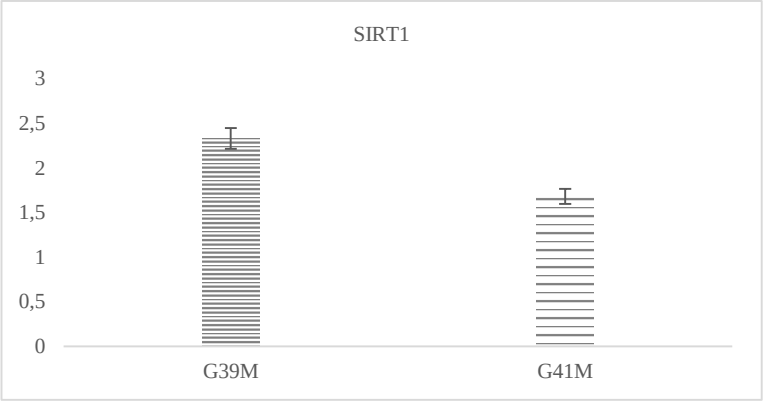
Grafik 6. Gruplara ait LHR genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. G39M, G39 ile G41M, G41 ile karşılaştırılmış olup aralarında fark yoktur (P> 0,05).



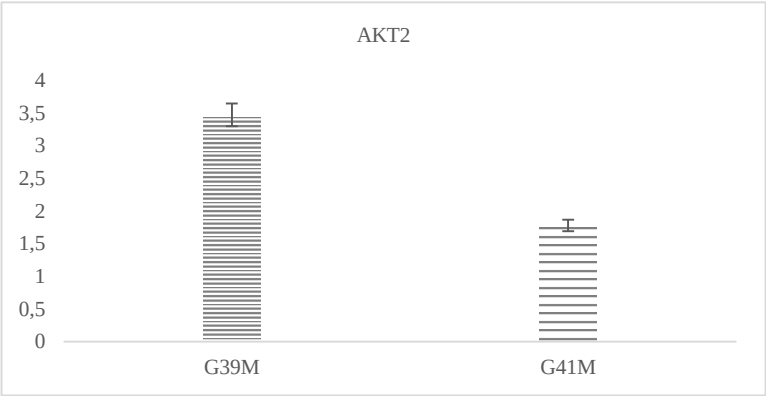
Grafik 7. Gruplara ait FSHR genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. G39M, G39 ile G41M, G41 ile karşılaştırılmış olup aralarında fark yoktur (P> 0,05).

4.2.3. Mitokondri fonksiyonları ile ilgili genlerin ekspresyonu

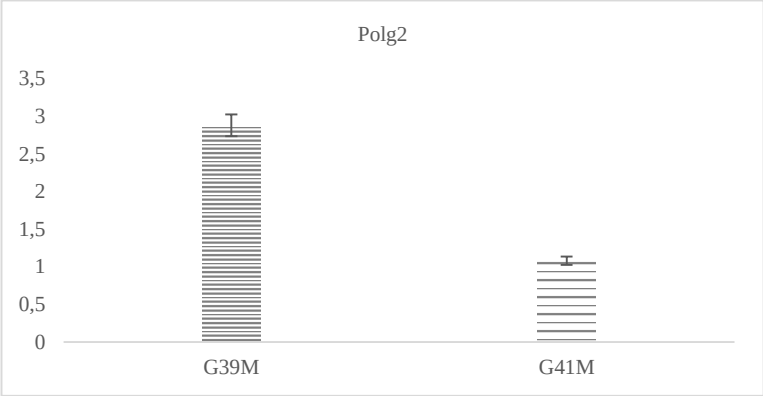
Mitokondriyal fonksiyonların maturasyon ortamında sıcaklık stresine bağlı etkileri üç gen ele alınarak incelenmiştir. SIRT1, AKT2 ve Polg2 genleri melatonin tedavisi ile yukarı regüle olmuşlardır (P <0.05), ekspresyonları mitokondriyal işlevi koruma üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmuşlardır (Grafik 8, Grafik 9, Grafik 10).



Grafik 8. Gruplara ait SIRT1 genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. G39M, G39 ile G41M, G41 ile karşılaştırılmış olup aralarındaki fark anlamlıdır (P< 0,05).



Grafik 9. Gruplara ait AKT2 genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. G39M, G39 ile G41M, G41 ile karşılaştırılmış olup aralarındaki fark anlamlıdır (P< 0,05).



Grafik 10. Gruplara ait Polg2 genine ait relatif mRNA ekspresyon değerleri. G39M, G39 ile G41M, G41 ile karşılaştırılmış olup aralarındaki fark anlamlıdır (P< 0,05).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde biyoteknolojik yöntemler kullanarak hayvan ıslahını hızlandırmak ve hayvanların verim düzeylerini artırmak mümkün görülmektedir. Hayvan üreme biyoteknolojisinde spermanın dondurulması, *in vitro* fertilizasyon ile embriyo üretimi ve spermanın fertilizasyon yeteneğinin değerlendirilmesi, suni tohumlama yoluyla dişi hayvanların gebe bırakılması önemli yer tutmaktadır. Bu uygulamalardan, suni tohumlama, embriyo transferi, klonlama ve *in vitro* fertilizasyon (IVF) tekniği ile istenilen özelliklerde doğal üremeye göre daha fazla sayıda yavru elde edilebilmektedir. Bu teknikler nesli kaybolmak üzere olan hayvanların korunmasında ve yeniden canlandırılmasında da önemli bir yere sahiptir (Byrd ve ark., 1997). Özellikle *in vitro* fertilizasyon tekniği ile seksüel olgunluğa ulaşmamış genç hayvanlarda olduğu gibi, mezbahaya zorunlu olarak sevk edilen değerli hayvanlardan da yararlanılabilmektedir.

Koyun yetiştiriciliğinde üretimin artırılması, hayvan başına elde edilen verimlerin yükseltilmesiyle gerçekleştirilebilir. Türkiye'de koyunların birçoğu genetik kapasiteleri dar, düşük verimli yerli ırklardan oluşmaktadır. Mevcut olan koyun varlığı bilimsel, modern uygulamalardan yoksun daha çok geleneklere bağlı idare altındadır. Türkiye'de koyunlardan elde edilen toplam et, süt ve yapağı miktarı genetik yapının ve çevrenin iyileştirilmesiyle çok önemli miktarda artırılabilir. Bu durum koyunculuğun ülke ekonomisinde önemini sürdüreceğinin bir göstergesidir (Kaymakçı, & Sönmez, 1992). Koyun ıslahında hızlı genetik ilerlemenin sağlanabilmesi için genetik özellikleri bilinen ve bu genetik özelliklerini başarılı bir şekilde yavrularına aktarabilen koyunların oositleri toplanıp, aynı özelliklere sahip koçların spermaları ile kaliteli embriyolar elde etmek ile mümkündür. Bu sebeple *in vitro* embriyo üretiminde başarılı sonuçlar elde etmek için en uygun kültür ortamlarının belirlenip geliştirilmesi zorunludur. Embriyoların *in vitro* üretimi, dünya çapında giderek daha fazla uygulanmaktadır ve son yapılan kayıtlara göre 2010 yılında üretilen sığır embriyolarının üçte biri *in vitro* olarak elde edilmiştir (Stroud, 2011). Oositlerin *in vitro* olgunlaşması, *in vitro* embriyo sürecindeki en önemli adımlardan biridir ve bu sürecin başarısı için çok önemlidir (Adona, Pires, Quetglas, Schwarz, & Leal, 2008; Lee, Jung, & Seo, 2016).

Yardımcı üreme teknikleri *in vitro* olgunlaşma, döllenme ve embriyo kültürü

protokolleri son on yılda büyük ölçüde iyileştirilmiştir. Fakat buna rağmen üretilen sadece birkaç embriyo gelişimini tam olarak gerçekleştirilebilmiştir. Bunun başlıca nedeni, in vivo koşulları taklit edemeyen optimal *in vitro* koşulların tam olarak sağlanamaması, bu da her iki koşul arasında artan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) farklılığa yol açmaktadır. (Agarwal, Said, Bedaiwy, Banerjee, & Alvarez, 2006).

Koyunların östrusta maruz kaldıkları ısı stresi, döllenmeden sonra gelişim için oosit verimliliğini azaltmaktadır (Putney, Drost, & Thatcher, 1988). Bu ısı stresi etkisi, olgunlaşan oositin mitokondriyal işlevini bozabilir (Rodrigues ve ark., 2016; Payton ve ark., 2018), yeterli nükleer olgunlaşmasının tamamlanmasını azaltabilir (de Castro e Paula & Hansen, 2007; Meiyu, Liu, & Roth, 2015; Roth, & Hansen, 2004; Roth, & Hansen, 2005) ve oluşan embriyoların blastosist aşamasına gelmesini tehlikeye atabilmektedir (Nabenishi ve ark., 2012; Rodriques ve ark., 2016; Roth, & Hansen, 2004). Aynı zamanda *in vitro* embriyo üretiminde sıcaklık stresinin önemli etkileri bulunmaktadır. Bu etkilerden biri, ROS üretiminin aşırı olarak artması ve glutatyon (GSH) içeriğini düşürmesi nedeniyle oksidatif stresin meydana gelmesidir (Li ve ark., 2015). Oksidatif stres, hücrelerin normal fizyolojik işlevlerini tehlikeye atan, hücre içi yapının bozulmasına neden olan ve sonunda hücre ölümüne yol açan en yaygın faktörlerden biridir. Bu nedenle *in vitro* ve *in vivo* koşullarda oosit olgunlaşmasını olumsuz etkiler (Li ve ark., 2015). Sıcaklık stresi, oositi çevreleyen kumulus hücrelerinin hem nükleer hem de sitoplazmik olgunlaşmasını ve işlevini bozmakta, apoptozu indüklemekte ve mitokondriyal aktiviteyi azaltmaktadır (Hansen, 2009; He ve ark., 2016; Nabenishi ve ark., 2012; Roth, 2008).

Glutatyon, *in vitro* olgunlaşma sürecini oksidatif stresten koruyan başlıca serbest tiyol olan non-protein sülfhidril kimyasallarından biridir (Meister, 1983; Tatemoto, Ootaki, Shigeta, & Muto, 2001). Güçlü ve sıkı kumulus hücrelerinin, *in vitro* olgunlaşma sürecinde glutatyon (GSH) sentezlediği bilinmektedir ve bu sentezlenen GSH, ardından oositlerin ooplazmasında birikir (Yoshida, Ishigaki, Nagai, Chikyu, & Pursel, 1993). Ovaryumda oositin büyümesi ve olgunlaşması sırasında, glutatyon içeriği, oositin ovulasyon zamanına yaklaştıkça artmaya başlar (Perreault, Barbee, & Slott, 1988). Döllenmeden sonra, GSH, oosit aktivitesi ile birlikte, spermin ve sperm başının erkek pronukleusuna dönüşüm sürecine katkıda bulunur. Öte yandan, GSH,

amino asit taşıma, protein sentezi, disülfit seviyesinin düşürülmesi ve oksidatif hasara karşı savunma gibi birçok mekanizmaya katkıda bulunur. İn vitro olgunlaşma, döllenme ve embriyo gelişimi sırasında oositleri/embriyoları oksidatif hasara karşı korumak için antioksidanların takviye edilmesi gerekmektedir.

Yapılan çalışmaların sonuçları genel olarak embriyo kültürlerine antioksidan eklemenin faydalı olduğunu göstermektedir. Klinik etkileri üzerinde çalışılan antioksidanların uygulanmasına ilişkin daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. İn vitro üretilen embriyo sayısının artmasıyla birlikte, *in vitro* embriyo üretim sistemlerinin ve antioksidan takviyesinin *in vitro* olgunlaşma ve embriyo üretim kültür sistemlerinin optimizasyonunun önemi artacaktır. Sığırlarda *in vitro* embriyo üretiminin önemi artarken, küçük ruminat hayvanlarda *in vitro* embriyo üretiminin önemi de artmakta ve bu konuda yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Dünya genelinde iklim değişikliği ve pandemi gibi nedenlerle ortaya çıkan gıda sıkıntısı bu çalışmaları zorunlu kılmaktadır. Dolayısıyla, küçük ruminant hayvanlarda *in vitro* oosit olgunlaşma ve embriyo kültür sistemlerine antioksidan takviyelerinin eklenmesi önemini koruyacaktır. Görünüşe göre, antioksidanlar gelecekte de uzun bir süre boyunca araştırılmaya devam edeceklerdir. Buradaki önemli nokta, sadece antioksidan olarak bilinen bileşiklerle çalışmak değil, aynı zamanda doğada, bitkilerde veya diğer kaynaklarda bulunan bileşiklerin antioksidan etkilerini keşfetmektir. Öte yandan, araştırılacak antioksidan hakkında önceden bir fikre sahip olmak da önemlidir. Antioksidanın ucuzluğu, benzersiz etkileri, yan etkileri ve araştırılacak alan için uygunluğu da ön araştırmalara tabi tutulmalıdır. Çeşitli çalışmalarda, antioksidan takviyesinin etkisi araştırılmış ve olumlu veriler elde edilmiştir (Perreault ve ark., 1988; Yoshida, Ishigaki, & Pursel, 1992; Yoshida ve ark., 1993).

Embriyoların *in vitro* üretimi sırasında, oositleri ve embriyoları zararlı etkilerden korumak için çeşitli enzimatik ve non-enzimatik ROS-RNS temizleyicileri kullanılır. Pineal bez tarafından salgılanan bir triptofan türevi olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) kolayca bulunabilen bir antioksidan ve anti-apoptotik ajan olup; radikalleri ve türevlerini temizler, antioksitatif enzimleri uyarır, GSH seviyelerini yükseltir (Li ve ark., 2015), hücreler ve organlarda pro-oksidatif enzimleri inhibe eder (Galano, Tan, & Reiter, 2011). Melatonin aynı zamanda mitokondriyal hedefli bir antioksidandır ve ROS'u temizleyerek, mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneğini

inhibe ederek ve proteinleri aktive ederek mitokondriyi korur (He ve ark., 2016; Tan, Manchester, Terron, Flores, & Reiter, 2007). Diğer serbest radikal temizleyicilerle karşılaştırıldığında melatonin, suda ve lipidlerde çözünürlüğü nedeniyle daha evrenseldir (Herdeland, 2005; Do ve ark., 2015). Melatonin (N-aseyl-5-metoksitriptamin) serbest radikal temizleyici, antioksidan ve anti-apoptotik olarak iyi bilinmektedir (Chen ve ark., 2006). Melatoninin serbest radikal temizleme aktivitesi, N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramin ve N-asetil-5-metoksikinuramin gibi metabolitlerine de uzanır. Bu metabolitler, antioksidan enzimleri yukarı düzenlerken pro-oksidatif ve proinflamatuar enzimleri aşağı düzenleyerek melatonini, düşük konsantrasyonlarda bile organizmaları oksidatif stresten korumada son derece etkili hale getirir (Tan ve ark., 2007).

In vitro fertilizasyon aşamaları uygulandıktan sonra bölünmüş olan embriyoların morula ve blastosist dönemine ulaşma oranları günümüzde halen istenilen düzeyde değildir. IVM sonrası embriyonik gelişim oranını IVF ve IVM koşulları belirler. Fertilizasyonda etkin rol oynayan spermatozoa ve oosit kalitesi de embriyonik gelişim üzerine etkilidir. Fertilize olmuş her oosit embriyonik gelişimin ileri aşamaları olan morula ve blastosist aşamalarına ulaşamaz. Koyunlarda fertilize olmuş oositlerin %2 ile %54 oranında morula aşamasına, %0 ve %43 oranında blastosist aşamasına ulaşabildiklerini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Son birkaç yılda memeli embriyolarının *in vitro* kültürü için çeşitli serbest radikal temizleme sistemleri incelenmiştir (Poleszczuk, & Papis kwenta-Muchalska, 2005) ve bir ROS temizleyici olarak melatonin, fare, domuz ve sığır embriyo gelişiminin *in vitro* olarak teşvik edilmesinde test edilmiştir (Chan, & Ng, 1994; Ishizuka, Kuribayashi, Murai, Amemiya, & Itoh, 2000; Poleszczuk, & Papis kwenta-Muchalska, 2005). Ancak, melatoninin embriyo gelişimi üzerindeki doğrudan etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Bir başka çalışmada Iwata (2003) tarafından yapılan çalışmaya göre, süperoksit dismutaz ve dimetil-thiourea gibi bazı antioksidanların oosit aspirasyonu sırasında kullanılması embriyo üretimi için faydalı etkiler göstermiştir (Iwata, Ohota, & Hashimoto Snagai, 2003). Diğer çalışmanın sonuçları, melatoninin 10^{-9} M konsantrasyonların da kültür ortamına eklenmesini, domuz embriyolarının *in vitro* üretimi (IVP) için eklenen melatoninin, bölünme oranı ve blastosist hücre sayıları

üzerinde belirgin bir olumlu etkisi olduğu gözlemlenmiştir. (Rodriguez-Osorio, Kim, Wang, Kaya, & Memili, 2007)

Domuz embriyolarında yapılan bir başka çalışmada melatoninin sıcaklık stresine karşı kumulusların genişlemesi, bölünme oranları ve embriyoların blastosit oranları araştırılmış ve sonuç olarak olumlu etkisi görülmüştür (Rodriguez-Osorio ve ark., 2007). Tez çalışmamızda morula aşamasına ulaşan oosit oranı bakımından 39 °C M içeren grubun (%45,69) diğer gruplara göre daha üstün olduğu gözlendi ($P<0.05$). 41 °C M (%34,12) ve 39 °C K (%35,30) içeren gruplarda elde edilen morula oranı birbirine benzer bulundu. En düşük morula oranı ise 41 °C K içeren grupta (%2,89) elde edildi. Sonuç olarak yapılan çalışma neticesinde melatoninin koyun embriyolarının olgunlaşması, fertilizasyon sonrasında bölünme oranları ve blastosit oranlarını olumlu yönde etkilediği ve diğer çalışmalardan yüksek oranda olduğu belirlenmiştir.

Memeli kumulus hücreleri, oosit büyümesi ve olgunlaşması sırasında çok önemli bir rol oynar. Kumulus hücrelerinin genişlemesi oosit olgunlaşması için önemli bir belirteç olarak kabul edilir (Chen ve ark., 1990; Qian, Shi, Ding, Sha, & Fan, 2003) ve bu nedenle fertilizasyon, sonraki bölünme ve blastosist gelişimi için gereklidir (Gutnisky ve ark., 2007). Oosit gelişimi için besin (Eppig, 1982; Haghighat, & VanWinkle, 1990; Laurincik, Kroslak, Hyttel, Pivko, & Sirotkin, 1992) ve haberci moleküller sağladıkları (Buccione, Schroeder, & Eppig, 1990) ve steroid hormonlarının oositler üzerindeki etkilerine aracılık ettikleri bilinmektedir (Zuelke, &Brackett,1990). Yapılan bir çalışmada sığır oositleri melatoninin kumulus hücrelerinin genişlemesi üzerindeki etkisi bildirilmiştir (Tian ve ark., 2016). Melatoninin kumulus hücrelerinin genişlemesi üzerindeki benzer yararlı etkileri domuz oositlerinde de bildirilmiştir (Choi ve ark., 2008). Bir antioksidan olarak melatonin, kumulus hücrelerini apoptoza karşı korumuştur (Choi ve ark., 2008; Sugino ve ark., 2000; Taketani ve ark., 2011) ve genişlemelerini artırmıştır (Choi ve ark., 2008) dahası, melatoninin bu etkilerine reseptör aktivasyonunun da aracılık edebildiğini bulunmuştur.

Domuzlarda yapılan bir başka çalışmada 10^{-7} M melatonin yokluğunda veya varlığında 8 saat IVM'den sonra, embriyo gelişimi ile ilgili genlerin ekspresyonunu ölçmek için sırasıyla oositler ve kümülüs hücreleri toplanmıştır. Sonuçlar, melatonin

tedavisinin oositlerde, PTX3 (pentraksin 3), HAS2 (hyaluronan sentaz 2) ve EGFR'nin gen ifadeleri kumulus hücre genişlemesindeki (epidermal büyüme faktörü reseptörü) melatonin tedavisi ile yukarı regüle edilirken, melatonin FSHR (folikül uyarıcı hormon reseptörü) veya LHR (lüteinizan hormon reseptörü) ekspresyonları üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür. (Tian ve ark., 2017).

Rodrigues ve ark (2007) melatoninin 10^{-7} M konsantrasyonunda koyunlarda embriyo gelişimi üzerinde belirgin bir olumlu etkisini bildirmiştir. Bu durum, melatoninin onların *in vitro* fertilizasyon ve kültür sistemi üzerindeki daha yüksek anti-apoptotik aktivitesini gösterebilir. Mevcut çalışmada, melatoninin blastosist başına toplam hücre sayıları üzerindeki olumlu etkisi belirtilmiştir, bu durum melatoninin bireysel blastomerler üzerindeki anti-apoptotik etkisi ile açıklanmıştır. IVM ortamına melatonin desteğinin koyun kumulus hücrelerinin genişlemesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu doğrulanmış; 10^{-7} konsantrasyonda melatonin, nükleer olgunlaşma ve oosit kalitesinin korunması için özellikle optimal olduğu belirtilmiştir (Rodriguez-Osorio ve ark., 2007). Sonuç olarak IVM ortamına melatonin desteğinin koyun kümülüs hücrelerinin genişlemesi ve polar vücut ekstrüzyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu doğrulandı; 10^{-7} M konsantrasyon da melatonin, nükleer olgunlaşma ve oosit kalitesinin korunması için iyi bir ortam oluşturmaktadır ($P<0.05$). Sonuçlarımız yapılan çalışmaların bir kısmından daha iyidir ve parallellik göstermektedir.

Sıcaklık stresi, maturasyon aşamasında çiftlik hayvanların oositinin gelişimsel yeterliliği üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Payton ve ark (2004) bir keresinde 41 °C altında 6 saat tedavi altındaki sığır oositinin sekiz hücreli evreye dönüşmekte zorlandığı ve termal tedavi 12 saat sürdüğü takdirde blastosiste dönüşemediği bildirilmiştir (Payton, ve ark., 2004). Sıcaklık stresi domuz COC'lerinin apoptoz geliştirmesine neden olur (Einarsson, Brandt, Lundeheim, & Madej, 2008) ve benzer sonuçlar sığır COC'lerinde de gözlenmiştir (Paula-Lopes, & Hansen, 2002). Sıcak stresli oositlerin *in vitro* embriyo üretiminde apoptotik hücrelerin yükselmesine yol açacağını bildirilmiştir. Bu ilk raporu Li ve ark (2015) bildirmiştir. Daha da önemlisi, kültür ortamındaki melatonin desteğinin blastosist aşamasında hücre apoptoz oranını önemli ölçüde engellediğini bildirilmiştir (Li ve ark., 2015). Ayrıca, değişken stresli

koşullar altında (sıcaklık stresi haricinde), melatoninin (100 pM) sadece domuz blastosistinin toplam hücre sayısını iyileştirmekle kalmayıp, aynı zamanda apoptotik hücre sayısını da azalttığını gözlemlenmiştir (Choi ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar dikkate alındığında melatonin birçok hayvan türünde maturasyon aşamasında ve *in vitro* kültür aşamlarında kullanılmış ve iyi yönde sonuçlar alınmıştır. Yapılan bu çalışmada oosit maturasyon aşamasında gen düzeyinde apoptotik genler incellenmiş ve olumlu sonuçlar kaydedilmiştir. Melatonin pro-apoptatik bir gen olan BAX genini maturasyon aşamasında yukarı doğru regüle etmiştir. Bu sonuç istatiksel olarak anlamlıdır ($P<0.05$). Bir diğer çalışılan Bcl2 geni ise yukarı doğru regüle olmuştur fakat anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Bu iki sonuç ele alındığı zaman melatonin sıcaklık stresi altında maturasyon medyumunda oositleri apoptoza karşı korumaktadır. Elde edilen sonuçlar diğer yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

Melatonin sadece ROS seviyesini düşürmekle kalmadığı, aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonu da iyileştirdirdiği bildirilmiştir (Yang ve ark., 2017). Mitokondri, ROS üretiminin önemli bir kaynağıdır ve oksidatif strese karşı ek koruma gerekir (Castello, Drechsel, & Patel, 2007; Izyumov ve ark., 2010). Önceki çalışmalar, melatoninin, oksidatif stresi azaltarak optimal mitokondriyal fonksiyonu ve homeostazı koruduğunu göstermiştir (Jou ve ark., 2007; Ren ve ark., 2015; Semak ve ark., 2005). Mitokondri dağılımının dinamik bir süreç olduğu (Yamochi ve ark., 2016) ve oosit kalitesinin önemli bir göstergesi olduğu kabul edilmektedir. Örneğin, oosit olgunlaşması sürecinde ve aynı zamanda erken embriyoya özgü dönemde aktif mitokondrinin üniform, granüle dağılımı normal embriyo gelişimi için gereklidir (Bavister, & Squirrell, 2000; Brevini, Cillo, Antonini, & Gandolfi, 2007; Nagai ve ark., 2006). Hem mitokondri içeriği hem de ATP seviyeleri, oositlerin gelişimsel yeterliliği ile pozitif olarak ilişkilidir, yani oositlerin sitoplazmik olgunlaşmasını ve IVF embriyolarının gelişimini teşvik ederler (Selesniemi, Lee, Muhlhauser, & Tilly, 2011; Thouas, Trounson, Wolvetang, & Jones, 2004). Yapılan bir çalışmada, mitokondrinin oositlerin bir tarafında kümelendiğini ve melatonin tedavisinin mitokondriyal dağılımı önemli ölçüde normalleştirdiğini ve daha fazla ATP üretmek için işlevlerini geliştirdiğini gözlemlenmiştir (Yang ve ark., 2017)

Ayrıca melatonin, mitokondri işlevi ile ilişkili olan SIRT1, AKT2 ve Polg2'nin ekspresyonunu teşvik etmektedir. SIRT1 ile ilgili son araştırmalar, hücre döngüsü,

apoptoz ve diğer metabolik süreçler üzerindeki rolüne odaklanmıştır (Sato ve ark., 2014), SIRT1'in mitokondriyal DNA kopya sayısını kazanarak domuz oositinin kalitesini iyileştirebileceğini ve böylece PA'dan sonra oosit olgunlaşmasını ve embriyo gelişimini desteklediğini bildirilmiştir. SIRT1 *in vitro* domuz oositini yaşlanmaya karşı koruyabilir (Ma, Zhang, Zhang, Han, & Rui, 2015). Itami ve ark. (2015) tarafından da benzer sonuçlar bildirilmiştir (Itamin, Shirasuna, Kuwayama, & Iwata, 2015; Yang ve ark., 2015). SIRT1'in aktivasyonu, mitokondrinin işlevini geliştirerek oosit olgunlaşması üzerinde faydalı etkilere sahip olduğu görülmüştür. AKT2, hücre sağkalımı ve döngüsünde önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir. AKT2, sığır oositinin MI aşamasından MII aşamasına olgunlaşmasını teşvik ettiği görülmüştür (Wolfenson ve ark, 2000) ve benzer fenomen, Kalous ve arkadaşları tarafından domuz oositinde bildirildi (Kalous, Kubelka, Solc, Susor, & Motlik, 2009). Polg2, domuz oosit olgunlaşmasının ve embriyo gelişiminin düzenleme mekanizmasında rol oynadığı rapor edilmiştir (Adriaens, Jacquet, Cortrindt, Janssen, & Smitz, 2006; Tanavde, & Maitra, 2003; Yi ve ark., 1995). Bir diğer çalışmada, melatoninin AKT2'yi aktive ederek nükleer olgunlaşmayı hızlandırdığını ve daha sonra SIRT1 ve Polg2 ekspresyonunu yukarı regüle ederek domuz oosit olgunlaşmasını teşvik ettiğini göstermiştir (Li ve ark., 2015).

Organizmaların normal fizyolojik işlevleri için sabit bir vücut sıcaklığı çok önemlidir (Li ve ark., 2015). Sıcaklık stresi koşulları altında, bir hayvanın fizyolojik işlevleri zarar görebilir (Jardine, 2007; Li ve ark., 2015). Germinal vezikül parçalanma aşamasında domuz COC'lerinde sıcaklık stresinin kümülüs hücrelerinde apoptozu indüklediği ve oosit olgunlaşma oranını düşürdüğü bildirilmiştir (Yuan ve ark., 2008). Ayrıca, ısı stresi oksidatif hasarı tetikler ve oositlerin *in vitro* olgunlaşması sırasında hücre apoptozuna yol açtığı görülmüştür (Wang ve ark., 2009). Bununla birlikte, melatoninin hücreleri ısı stresinden koruma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2009). Li ve ark. (2015), ısı stresinin domuz oositlerinin olgunlaşma oranını ve blastosist oluşum oranını önemli ölçüde azalttığını, ancak melatonin takviyesinin yalnızca embriyoların olgunlaşma oranını ve gelişim kapasitesini artırmakla kalmadığını, aynı zamanda ısı stresi altında bozulan normal steroid hormon seviyelerinin korunmasına da yardımcı olduğunu bildirdi. Ek olarak, ısı stresi altında melatonin ayrıca ROS ve apoptozu azaltabilir ve GSH üretimini ve Polg2, SIRT1 ve

AKT2 genlerinin ekspresyon seviyelerini artırabilir (Li ve ark., 2015). Resveratrol ve melatoninin domuz oositlerini ısı stresinden koruma üzerindeki etkisini inceleyen yakın tarihli bir çalışmada, melatonin, ısı stresi altında oosit olgunlaşması sırasında tek başına resveratrol'den daha güçlü bir koruyucu aktivite sergiledi (Li ve ark., 2016). Mitokondriyal foksiyonların maturasyon aşamasında gen düzeyinde incelenmesi üç gen aralığı ile doğrulanmışıtır. Melatoninin, SIRT1, AKT2 ve Polg2 genlerini maturasyon aşamasında yukarı doğru regüle ederek mitokondriyal fonksiyonlarla iyi yönde ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır ve istatiksel olarak da anlamlıdır ($P<0.05$).

Sonuç olarak;

- Koyun oositleri *in vitro* sıcaklık stresine bağlı olarak maturasyondan olumsuz etkilenmektedir.
- Maturasyon medyumuna ilave edilen melatonin oosit maturasyonunu, bölünme oranlarını, morula ve blastosit oranlarına olumlu etkisi olduğu saptandı.
- Melatonin tedavisinin oositlerde, PTX3 (pentraksin 3), HAS2 (hyaluronan sentaz 2) ve EGFR'nin gen ifadeleri kumulus hücre genişlemesindeki (epidermal büyüme faktörü reseptörü) melatonin tedavisi ile yukarı regüle ederek kumulus genişlemesi yani oositlerin mature olması konusunda etkisi bulunmaktadır.
- Melatonin pro-apoptatik bir gen olan BAX ve Bcl2 genlerini maturasyon aşamasında yukarı doğru regüle ederek apoptotik hasarlara karşı korundu.
- Melatoninin, SIRT1, AKT2 ve Polg2 genlerini maturasyon aşamasında yukarı doğru regüle ederek mitokondriyal fonksiyonlarları korumada büyük rol oynamaktadır.

  İleride yapılacak olan IVF çalışmalarında uygulanacak protokollere belli bir standardizasyonda melatonin hormonu eklenebilir. Bu sayede daha kaliteli ve yüksek oranlarda embriyo elde edilmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abeyta, M., & Behr, B. (2014). Morphological Assessment of Embryo Viability. *Seminars in Reproductive Medicine*, 32(02), 114–126. https://doi.org/10.1055/s–0033–1363553

Adona, P.R., Pires, P.R., Quetglas, M.D., Schwarz, K.R., & Leal, C.L. (2008). Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone, I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. *Animal Reproduction Sciences*, 108, 49-65. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.07.002

Adriaens, I., Jacquet, P., Cortvrındt, R., Janssen, K., & Smitz, J. (2006). Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology*, 228, 333–343. https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.09.018

Aerts, J.M.J., & Bols, P.E.J. (2010). Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(1), 171-179. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x

Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2005). Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinican's perspective. *Reproductive Biomedicine Online*, 11(5), 641-650. https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61174-1

Agarwal, A., & Prabakaran, S.A. (2005) Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian Journal of Experimental Biolology*, 43(11), 963–974.

Agarwal, A., Said, T.M., Bedaiwy, M.A., Banerjee, J., & Alvarez, J.G. (2006). Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertility and Sterility*, 86, 503–512. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.02.088

Agarwal, A., Sengupta, P., & Durairajanayagam, D. (2018). Role of L-carnitine in female infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16, 5. https://doi.org/10.1186/ s12958- 018- 0323- 4

Aghaz, F., Hajarian, H., Shabankareh, H.K., & Abdolmohammadi, A. (2015). Effect of sericin supplementation in maturation medium on cumulus cell expansion, oocyte nuclear maturation, and subsequent embryo development in Sanjabi ewes during the breeding season. *Theriogenology*, 84(9), 1631–1635. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.08.013

Attaran, M., Pasqualotto, E., Falcone, T., Goldberg, J.M., Miller, K.F., Agarwal, A., Sharma R. (2000). The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *International Journal of Fertility and Womens Medicine*, 45(5), 314–320

Avdi, M., Chemineau, P., & Driancourt, M.A. (1997). Alterations in follicular maturation associated with within-breed variation in ovulation rate in Chios sheep. *Animal Reproductin Science*, 46(3-4), 223-235. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(96)01613-2

Baldassarre, H., & Karatzas, C.N. (2004). Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. Animal Reproduction Science, 82-83, 255-266. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.027

Baldassarre, H. (2021). Laparoscopic Ovum Pick−Up Followed by In Vitro Embryo Production and Transfer in Assisted Breeding Programs for Ruminants. *Animals*, 11(1), 216. https://doi.org/10.3390/ani11010216

Bartlewski, P. M., Beard, A. P., Cook, S. J., & Rawlings, N. C. (1998). Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *Reproduction*, 113(2), 275−285. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1130275

Bartlewski, P.M., Beard, A.P., & Rawlings, N.C. (1999). Ovarian function in ewes at the onset of the breeding season. *Animal Reproduction Science*, 57(1−2), 67−88. https://doi.org/10.1016/s0378−4320(99)00060−3

Barry, T.P., Malison, J.A., Lapp, A.F., & Procarione, L.S. (1995). Effects of selected hormones and male cohorts on final oocyte maturation, ovulation, and steroid production in walleye (Stizostedion vitreum). *Aquaculture*, 138(1−4), 331−347. https://doi.org/10.1016/0044−8486(95)01125−0

Bavister, B.D., & Squirrell, J.M. (2000). Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Human Reproduction*, 15(2), 189-198. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_2.189

Bergstein–Galan, T.G., Busato, E., Abreu, A.C.M.R., Bertol, M.A.F., Pereire, J.F.S., Hartmann, W., … Bertol, M.A.F. (2018). *Reproduction Biotechnology in Farm Animals*, (pp. 181-200). Avid Science.

Betteridge, K. J. (2003). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science*, 79(3−4), 203−244. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00166−0

Birler, S., Pabuccuoglu, S., Alkan, S., Ak, K., Evecen, M., & Ileri, İ. K. (2001). Effects of different maturation and culture media on IVF of sheep oocytes. *Pakistan Veterinary Journal*, 22, 100-102. Erişim Adresi: http://hdl.handle.net/20.500.12627/1241

Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Alkan, S., Ozdaş, Ö.B., Atalla, H., & İleri I.K. (2002). İn vitro fertilizasyonla elde edilen koyun embriyolarının blastosist dönemine kadar geliştirilmesi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 26: 891-894.

Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Atalla, H., Alkan, S., Ozdaş, O.B., Bacinoğlu, S., … Zavar, I. (2002). İn Vitro Üretilen Koyun Embriyolarının Transferi. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, 26: 1421-1426

Brevini, T.A., Cillo, F., Antonini, S., & Gandolfi, F. (2007). Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Animal Reproduction Science*, 98, 23–38. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.018

Buccione, R., Schroeder, A.C., & Eppig, J.J. (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*, 43, 543–547. https://doi.org/10.1095/biolreprod43.4.543

Byrd, S.R., Flores-Foxworth, G., Applewhite, A.A., Westhusin, M.E. (1997). In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology*, 47: 857-864. https://doi.org.10.1016/s0093-691x(97)00041-1

Castello, P.R., Drechsel, D.A., & Patel, M. (2007). Mitochondria Are a Major Source of Paraquat-induced Reactive Oxygen Species Production in the Brain. *The*

Journal of Biological Chemistry, 282, 14186–14193. https://doi.org/10.1074/jbc.M700827200

Chan, W.Y., & Ng, T.B. (1994). Development of pre-implantation Mouse embryos under the influence of pineal indoles. *Journal of Neural Transmission General Section*, 96, 19–29. https://doi.org/10.1007/BF01277925

Chen, H.Y., Chen, T.Y., Lee, M.Y., Chen, S.T., Hsu, Y.S., Kuo, Y.L., … Lee, E. (2006). Melatonin decreases neurovascular oxidative/nitrosative damage and protects against early increases in the blood-brain barrier permeability after transient focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Pineal Research*, 41, 175–182. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00351.x

Chen, L., Wert, S.E., Hendrix, E.M., Russell, P.T., Cannon, M., & Larsen, W.J. (1990). Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development*, 26, 236–247. https://doi.org/ 10.1002/mrd.1080260307

Choi, J., Park, S.M., Lee, E., Kim, J.H., Jeong, Y.I., Lee, J.Y., … Hwang, W.S. (2008). Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 75, 1127–1135. https://doi.org/10.1002/mrd.20861

Cindrova-Davies, T., Yung, H.W., Johns, J., Spasic-Boskovic, O., Korolchuk, S., Jauniaux, E., … Charnock-Jones, D.S. (2007). Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. American *Journal Of Pathology*, 171(4), 11681179–11681179. https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070528

Cipolla-Neto, J., & Do Amaral, F.G. (2018). Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocrine Reviews*, 39, 990–1028. https://doi.org/ 10.1210/er.2018-00084

Cirit, U., Demir, K., Bacınoğlu, S., Karaman, E., Pabuccuoğlu, S., & Birler, S. (2008). Parthenogenetic activation of sheep oocytes. *İstanbul Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 34(2), 1−5.

Cognié, P., Gerard, B., Poulin, N., & Mermillod P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59(1), 171-188. https://org.doi:10.1016/S0093-691(02)01270-0

de Castro e Paula, L.A., & Hansen, P.J. (2007). Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology*, 68, 763–70. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.005

Deleuze, S., & Goudet, G. (2010). Cysteamine supplementation of in vitro maturation media: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6), 476–482. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01587.x

Devine, P.J., Perreault, S.D., & Luderer, U. (2012). Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biolology of Reproduction*, 86(2), 27. https://doi.org/ 10.1095/biolreprod.111.095224

Driancourt, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55(6), 1211−1239. https://doi.org/10.1016/s0093−691x(01)00479−4

Duranthon, V., & Renard, J.P. (2001). The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, 55(6),

1277−1289. https://doi.org/10.1016/s0093−691x(01)00482−4

Einarsson, S., Brandt, Y., Lundeheim, N., & Madej, A. (2008). Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50:48. https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-48

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*, 78:250-262. https://doi.org/10.1002/mrd.21295

Eppig, J.J. (1982). The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Developmental Biology*, 89, 268–272. https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90314-1

Fantinati, P., Zannoni, A., Bernardini, C., Webster, N., Lavitrano, M., Forni, M., …Bacci, M.L. (2005). Laparoscopic insemination technique with low numbers of spermatozoa in superovulated prepuberal gilts for biotechnological application. *Theriogenology*, 63(3), 806−817. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.005

Ferre, L.B., Kjelland, M.E., Strobech, L.B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991−1004. https://doi.org/10.1017/s1751731119002775

Fischer, T.W., Kleszczynski, K., Hardkop, L.H., Kruse, N., & Zillikens, D. (2013). Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *Journal of Pineal Research*, 54(3), 303–12. https://doi.org/10.1111/jpi.12018

Gilchrist, R.B., & Thompson, J.G. (2007). Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*, 67(1), 6–15. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.027

Gutnisky, C., Dalvit, G.C., Pintos, L.N., Thompson, J.G., Beconi, M.T., & Cetica, P.D. (2007). Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilisation and embryo development. *Reproduction, Fertility, and Development*, 19, 488–497. https://doi.org/10.1071/rd06134

Hafez, B., & Hafez, E.S.E. (2021). Reproduction in Farm Animals. 7th Edition. Wiley-Blackwell. Erişim adresi: https://www.wiley.com/en-us/Reproduction+in+Farm+Animals%2C+7th+Edition-p-9781118710289

Haghighat, N., & VanWinkle, L.J. (1990). Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. *The Journal of Experimental Zoology*, 253, 71–82. https://doi.org/10.1002/jez.1402530110

Haldar, C., & Chowdhury, J.P. (2021). Management of Ovarian Functions by Melatonin. *Journal of Reproductive Healthccare and Medicine*, 2, 16. https://doi.org/10.25259/JRHM_39_2020

Hansen, P.J. (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 364, 3341–3350. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0131

Hashimoto, S., Minami, N., Yamada, M., & Imai, H. (2000). Excessive concentration

of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Molecular Reproduction and Development*, 56(4), 520–526. https://doi.org/10.1002/1098-2795(200008)56:4<520::AID-MRD10>3.0.CO;2-0

Hardeland, R. (2017). Taxon- and Site-Specific Melatonin Catabolism. *Molecules*, 21-22(11), 2015. https://doi.org/10.3390/molecules22112015

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, 939. https://doi.org/10.3390/ijms17060939

Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H.M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Biomedicine Online*, 37(3), 327-339. https://doi.org/ 10.1016/j.rbmo.2018.05.012

Houghton, J.A.S., Liberati, N., Schrick, F.N., Townsend, E.C., Dailey, R.A., & Inskeep, E.K. (1995). Day of estrous cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *Journal of Animal Science*, 73(7), 2094–2101. https://doi.org/10.2527/1995.7372094x

Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Murai, K., Amemiya, A., & Itoh, M.T. (2000). The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. *Journal of Pineal Research*, 28, 48–51. https://doi.org/ 10.1034/j.1600-079x.2000.280107.x

Itamin, N., Shırasuna, K., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2015). Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. Theriogenology, 83, 1360–1367. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.029

Iwata, H., Ohota, M., & Hashimoto Snagai, Y. (2003). Free oxygen radicals are generated at the time of aspiration of oocytes from ovaries that have been stored for a long time. *Zygote*, 11, 1–5. https://doi.org/10.1017/s0967199403001011

Izyumov, D.S., Domnina, L.V., Nepryakhina, O.K., Avetisyan, A.V., Golyshev, S.A., Ivanova, O.Y., … Chernyak, B.V. (2010). Mitochondria as source of reactive oxygen species under oxidative stress. Study with novel mitochondria-targeted antioxidants-The"Skulachev-ion" derivatives. *Biochemistry* 2010, 75, 123–129. https://doi.org/10.1134/s000629791002001x

Jardine, D.S. (2007). Heat illness and heat stroke. *Pediatrics in Review*, 28:249-258. https://doi.org/10.1542/pir.28-7-249

Jou, M., Peng, T., Yu, P., Jou, S., Reiter, R.J., Chen, J., … Hsu, L. (2007). Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *Journal of Pineal Research*, 43, 389–403. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00490.x

Kala, M., Shaikh, M.V., & Nivsarkar, M. (2017). Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reproductive Medicine and Biology*, 16, 28–35. https://doi.org/10.1002/rmb2.12013

Kalous, J., Kubelka, M., Solc, P., Susor, A., & Motlik, J. (2009). AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. *Reproduction*, 138, 645–654. https://doi.org/10.1530/REP-08-0461

Kane, M.T. (2003). A review of in vitro gamete maturation and embryo culture on potential impact on future animal biotechnology. Animal Reproduction Science, 79, 171-190. https://org.doi:10.1016/S0378-4320(03)00164-7

Katska-Ksiazkiewicz, L., Ooiela, J., & Rynska, B. (2007). Effects of oocytes quality, semen donor and embryo co culture system on the efficiency of blastosyst production in goats. *Theriogenology*, 68: 736-744. https://org.doi:10.1016/j.theriogenology.2007.06.016

Kaymakçı, M., & Sönmez, R. (1992). Koyun yetiştiriciliği, Hasad Yayıncılık, İstanbul.

Keskintepe, L., Pacholczyk, G., Machnicka, A., Norris, K., Curuk, M.A., Khan, I., & Brackett, B.G. (2002). Bovine Blastocyst Development from Oocytes Injected with Freeze–Dried Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 67(2), 409–415. https://doi.org/10.1095/biolreprod67.2.409

Khazaei, M., & Aghaz, F. (2017). Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during in vitro maturation of oocytes. *International Journal of Fertility and Sterility*, 11(2), 63-70. https://doi.org/10.22074/ijfs.2017.4995

Kidson, A. (2004). In vitro embryo development in pig: impact of oocyte maturation milieu on blastocyst morphology and viability, Tekst. - Proefschrift Universiteit Utrecht 2004. https://dspace.library.uu.nl/bitstream/handle/1874/318/inhoud.htm?sequence=5

Kowaltowski, A.J., & Vercesi, A.E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(3-4), 463–471. https://doi.org/ 10.1016/s0891-5849(98)00216-0

Krisher, R.L. (2004) The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82, 14-23. https://doi.org/10.2527/2004.8213_supplE14x

Kruip, T.A.M., & den Daas, J.H.G. (1997). In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, 47(1), 43-52. https://doi.org.10.1016/S0093-691X(96)00338-X

Laurincik, J., Kroslak, P., Hyttel, P., Pivko, J., & Sirotkin, A.V. (1992). Bovine cumulus expansion and corona-oocyte disconnection during culture in vitro. *Reproduction, Nutrition and Development*, 32, 151–161. https://doi.org/10.1051/rnd:19920208

Li, Q., Geng, X.D., Zheng, W., Tang, J., Xu, B., & Shi, Q.H. (2012). Current Understanding of Ovarian Aging. *Science China Life Sciences*, 55, 659–669. https://doi.org/10.1007/s11427-012-4352-5

Li, Y., Zhang, Z., He, C., Zhu, K., Xu, Z., Ma, T., … Liu, G. (2015). Melatonin protects porcine oocyte in vitro maturation from heat stress. *Journal of Pineal Research*, 59, 365-375. https://doi.org/10.1111/jpi.12268

Li, Y., Wang, J., Zhang, Z., Yi, J., He, C., Wang, F., … Liu, G. (2016). Resveratrol compares with melatonin in improving in vitro porcine oocyte maturation under heat stress. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7:33. https://doi.org/10.1186/s40104-016-0093-9

Lin, T., Lee, J.E., Kang, J.W., Oqani, R.K., Cho, E.S., Kim, S.B., & Il Jin, D. (2018). Melatonin Supplementation during Prolonged in Vitro Maturation Improves the Quality and Development of Poor-Quality Porcine Oocytes via Anti-Oxidative and Anti-Apoptotic Effects. *Molecular Reproduction and Development*, 85, 665–681. https://doi.org/10.1002/mrd.23052

Lee, J.Y., Jung, Y.G., & Seo, B.B. (2016). Effects of culture media conditions on production of eggs fertilized in vitro of embryos derived from ovary of high grade

Hanwoo. *Journal of Animal Science and Technology*, 58, 11. https://doi.org/10.1186/s40781-016-0093-5

Lord, T., Nixon, B., Jones, K.T., & Aitken, R.J. (2013). Melatonin Prevents Postovulatory Oocyte Aging in the Mouse and Extends the Window for Optimal Fertilization in Vitro. *Biology of Reproduction*, 88, 1–9. https://doi.org/ 10.1095/biolreprod.112.106450

Luddi, A., Capaldo, A., Focarelli, R., Gori, M., Morgante, G., Piomboni, P., De Leo, V. (2016). Antioxidants reduce oxidative stress in follicular fluid of aged women undergoing IVF. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1), 57. https://doi.org/10.1186/s12958- 016- 0184- 7

Ma, R., Zhang, Y., Zhang, L., Han, J., & Rui, R. (2015). Sirt1 protects pig oocyte against in vitro aging. Animal Science Journal, 86(9), 826-832. https://doi.org/10.1111/asj.12360.

Marques, T.C., da Silva Santos, E.C., Diesel, T.O., Leme, L.O., Martins, C.F., Dode, M.A.N., … Gambarini, M.L. (2018). Melatonin Reduces Apoptotic Cells, SOD2 and HSPB1 and Improves the in Vitro Production and Quality of Bovine Blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 226–236. https://doi.org/10.1111/rda.13097

McNatty, K.P., Smith, P., Hudson, N.L., Heath, D.A., Tisdall, D.J.O, W.S., & Braw-Tal, R. (1995). Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 49, 123-135.

Meister, A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. Science, 220, 472–477. https://doi.org/10.1126/sciences.6836290

Meiyu, Q., Liu, D., & Roth, Z. (2015). IGF-I slightly improves nuclear maturation and cleavage rate of bovine oocytes exposed to acute heat shock in vitro. Zygote, 23, 514–24. https://doi.org/10.1017/S096719941400015X

Melhuish Beaupre, L.M., Brown, G.M., Gonçalves, V.F., & Kennedy, J.L. Melatonin's neuroprotective role in mitochondria and its potential as a biomarker in aging, cognition and psychiatric disorders. *Translational Psychiatry*, 11, 339. https://doi.org/10.1038/s41398- 021- 01464- x

Meng, F., Jiao, X.F., Chen, F., Zhang, X.Y., Duan, Z.Q., Ding, Z.M., … Huo, L.J. (2020). Isobutylparaben Negatively Affects Porcine Oocyte Maturation Through Increasing Oxidative Stress and Cytoskeletal Abnormalities. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 61(4), 433-444. https://doi.org/10.1002/em.22356

Minguini, I.P., Luquetti, C.M., Baracat, M.C.P., Maganhin, C.C., de Oliveira Nunes, C., Simões, R.S., … Soares, J.M. (2019). Melatonin Effects on Ovarian Follicular Cells: A Systematic Review. *Revista da Associacao Medica Brasileira*, 65, 1122–1127. https://doi.org/ 10.1590/1806-9282.65.8.1122

Mustafi, S.B., Chakraborty, P.K., Dey, R.S., & Raha, S. (2009). Heat stress up-regulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS), p38MAPK, and Akt. *Cell Stress Chaperones* 14, 579–589. https://doi.org.10.1007/s12192-009-0109-x

Nabenishi, H., Ohta, H., Nishimoto, T., Morita, T., Ashizawa, K., & Tsuzuki, Y. (2012). The effects of cysteine addition during in vitro maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote*, 20, 249–59. https://doi.org/10.1017/S0967199411000220

Nagai, S., Mabuchi, T., Hirata, S., Shoda, T., Kasai, T., Yokota, S., … Hoshi, K. (2006). Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 210, 137–144. https://doi.org/10.1620/tjem.210.137

Nakamura, Y., Yamagata, Y., Sugino, N., Takayama, H., & Kato, H. (2002). Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of Reproduction*, 67(5), 1588–1592. https://doi.org/ 10.1095/biolreprod.102.005264

Qian, Y., Shi, W., Ding, J., Sha, J., & Fan, B. (2003). Predictive value of the area of expanded cumulus mass on development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *The Journal of Reproduction and Development*, 49, 167–174. https://doi.org/ 10.1262/jrd.49.167

Olcese, J.M. (2020). Melatonin and Female Reproduction: An Expanding Universe. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 85. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00085

Orland, B. (2017). The invention of artificial fertilization in the eighteenth and nineteenth century. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 39(2). https://doi.org/10.1007/s40656−017−0136−3

Ozdaş, O.B., Baran, A., TAŞ, M., Cirit, U., Demir, K., Bacınoğlu, S., ... & Ak, K. (2013). Effect of different transport temperatures on in vitro maturation of oocytes collected from frozen−thawed sheep ovaries. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(1),15−19. https://doi.org/10.3906/vet-1104-24

Pandey, A.N., & Chaube, S.K. (2014). A moderate increase of hydrogen peroxide level is beneficial for spontaneous resumption of meiosis from diplotene arrest in rat oocytes cultured in vitro. *Bioresearch Open Access*, 3(4), 183–191. https://doi.org/ 10.1089/biores.2014.0013

Paramio, M. T., & Izquierdo, D. (2014). Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(Suppl 4), 37-48. https://doi.org/10.1111/rda.12334

Paula-Lopes, F.F., Hansen, P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295, 37–42. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)00619-8

Payton, R.R., Romar, R., Coy, P., Saxton, A.M., Lawrence, J.L., & Edwards, J.L. (2004). Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biology of Reproduction*, 71, 1303–1308. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.029892

Payton, R.R., Rispoli, L.A., Nagle, K.A., Gondro, C., Saxton, A.M., Voy, B.H., & Edwards, J.L. (2018). Mitochondrial-related consequences of heat stress exposure during bovine oocyte maturation persist in early embryo development. *The Journal of Reproduction and Development*, 64, 243–51. https://doi.org/10.1262/jrd.2017-160

Perreault, S.D., Barbee, R.R., & Slott, V.L. (1988). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Developmental Biology*, 125(1), 181-186. https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90070-x

Poleszczuk, O., & Papis kwenta-Muchalska, E. (2005). An effect of melatonin on development of bovine embryos cultured in vitro under optimal or enhanced oxygen tensions. *Reproduction Fertility and Development*, 17, 224.

https://doi.org/10.1071/RDv17n2Ab148
Premkumar, K.V., & Chaube, S.K. (2016). Increased level of reactive oxygen species persuades postovulatory aging-mediated spontaneous egg activation in rat eggs cultured in vitro. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 52(5), 576-588. https://doi.org/10.1007/s11626-016-0007-3
Putney, D.J., Drost, M., & Thatcher, W.W. (1988). Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Theriogenology*, 30, 195–209. https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90169-0
Rai, S., & Gosh, H. (2021). Modulation of Human Ovarian Function by Melatonin. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 26, 140–157. https://doi.org/10.2741/875
Ren, L., Wang, Z., An, L., Zhang, Z., Tan, K., Miao, K., … Tian, J. (2015). Dynamic comparisons of high-resolution expression profiles highlighting mitochondria-related genes between in vivo and in vitro fertilized early mouse embryos. *Human Reproduction*, 30, 2892–2911. https://doi.org/10.1093/humrep/dev228
Rodrigues-Cunha, M. C., Mesquita, L. G., Bressan, F., Collado, M. D., Balieiro, J. C., Schwarz, K. R., … Leal, C. L. (2016). Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. *Theriogenology*, 86, 1685-1694. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.026
Rodriguez-Osorio, N., Kim, I.J., Wang, H., Kaya, A. & Memili, E. (2007). Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. *Journal of Pineal Research*, 43, 283-288. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00475.x
Roth, Z., & Hansen, P.J. (2004). Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. Biology of *Reproduction*, 71, 1898–906. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031690
Roth, Z., & Hansen, P.J. (2005). Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, 129, 235–44. https://doi.org/10.1530/rep.1.00394
Roth, Z. (2008). Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. Reproduction in Domestic Animals, 43(2), 238–244. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01168.x
Rubianes, E., & Menchaca, A. (2003). The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, 78(3−4), 271−287. https://doi.org/10.1016/s0378−4320(03)00095−2
Ruder, E.H., Hartman, T.J., & Goldman, M.B. (2009). Impact of oxidative stress on female fertility. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 21(3), 219–222. https://doi.org/ 10.1097/GCO.0b013e32832924ba
Saacke, R.G., Dalton, J.C., Nadir, S., Nebel, R.L., & Bame, J. H. (2000). Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal Reproduction Science*, 60−61, 663−677. https://doi.org/10.1016/s0378−4320(00)00137−8
Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N.L., Parrish, J.J., & Memili, E. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 101(3−4), 225−240.

https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.016
Sato, D., Itami, N., Tasaki, H. Takeo, S., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2014). Relationship between mitochondrial DNA copy number and SIRT1 expression in porcine oocytes. *PLoS One*, 9, e94488. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094488
Selesniemi, K., Lee, H.J., Muhlhauser, A., & Tilly, J.L. (2011). Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 12319–12324. https://doi.org/10.1073/pnas.1018793108
Semak, I., Naumova, M., Korik, E., Terekhovich, V., Wortsman, J., & Slominski, A. (2005). A Novel Metabolic Pathway of Melatonin: Oxidation by Cytochrome C. *Biochemistry*, 44, 9300–9307. https://doi.org/10.1021/bi050202d
Silva, F.M., Marques, A., & Chaveiro, A. (2010). Reactive Oxygen Species: A Double-Edged Sword in Reproduction. *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 127-133. https://doi.org/10.2174/1874318801004010127
Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Munoz-Gutierrez, M., & Somchit, A. (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction Nutrition Development*, 46(4), 339-354. https://doi.org/10.1051/rnd:2006016
Stroud, B. (2011). IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter, IETS Publications*, 29, 14–23.
Sugiura, K., Pendola, F.L., & Eppig, J.J. (2005). Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental Biology*, 279(1), 20–30. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.027
Sugino, N., Takiguchi, S., Kashida, S., Karube, A., Nakamura, Y., & Kato, H. (2000). Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Molecular Human Reproduction*, 6, 19–25. https://doi.org/10.1093/molehr/6.1.19
Szczepańska, M., Koźlik, J., Skrzypczak, J., & Mikołajczyk, M. (2003). Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertility and Sterility*, 79(6), 1288–1293. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)00266-8
Şimşek, F. (1999). Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar Ve Lipit Peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*, 8(1), 42-47. Erişim adresi: https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-serbest-oksijen-radikalleri-antioksidanlar-velipit-peroksidasyonu-34490.html
Takahashi, M. (2011). Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. *Reproductive Medicine and Biology*, 11(1), 37–47. https://doi.org/10.1007/s12522–011–0105–6
Taketani, T., Tamura, H., Takasaki, A., Lee, L., Kizuka, F., Tamura, I., … Sugino N. (2011). Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. *Journal of Pineal Research*, 51, 207–213. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00878.x
Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka, F., Lee, L., … Sugino,

N. (2012). The Role of Melatonin as an Antioxidant in the Follicle. *Journal of Ovarian Research*, 26, 5. https://doi.org/10.1186/1757-2215-5-5

Tamura, H., Kawamoto, M., Sato, S., Tamura, I., Maekawa, R., Taketani, T., …Sugino, N. (2017). Long-Term Melatonin Treatment Delays Ovarian Aging. *Journal of Pineal Research*, 62, e12381. https://doi.org/10.1111/jpi.12381

Tamura, H., Tanabe, M., Jozaki, M., Taketani, T., & Sugino, N. (2019). Antioxidative Action of Melatonin and Reproduction. *Glycative Stress Research*, 6, 192–197. https://doi.org/10.24659/gsr.6.3_192

Tan, D.X., Manchester, L.C., Terron, M.P., Flores, L.J., & Reiter, R.J. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interactio of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? Journal of Pineal Research, 42, 28–42. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x

Tanabe, M., Tamura, H., Taketani, T., Okada, M., Lee, L., Tamura, I., … Norihiro, S. (2015). Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochon- dria, and plasma membranes in mice. *The Journal of Reproduction and Development*, 61(1), 35–41. https://doi.org/10.1262/jrd.2014-105

Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., & de Kruif A. (2002). Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 61(3), 414–424. https://doi.org/10.1002/mrd.10102

Tanavde, V.S., & Maıtra, A. (2003). In vitro modulation of steroidogenesis and gene expression by melatonin: a study with porcine antral follicles. *Endocrine Research*, 29, 399–410. https://doi.org/ 10.1081/erc-120026946

Tatemoto, H., Ootaki, K., Shigeta, K., & Muto, N. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2–O-a-glucoside during in vitro maturation. Biology of Reproduction, 65, 1800–1806. https://doi.org/10.1095/biolreprod65.6.1800

Teixeira, P.P.M., Padilha, L.C., Oliveira, M.E.F., Motheo, T.F., Sılva ASL, Barros, F.F.P.C., … Vıcente, W.R.R. (2011). Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on ooctye production. *Animal Reproduction Science*, 127, 169-175. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.08.001

Tian, X., Wang, F., He, C., Zhang, L., Tan, D., Reiter, R.J., … Liu, G. (2014). Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: A mechanistic approach. *Journal of Pineal Research*, 57, 239-247. https://doi.org/10.1111/jpi.12163

Tian, X., Wang, F., Zhang, L., He, C., Ji, P., Wang, J., … Liu, G. (2017). Beneficial Effects of Melatonin on the In Vitro Maturation of Sheep Oocytes and Its Relation to Melatonin Receptors. *International Journal of Moleculer Sciences*, 18, 834. https://doi.org/doi:10.3390/İjms18040834

Thouas, G.A., Trounson, A.O., Wolvetang, E.J., & Jones, G.M. (2004). Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. *Biology of Reproduction*, 71, 1936–1942. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.033589

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. https://doi.org/10.20455/ros.2016.817
Tripathi, A., PremKumar, K.V., Pandey, A.N., Khatun, S., Mishra, S.K., Shrivastav, T.G., & Chaube, S.K. (2011). Melatonin protects against clomiphene citrate-induced generation of hydrogen peroxide and morphological apoptotic changes in rat eggs. *European Journal of Pharmacology*, 667(1-3), 419–424. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.06.005
TÜİK, Hayvansal Üretim İstatistikleri, 2023. Erişim Adresi: https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-2023-49681#:~:text=K%C3%BC%C3%A7%C3%BCkba%C5%9F%20hayvan%20kategorisinde%2C%20koyun%20say%C4%B1s%C4%B1,milyon%20303%20bin%20ba%C5%9F%20oldu.&text=Bal%20%C3%BCretimi%20bir%20%C3%B6nceki%20y%C4%B1la,114%20bin%20886%20ton%20oldu
Varoni, E.M., Soru, C., Pluchino Intra, C., & Iriti, M. (2016). The impact of melatonin in research. *Molecules*, 21, 240. https://doi.org/10.3390/molecules21020240
Vinoles, C., Forsberg, M., Banchero, G., & Rubianes, E. (2001). Effect of long–term and short–term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, 55(4), 993–1004. https://doi.org/10.1016/s0093–691x(01)00460–5
Wang, J.Z., Sui, H.S., Miao, D.Q., Liu, N., Zhou, P., … Tan, J.H. (2009). Effects of heat stress during in vitro maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. *Reproduction*, 137:181-189. https://doi.org/10.1530/REP-08-0339
Wani, N.A., Wani, G.M., Khan, M.Z., & Sidiqi, M.A. (1999). Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilisation procedures in sheep. *Small ruminant Research*, 34, 71-76. https://doi.org/10.1016/S0921-4488(99)00046-2
Wani, N.A., Wani, G.M., Khan, M.Z., & Salahudin, S. (2000). Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Ruminant Research*, 36, 63-67. https://doi.org/10.1016/S0921-4488(99)00097-8
Wani, N.A. (2002). In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*, 44, 89-95. https://org.doi:10.1016/S0921-4488(02)00020-2
Wilson, S.J., Marion, R.S., Spain, J.N., Spiers, D.E., Keisler, D.H., & Lucy, M.C. (1998). Effects of Controlled Heat Stress on Ovarian Function of Dairy Cattle. 1. Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*, 81(8), 2124–2131. https://doi.org/10.3168/jds.s0022–0302(98)75788–1
Wolfenson, D., Roth, Z., & Meidan, R. (2000). Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 535–547. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00102-0
Yamochi, T., Hashimoto, S., Amo, A., Goto, H., Yamanaka, M., Inoue, M., … Morimoto, Y. (2016). Mitochondrial dynamics and their intracellular traffic in porcine oocytes. *Zygote*, 24, 517–528. https://doi.org/10.1017/S0967199415000489.
Yang, Y., Jiang., S., Dong, Y., Fan, C., Zhao, L., Yang, X., … Qu, Y. (2015). Melatonin prevents cell death and mitochondrial dysfunction via a SIRT1-

dependent mechanism during ischemic-stroke in mice. *Journal of Pineal Research*, 58, 61–70. https://doi.org/10.1111/jpi.12193

Yang, M., Tao, J., Chai, M., Wu, H., Wang, J., Li, G., … Liu, G. (2017). Melatonin Improves the Quality of Inferior Bovine Oocytes and Promoted Their Subsequent IVF Embryo Development: Mechanisms and Results. *Molecules*, 22, 2059. https://doi.org/10.3390/molecules22122059

Yie, S., Brown, G.M., Liu, G. Collins, J.A., Daya, S., Hughes, E.G., … Younglai, E.V. (1995). Melatonin and steroids in human pre-ovulatory follicular fluid: seasonal variations and granulosa cell steroid production. *Human Reproduction*, 10, 50–55. https://doi.org/10.1093/humrep/10.1.50

Yoshida, M., Ishigaki, K., & Pursel, V.G. (1992). Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in-vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 31, 68–71. https://doi.org/10.1002/mrd.1080310112

Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M., & Pursel, V.G. (1993). Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biology of Reproduction*, 49, 89–94. https://doi.org/10.1095/biolreprod49.1.89

Yuan, Y., Hao, Z.D., Liu, J., Wu, Y., Yang, L., Liu, G.S., … Zeng, S.M. (2008). Heat shock at the germinal vesicle breakdown stage induces apoptosis in surrounding cumulus cells and reduces maturation rates of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 70:168-178. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.03.005

Zhao, X.M., Wang, N., Hao, H.S., Li, C.Y., Zhao, Y.H., Yan, C.L., … Zhu, W.B. (2017). Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. *Journal of Pineal Research*, 64(1),12445. https://doi.org/10.1111/jpi.12445

Zhong, R.Z, & Zhou, D.W. (2013). Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(10), 1826-1838. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60412-8

Zuelke, K.A., & Brackett, B.G. (1990). Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biology of Reproduction*, 43, 784–787. https://doi.org/10.1095/biolreprod43.5.784

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

>	:	Büyük
<	:	Küçük
°	:	Derece
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
ACT- β	:	Aktin beta
AKT2	:	RAC-beta serin/treonin-protein kinaz
ATP	:	Adenozin trifosfat
BAX	:	BCL2-Associated X
BCL-2	:	B Cell Lymphoma-2
BSA	:	Sığır Serum Albumin
C	:	Santigrat
$CaCl_2 2H_2O$	:	Kalsiyum Klorid Dihidrat
CAT	:	Katalaz
cDNA	:	Komplementer DNA
CO_2	:	Karbondioksit
COC	:	Kumulus Oosit Kompleksi
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
eCG	:	Equine Koryonik Gonadotropin
EGF	:	Epidermal Büyümü Hormonu
EGFR	:	Epidermal Büyüme Faktörü reseptörü
EtOH	:	Etanol
FBS	:	Fötal Sığır Serum
FCS	:	Fötal Buzağı Serum
FSH	:	Folikül Uyarıcı Hormon
FSHR	:	Folikül Uyarıcı Hormon Reseptörü
g	:	Gram
GADPH	:	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
GDF-9	:	Büyümü Farklılaşma Faktörü-9
GnRH	:	Gonadotropin Salgılayıcı Hormon
GPx	:	Glutatyon Peroksidaz
GSH	:	Glutatyon (Redükte)
GV	:	Germinal Vezikül
H_2O	:	Su molekülü
H_2O_2	:	Hidrojen Peroksit
HAS1	:	Hyaluronan Sentaz 1
HAS2	:	Hyaluronan Sentaz 2
hCG	:	İnsan Koryonik Hormon
HSP70	:	Isı şok protein 70
IGF-1	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IVC	:	*In Vitro* Embriyo Kültürü
IVF	:	*In Vitro* Fertilizasyon
IVEP	:	*In Vitro* Embriyo Kültür
IVM	:	*In Vitro* Maturasyon
KCl	:	Potaasyum Klorür
LH	:	Luteinleştirici Hormon
LHR	:	Lüteinizan Hormon Reseptörü

M	:	Molar
MAPK	:	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MEM	:	Minimal Esansiyel Medyum
MEM-non	:	Non-Minimal Esansiyel Medyum
mg	:	Miligram
$MgCl_26H_2O$	:	Magnezyum Klorid Hegzahidrat
MI	:	Metafaz I
MII	:	Metafaz II
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolae
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
Na_2HPO_4	:	Disodyum Fosfat
NaCl	:	Sodyum Klorür
NaH_2PO_4	:	Sodyum Fosfat
$NaHCO_3$	:	Sodyum Bikarbonat
ng	:	Nanogram
nm	:	Nanometre
O_2	:	Oksijen Molekülü
O_2^-	:	Süperoksit Radikali
OPU	:	Oosit toplanması
OS	:	Oksidatif Stres
p53	:	Tümör Protein 53
PB	:	Polar Cisimcik
PBS	:	Fosfat Tamponlu Çözelti
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksitonu
Polg2	:	DNA Polimeraz Gama 2
PRDX	:	Peroksiredoksin
PTX3	:	Anti-Pentraksin 3
RNA	:	Ribonükleik Asit
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	:	Dakikadaki Devir Sayısı
SIRT1	:	Sirtuin 1
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
SOF	:	Sentetik Oviduk Sıvısı
SPKH1	:	Sfingozin Kinaz 1
SS	:	Koyun serumu
TCM 199	:	Tissue Culture Medium

8. EKLER

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

Sayı: B.30.2.ULU.0.8Z.00.00/152 12.10.2021

Konu: Araştırma Projeniz

Sayın Doç. Dr. Selim ALÇAY

Yürütücüsü olduğunuz "*Koyunlarda in vitro maturasyon sırasında uygulanan melatonin hormonunun sıcaklık stresi üzerine etkisinin genom çapında incelenmesi*" isimli çalışmanız Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 12.10.2021 tarihli toplantısında görüşülmüş olup kurul kararı ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

[redacted]

Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY
HADYEK Başkanı

EK-1

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

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	*Koyunlarda in vitro maturasyon sırasında uygulanan melatonin hormonunun sıcaklık stresi üzerine etkisinin genom çapında incelenmesi*
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Doç. Dr. Selim ALÇAY BUÜ Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Dokt. Öğr. Ahmet AKTAR
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Ahmet AKTAR'ın Doktora Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	Aralık 2021 – Aralık 2024
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	5 Adet Erkek Koyun

	Belge Adı	Tarihi
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	04.10.2021

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2021 - 13 / 03	Tarih : 12.10.2021
	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 araştırıcıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırıcılarda değişiklik 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 Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza Kabul	İmza Ret	Düşünceler
Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY Başkan	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H	[redacted]		
Prof. Dr. Erdoğan ŞENDEMİR Üye	Tıp- Anatomi	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H	[redacted]		
Dr.Öğr. Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H	[redacted]		
Prof. Dr. Veli Yılgör ÇIRAK Üye	Veteriner-Parazitoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H	[redacted]		
Prof. Dr. Özgür ÖZYİĞİT Üye	Veteriner-Patoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H	[redacted]		
Prof. Dr. Aydın İPEK Üye	Ziraat- Zootekni	Ziraat Fakültesi	☐ E ■ H	[redacted]		
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ■ H	[redacted]		
Asiye Işıl SEZER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Diş Hekimi	☐ E ■ H	[redacted]		
Filiz TORUN Üye	Sivil Üye	Emekli	☐ E ■ H	[redacted]		
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	BUÜ-DEHYUAM	☐ E ■ H	[redacted]		

9. TEŞEKKÜR

Sayın Prof. Dr. Selim ALÇAY, değerli bölüm hocalarım, sevgili doktora arkadaşlarım ve kıymetli ailem,

Bugün burada sizlere minnettarlığımı ifade etmekten büyük mutluluk duyuyorum. Bu uzun ve zorlu yolculukta bana destek olan herkese içtenlikle teşekkürlerimi sunuyorum.

Öncelikle, sayın hocam Prof. Dr. Selim ALÇAY, sizin rehberliğiniz ve desteğiniz olmadan bugün burada olamazdım. Bilginiz, sabrınız ve yönlendirmeleriniz, bu çalışmayı şekillendiren temel taşlar oldu. Akademik kariyerime yaptığınız katkılar ve bana kazandırdığınız değerli bilgiler için size sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bölüm hocalarım, Prof. Dr. M. Kemal SOYLU, Prof. Dr. İbrahim DOĞAN, Prof. Dr. Ülgen GÜNAY, Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA, Prof. Dr. Zekariya NUR ve Prof. Dr. Burcu ÜSTÜNER, her birinizin dersleri ve öğretileri, bilgi birikimimi ve araştırma yeteneklerimi geliştirmemde büyük rol oynadı. Akademik dünyada karşılaştığım her zorlukta, sizlerin öğretileri ve tavsiyeleri bana yol gösterdi. Her birinize ayrı ayrı teşekkür ederim.

Doktora arkadaşlarım, M. Melih YILMAZ, Hasan ÖZKAN, Kemal BAĞCI, Oğuzhan HÜRAYDIN, Tugaycan ÇİMEN ve Dr. M. Berk TOKER bu zorlu süreçte birlikte çalışmak, birlikte öğrenmek ve birbirimize destek olmak büyük bir şans ve mutluluktu. Paylaştığımız anılar, tartışmalar ve birlikte geçirdiğimiz zamanlar, bu süreci daha anlamlı ve değerli kıldı. Sizlere desteğiniz ve arkadaşlığınız için teşekkür ederim.

Ve son olarak, canım ailem. Bu yolculuğun en büyük destekçileri sizler oldunuz. Her zaman yanımda oldunuz, beni cesaretlendirdiniz ve sabırla bana katlandınız. Sizin sevginiz ve desteğiniz olmadan bu başarıyı elde edemezdim. Sizlere minnettarım ve sizleri çok seviyorum.

Bu teşekkür konuşmasının sonunda, her birinizin katkısı ve desteği, bu çalışmanın başarıya ulaşmasında büyük rol oynadı. Hepinize en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

10. ÖZGEÇMİŞ

[redacted] yılında [redacted] doğdu. İlk ve orta okulu [redacted] okudu. [redacted] nde ilk üç yılı okuduktan sonra son yıl açıköğretime geçiş yaparak 2011 yılında liseden mezun oldu. 2011 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi' ni kazandı ve 2017 yılında mezun oldu. 2018 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı'nda doktora programına başladı. 2020-2024 yılları arasında YÖK 100/2000 Moleküler Biyoloji ve Genetik (Gen Tedavisi ve Genom Çalışmaları) öncelikle alanda bursiyer olarak görev almıştır. Ayrıca ek olarak Anadolu Üniversitesinde Sağlık Yönetimi bölümünü okumaya devam etmektedir.