



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO ÜRETİMİNDE KURKUMİN VE TİMOKİNON
ETKİNLİĞİ**

Hatice ŞENLİKCİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ**

Veterinerlik Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

Veterinerlik Dölerme ve Suni Tohumlama (DR)

Aralık, 2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Hatice ŞENLİKCİ tarafından, **Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ** danışmanlığında hazırlanan “**İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO ÜRETİMİNDE KURKUMİN VE TİMOKİNON ETKİNLİĞİ**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **13/12/2024** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

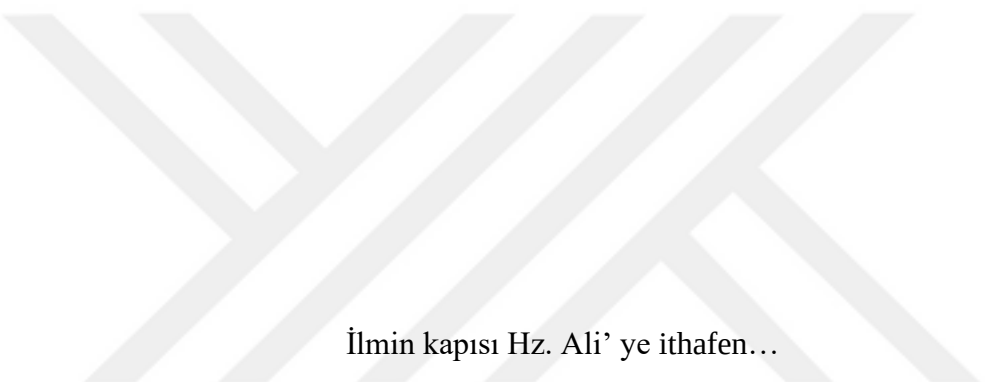
Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Alper BARAN İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Sinem Özlem ENGİNLER İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Muzaffer TAŞ Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi	☒ Kabul ☐ Ret

	Dölerme ve Suni Tohumlama	
	Anabilim Dalı	
	Prof. Dr. Yavuz	
	ÖZTÜRKLER	☒
ÜYE	Kafkas Üniversitesi	Kabul
	Dölerme ve Suni Tohumlama	☐
	Anabilim Dalı	Ret







İlmin kapısı Hz. Ali' ye ithafen...

BÜTÇE DESTEKLERİ

İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO ÜRETİMİNDE KURKUMİN VE TİMOKİNON ETKİNLİĞİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 34520

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimine başlamamda büyük katkısı olan, eğitim sürecim boyunca her koşulda maddi ve manevi desteğini asla esirgemeyen, alanıma dair kurduğum her cümlede hakkı olan değerli hocam Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ' a ve doktora eğitimim boyunca teorik ve uygulama olarak takıldığım her noktada bıkmadan usanmadan bana bildiği her şeyi aktaran, mental ve fiziksel desteğiyle her daim yanımda olan doktora ablam Doç. Dr. Asiye İzem SANDAL' a çok çok teşekkür ederim.

Başta Anabilim Dalı başkanım Prof. Dr. Kemal AK olmak üzere tez izleme komitesi hocalarım Prof. Dr. Alper BARAN ve Prof. Dr. Sinem Özlem ENGİNLER hocalarıma ve eğitiminde katkıları bulunan Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Sorularımı cevapsız bırakmayan ve doktora eğitimim süresince keyifli vakit geçirmemde büyük katkısı olan Dr. Öğr. Üyesi Ramazan ARICI'ya ve laboratuvar çalışmalarında hiçbir isteğimi geri çevirmeyen ve desteklerini asla esirgemeyen Lbrnt. Ayşenur ÖZDEMİRAL ÇAKIR'a çok teşekkür ederim

Deneysel çalışmaların boyunca analizlerimi yapmamda büyük katkıları olan Dr. Öğr. Üyesi Ayça ÜVEZ ve Arş. Gör. Dr. Merve YILMAZER'e ve verilerimin istatistiksel değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Bülent EKİZ ve Arş. Gör. Dr. Barış SANDAL'a çok çok teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım için bıkmadan usanmadan beni mezbahaya taşıyan kardeşim Hüseyin ŞENLİKCİ başta olmak üzere, maddi ve manevi desteklerini asla esirgemeyen babam Ata ŞENLİKCİ, annem Cemile ŞENLİKCİ ve kardeşlerim Ali ve Nur, Fatma, Zeynep, Muhammed Rıza ŞENLİKCİ'ye ailemizin minik üyesi Akça'ya ve bu yolda beni yalnız bırakmayan tüm dostlarıma gönülden teşekkür ederim.

Aralık 2024

Hatice ŞENLİKCİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BÜTÇE DESTEKLERİ	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	5
2.1. EMBRİYO ÜRETİMİNİN TARİHÇESİ	5
2.2. SIĞIRLARDA EMBRİYO OLUŞUMUNUN FİZYOLOJİSİ.....	8
2.2.1. İn Vivo Oosit Olgunlaşması.....	8
2.2.2. Fertilizasyon ve Embriyo Oluşumu	10
2.3. SIĞIRLARDA İN VİTRO EMBRİYO ÜRETİMİ.....	11
2.4. İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO ÜRETİMİNDE ANTiOKSİDANLARIN ÖNEMİ	13
2.4.1. Kurkumin	17
2.4.2. Timokinon	18
2.5. İN VİTRO MATURASYON ANALİZLERİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER ...	20
2.5.1. Biyokimyasal Analizler.....	20
2.5.2. DNA Analizleri	21
2.5.3. İmmunohistokimyasal Analizler	22
2.6. EMBRİYO DONDURMA YÖNTEMLERİ VE KRİYOPROTEKTANLAR.....	25
3. YÖNTEM	28
3.1. OOSİTİN ELDE EDİLMESİ.....	28
3.2. OOSİTLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	30

3.3. OOSİTLERİN İN VİTRO OLGUNLAŞTIRILMASI.....	30
3.4. DENEYSEL ÇALIŞMALARIN PLANI.....	32
3.5. OLGUNLAŞAN OOSİTLERİN DONDURULMUŞ SPERMA İLE DÖLLENMESİ.....	32
3.6. DÖLLENEN OOSİTLERİN KÜLTÜR MEDYUMUNA AKTARILMASI.....	36
3.6.1. Kültür Medyumunun Hazırlığı.....	36
3.6.2. Kültür Medyumuna Aktarma	38
3.7. KÜLTÜRE AKTARILAN EMBRİYOLARIN BÖLÜNMELEİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	39
3.8. GELİŞEN EMBRİYOLARIN DONDURULMASI.....	41
3.9. DONDURULAN EMBRİYOLARIN ERİTİLMESİ, KÜLTÜRE EDİLMESİ VE GELİŞİMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	43
3.10. OLGUNLAŞMA ANALİZLERİ İÇİN OOSİTLERİN AYRILMASI.....	45
3.10.1. Hücre İçi Oksidasyon Analizi	45
3.10.2. İmmünohistokimyasal Analizler	46
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	50
4. BULGULAR	51
4.1. SOF VE CR1 MEDYUMLARINDA GELİŞTİRİLEN EMBRİYOLARA AİT BULGULAR.....	53
4.2. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE ELDE EDİLEN BULGULAR	60
4.3. AKTİF KASPAZ 3'ÜN APOPTOTİK İNDEKS (%) DEĞERLENDİRİLMESİNDEN ELDE EDİLEN BULGULAR	61
4.4. KONNEKSİN 43'E AİT H-SKOR DEĞERLENDİRİLMESİNDE ELDE EDİLEN BULGULAR.....	62
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR.....	79
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	97
ETİK KURUL İZİN YAZISI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KURUM İZNİ YAZILARI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1: Mezbahadan elde edilen sığır ovaryumları.....	29
Şekil 3.2: Doğrama metodu ile elde edilecek oositlerin laboratuvar görseli	29
Şekil 3.3: Olgunlaşmamış (Immature) sığır oositleri.....	30
Şekil 3.4: Olgunlaşmış (mature) sığır oositleri (a: genişlemiş kumulus hücreleri).....	32
Şekil 3.5: SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen 2 ve 4 blastomerli embriyolar.	39
Şekil 3.7: A: Expanded blastosistler, B: Hatching blastosist.....	39
Şekil 3.7: SOF medyumunda geliştirilen embriyolar.....	40
Şekil 3.8: 8. günde kaydedilen hatched embriyolar.	40
Şekil 3.9: Blastosist aşamasına ulaşan embriyoların dondurma esnasında VS1 medyumuna aktarılması	42
Şekil 3.10: Dondurulan embriyoların eritme sırasında 0,5 M süktroz içeren vitrifikasyon temel solüsyonu içerisine aktarılması.....	43
Şekil 3.11: Dondurulan ve eritilen embriyoların 24. saat kontrolünde gelişmiş expanded blastosist	44
Şekil 3.12: CR1aa medyumunda geliştirilen embriyoların dondurma eritme sonrası hatched blastosist görüntüsü	45
Şekil 3.13: Spektrofotometre (Bio-tek FLx800)	46
Şekil 3.14: Analiz için lizinli lama fikse edilen kumulus-oosit kompleksi	47
Şekil 3.15: Tüm gruplara ait olgunlaşmış oosit-kumulus komplekslerinde hücre sitoplazmalarının aktif kaspaz-3 reaksiyonu	48
Şekil 3.16: Tüm gruplara ait olgunlaşmış oosit-kumulus komplekslerinde hücre sitoplazmalarının konneksin 43 reaksiyonu görüntüleri.....	49
Şekil 4.1: SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen 2,4 ve 8 blastomerli embriyolar	52
Şekil 4.2: A: SOF medyumunda geliştirilmiş erken blastosist ve expanded blastosist embriyo B: CR1aa medyumunda geliştirilmiş blastosist ve expanded blastosist embriyolar	52

Şekil 4.3: CR1aa medyumunda kültüre edilen embriyoların 7. günde erken blastosist, blastosist, expanded ve hatching blastosist aşamalarındaki görüntüsü	57
Şekil 4.4: CR1aa medyumunda kültüre edilen 8. gündeki hatched blastosist embriyo	57
Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonda kurkumin ve timokinon uygulanmış ve uygulanmamış kontrol grubu hücrelerde karşılaştırılmalı hücre içi oksidasyon miktarının tek yönlü varyans analizi	60
Şekil 4.6: Tüm gruplara ait oosit-kumulus kompleksi örneklerinde aktif kaspaz-3 indeks (%) değerleri.	62
Şekil 4.7: Tüm gruplara ait oosit-kumulus kompleksi örneklerinde Konneksin 43 (H-Skor) değerleri.	63



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS)	28
Tablo 3.2: Oosit Yıkama Medyumu (OYM-OWM)	29
Tablo 3.3: Medyumlar için Hazırlanan Stok Solüsyonları	29
Tablo 3.4: İn Vitro Olgunlaşma Medyumu (IVM)	31
Tablo 3.5: İn Vitro Fertilizasyon Medyumu Stok Solüsyonu (IVF TALP-Stok).....	33
Tablo 3.6: IVF-TALP Medyumu.....	33
Tablo 3.7: PHE Stok Solüsyonu	34
Tablo 3.8: Sperma Yıkama Medyumu Stok Solüsyonu (Sperm TALP)	35
Tablo 3.9: Sperm-TALP Medyumu.....	35
Tablo 3.10: CR1aa Kültür Medyumu Stok Solüsyonları.....	36
Tablo 3.11: SOF Kültür Medyumu.....	37
Tablo 3.12: CR1aa Kültür Medyumu	38
Tablo 3.13: Vitrifikasyon Medyumunun Temel Solüsyonu (PBS-TS)	41
Tablo 3.14: Ekilibrasyon, Vitrifikasyon ve Dondurma-Eritmede Kullanılan Medyumları.....	41
Tablo 4.1: Doktora tez çalışmasında analizlerde kullanılan oosit sayısı	51
Tablo 4.2: SOF medyumunda kültüre edilen embriyoların bölünme, blastosist, expanded blastosist hatching ve hatched blastosist aşamasına ulaşma yüzdeleri.....	53
Tablo 4.3: CR1aa medyumunda kültüre edilen embriyoların bölünme, blastosist, expanded blastosist, hatching ve hatched blastosist aşamasına ulaşma yüzdeleri.....	54
Tablo 4.4: Kontrol grubu için SOF ve CR1aa medyumlarında embriyo gelişim oranlarının karşılaştırılması.....	55
Tablo 4.5: K5 grubu için SOF ve CR1aa medyumlarında embriyo gelişim oranlarının karşılaştırılması.....	55

Tablo 4.6: K10 grubu için SOF ve CR1aa medyumlarında embriyo gelişim oranlarının karşılaştırılması.....	56
Tablo 4.7: T10 grubu için SOF ve CR1aa medyumlarında embriyo gelişim oranlarının karşılaştırılması.....	56
Tablo 4.8: T20 grubu için SOF ve CR1aa medyumlarında embriyo gelişim oranlarının karşılaştırılması.....	57
Tablo 4.9: SOF medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi	58
Tablo 4.10: CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi	58
Tablo 4.11: Kontrol grubu için SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi	59
Tablo 4.12: K5 grubu için SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi.....	59
Tablo 4.13: K10 grubu için SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi.....	59
Tablo 4.14: T10 grubu için SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi.....	59
Tablo 4.15: T20 grubu için SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi.....	59
Tablo 4.16: Tüm gruplara ait oosit-kumulus kompleksi örneklerinde aktif kaspaz-3 İndeks (%) sonuçlarına ait ortalama $\pm$ standart hata değerleri	61
Tablo 4.17: Tüm gruplara ait oosit-kumulus kompleksi örneklerinde Konneksin 43 (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama $\pm$ standart hata değerleri	62

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
AO/EB	: Akridin Turuncu/Etidyum Bromür
ATP	: Adenozin trifosfat
BCB	: Brilliant Cresyl Blue
BECM	: Beltsville Embryo Culture Medium
BO	: Bracket and Oliphant medium
BSA	: Sığır Serum Albümini
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CASA	: Computer Assisted Sperm Analyser
CAT	: Katalaz
CDK1	: Siklin Bağımlı Kinaz 1
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CO₂	: Karbondioksit
CR1aa	: Charles Rosencrans
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DCHF-DA	: Diklororohidro-floresein diasetat
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EG	: Etilen glikol
FCS	: Fötal Buzağı Serum
GPx	: Glutasyon peroksidaz
gr	: Gram
GSH	: Glutasyon
GSR	: Glutasyon redüktaz
GV	: Germinal vezikül
GVBD	: Germinal vezikül parçalanması

IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
IVK	: İn Vitro Kültür
IVM	: İn Vitro Maturasyon
KSOM	: Potasyumla optimize edilmiş basit medyum
L	: Litre
LDL	: Düşük dansiteli lipoproteini
LH	: Luteinize Edici Hormon
M	: Molar
mg	: miligram
MII	: Metafaz II
miRNA	: MikroRNA
mM	: Milimolar
MPF	: Olgunlaşmayı Teşvik Edici Faktör
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
N₂	: Azot
O₂	: Oksijen
°C	: Santigrat derece
OPU	: Ovum Pick Up
OTT	: Oosit Toplama Tekniği
OWM	: Oosit Yıkama Medyumu
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu
PBS-TS	: Vitrifikasyon Temel Solüsyonu
PI	: Propidyum İyodür
PKC	: Protein Kinaz C
PVA	: Polivilinalkol
ROT	: Reaktif Oksijen Türevleri
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SCNT	: Somatik Hücre Nükleus Transferi
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOF	: Sentetik Ovidukt Sıvısı
TALP	: Tyrode's medium base, albumin, laktat ve pirüvat
TCM 199	: Doku Kültürü Medyumu 199
TUNNEL	: TdT Aracılı dUTP Nick end Labeling

VS1	: Vitrifikasyon Solüsyonu-1
VS2	: Vitrifikasyon Solüsyonu-2
µg	: mikrogram
µL	: mikrolitre
µM	: Mikromolar



ÖZET

[DOKTORA TEZİ]

[İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO ÜRETİMİNDE KURKUMİN VE TİMOKİNON ETKİNLİĞİ]

[Hatice ŞENLİKÇİ]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

Veterinerlik Dölerme ve Suni Tohumlama (DR)

[Danışman : Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ]

Dünyada sığır *in vitro* kültür ve embriyo transferi çalışmaları hızla devam etmektedir. Antioksidan maddelerin hücre koruyucu, DNA fragmentasyonunu inhibe edici etkileri saptanmasına rağmen embriyo üretimindeki bu pozitif etkileri halen araştırma aşamasındadır. Kurkumin ve timokinonun reaktif oksijen türlerinin negatif etkisini azaltıcı, hücre yenileyici, DNA fragmentasyonunu inhibe edici, apoptozu baskılayıcı, antiproliferatif, antikarsinojenik, antiinflamatuvar etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu doktora tez projesinde kurkumin ve timokinonun *in vitro* sığır embriyo üretimine olan etkilerinin saptanması amaçlanmıştır. Çalışmada oositler mezbahadan toplanan ovaryumlardan kazanılmıştır. *In vitro* olgunlaşma için oositler 5 ve 10 µM kurkumin ile 10 ve 20 µM timokinon içeren veya içermeyen *in vitro* maturasyon (IVM-TCM199) medyumunda olgunlaştırılmıştır. İn vitro fertilizasyon (IVF-TALP) medyumunda döllen ve zigot olduğu düşünülen embriyolar SOF ve CR1aa medyumuna aktararak embriyo gelişimleri kaydedilmiştir. Blastosist aşamasına kadar ulaşan embriyolar dondurulmuş ve eritme sonrası canlılıkları kontrol edilmiştir. Olgunlaşma analizleri için ayrılan oositler hücre içi oksidasyon, kaspaz-3 ve konneksin 43 analizleri ile değerlendirilmiştir. Tüm deneysel çalışmaların sonunda SOF ve CR1 medyumlarında gruplar arasında toplam embriyo oranlarında fark saptanmazken, CR1 medyumunda yarıklanma oranı

T10 grubunun lehine olmak üzere istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Hücre içi oksidasyon analizinde gruplar arasında fark yokken, aktif kaspaz-3 testinde kontrol grubuyla kıyaslandığında K5, K10, T10 ve T20'nin lehine olmak üzere kaspaz-3 seviyesinin istatistiki olarak önemli düzeyde düştüğü tespit edilmiştir ($p<0,05$). Konneksin 43 analizinde ise T10 grubu kontrol ile paralel sonuçlar verirken, K5 $p<0,05$ düzeyinde, K10 ve T20 ise $p<0,001$ düzeyinde kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Çözdürme sonrası kültüre edilen embriyoların canlılıkları değerlendirildiğinde, SOF medyumunda K5 grubunun aleyhine olmak üzere istatistiksel fark saptanmıştır. Sonuç olarak, kurkumin ve timokinonun antioksidan olarak *in vitro* olgunlaşmada oosite destek olduğu düşünülse de 8. günün sonunda embriyo gelişimlerinde gruplar arasında fark saptanmayışı, oositin antioksidanlara kısa süreli maruz kalınmasına bağlanmış ve bu maddelerin *in vitro* kültüre de ilave edilerek analizlerin yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.]

Aralık 2024 , [123] sayfa.

Anahtar kelimeler: [kurkumin, timokinon, kaspaz-3, konneksin 43, sığır embriyo]

ABSTRACT

[Ph.D. THESIS]

[ROLE OF CURCUMIN AND THYMOQUINONE ON *IN VITRO* BOVINE EMBRYO PRODUCTION]

[Hatice ŞENLİKÇİ]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Reproduction and Artificial Insemination

Reproduction and Artificial Insemination (DR)

[Supervisor : Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ]

[Bovine *in vitro* culture and embryo transfer research continues rapidly in the world. Although antioxidant substances have been found to protect cells and inhibit DNA fragmentation, their positive effects on embryo production are still under investigation. Curcumin and thymoquinone are known to have antiproliferative, anticarcinogenic, anti-inflammatory, cell regenerative, DNA fragmentation inhibitory, apoptosis suppressive, antiproliferative, anticarcinogenic and anti-inflammatory effects. In this doctoral thesis project, it was aimed to determine the effects of curcumin and thymoquinone on bovine embryo production *in vitro*. In the study, oocytes were obtained from ovaries collected from slaughterhouse. For *in vitro* maturation, oocytes were matured in *in vitro* maturation (IVM-TCM199) medium with or without 5 and 10 µM curcumin and 10 and 20 µM thymoquinone. Embryos fertilized in *in vitro* fertilization (IVF-TALP) medium and presumed to be zygotes were transferred to SOF and CR1aa medium and embryo development was recorded. Embryos that reached the blastocyst stage were frozen and their viability was checked after thawing. Oocytes separated for maturation assays were evaluated for intracellular oxidation, caspase-3 and connexin 43 assays.]

At the end of all experimental studies, there was no difference in total embryo ratios between the groups in SOF and CR1 media, while cleavage rate in CR1 media was found to be statistically significant in favor of the T10 group. While there was no difference between the groups in the intracellular oxidation analysis, it was determined that the caspase-3 level decreased statistically significantly in favor of K5, K10, T10 and T20 compared to the control group in the active caspase-3 test ($p<0.05$). In connexin 43 analysis, while T10 group gave parallel results with the control group, K5 was statistically significant at $p<0.05$ level, K10 and T20 were statistically significant at $p<0.001$ compared to the control group. When the viability of the embryos cultured after thawing was evaluated, a statistical difference was found in the SOF medium, to the detriment of the K5 group. In conclusion, although curcumin and thymoquinone are thought to support the oocyte in *in vitro* maturation as antioxidants, the lack of difference between the groups in embryo development at the end of the 8th day was attributed to the short-term exposure of the oocyte to antioxidants and it was concluded that these substances should be added to *in vitro* culture and analyzes should be performed. |

December 2024, [123] pages.

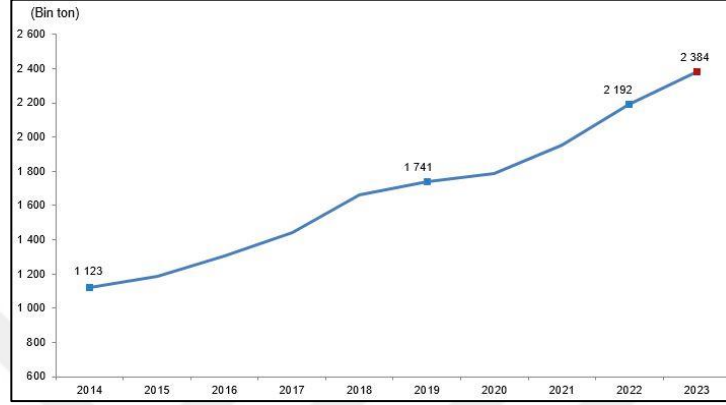
Keywords: [curcumin, thymoquinone, caspase-3, connexin 43, bovine embryo]

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artışı, küresel iklim değişikliği, ekolojik dengede yaşanan bozulmalar, savaşlar ve kontrolsüz tüketim, yeryüzündeki gıda kaynaklarının sürekli azalmasına sebep olmakta, bu durum da bitkisel ve hayvansal gıdanın üretimine olan ihtiyacı her geçen gün daha da arttırmaktadır (www.wwf.org.tr, Erişim tarihi: 12.05.2024). Küresel bir ihtiyaç haline gelen ve stratejik öneme sahip olan gıdanın, tüm canlıların ihtiyacını karşılayacak seviyeye ulaşması için biyoteknolojik yöntemlerin yaygınlaştırılması gerekmektedir. Bu sebeple bilim insanları hem tarım hem de hayvancılık alanında uygulanabilir tüm biyoteknolojik yöntemleri geliştirmeye yönelik çalışmalarını devam ettirmektedir. Özellikle hayvancılık alanında suni tohumlamadan başlayarak embriyo transferi, transgenezis ve genom düzenlemeye kadar değişen yardımcı üreme teknolojilerindeki atılımlar, hayvansal gıdaların üretimini ve katma değerini artırmak için başarıyla gerçekleştirilmektedir (Birbal ve diğ., 2019). 1981 yılında, ilk kez *in vitro* olarak elde edilen embriyonun transferi sonucu dünyaya gelen buzağıdan sonra *in vitro* embriyo üretimi yaygınlaşmış ve sığır endüstrisini ekonomik olarak oldukça etkilemiştir. Genetik olarak üstün verim özelliklerine sahip ineklerden daha fazla sayıda yavru elde etmek ve iki nesil arasında geçen süreyi azaltmak için kullanılan *in vitro* embriyo üretimi, sığırlarda genetik gelişimi hızlandırma potansiyeli yüksek bir üreme biyoteknolojisi olmakla birlikte embriyoloji alanının gelişimi için de önemli bir araştırma aracıdır (Camargo ve diğ., 2006, Tribulo ve diğ., 2019).

Ülkemizin artan nüfusu hayvansal gıdaya olan talebi artırmakta ve hayvansal gıda ihtiyacı gündemini korumaktadır. Dünya ile karşılaştırıldığında ülkemizde kişi başına düşen süt ve et tüketimi oldukça düşüktür. Ayrıca büyük baş (sığır, manda) hayvan sayısı yaklaşık 17 milyon ve küçük baş (koyun, keçi) ise yaklaşık 53,5 milyon kadardır. Kırmızı et üretimi yaklaşık 2,5 milyon ton, süt üretimi ise 21,5 milyon ton civarındadır. 2023 yılında kırmızı et üretiminin %70,1'ini sığır eti, %23,9'unu koyun eti, %5,4'ünü keçi eti ve %0,6'sını manda eti oluşturmuştur (data.tuik.gov.tr., Erişim tarihi: 12.05.2024) (**Şekil 1.1**). Tarım ve Orman Bakanlığı verilerine göre 2022 yılında kişi başına düşen toplam kırmızı et 23,9 kg'dır. İthalat miktarı 2170 ton ve

ihracatı ise 2617 ton olan büyükbaş etin, üretimi 1 milyon 573 bin ton olarak gerçekleşmiştir (araştırma.tarimorman.gov.tr., Erişim tarihi:12.05.2024). 2023 yılındaki verilere göre sığır eti, kırmızı et üretiminin %70,1'ini kapsarken, koyun eti %23,9'unu, keçi eti %5,4'ünü manda eti ise %0,6'sını oluşturmuştur (**Şekil 1.1**) (data.tuik.gov.tr, Erişim tarihi: 12.05.2024).



Şekil 1.1: Kırmızı et üretim miktarı, 2014-2023 (data.tuik.gov.tr, Erişim tarihi: 12.05.2024).

İstatistiklere bakıldığında hayvan sayısı ve hayvansal gıda üretiminde önceki yıllara oranla artış görülse de nüfusun devamlı artması, farklı sebeplerden dolayı devam eden göç, yılın bazı zamanlarında turizm kaynaklı insan popülasyonunun artması ve üretilen hayvanların verim özelliklerinin yeterli olmayışı, oluşan gıda ihtiyacını karşılayamamaktadır. Bunun yanı sıra pandemi döneminde dünyada ve ülkemizde yem fiyatlarının artması sonucunda birçok küçük yetiştirici maliyetleri karşılayamamış, inek ve düvelerini kestirmek zorunda kalmışlardır. Dolayısıyla canlı damızlık hayvan, karkas et ve süt tozu ithalatına gereksinim duyulmaktadır. Mecburen yapılan ithalat, yüksek maliyetler dolayısıyla et ve süt fiyatlarında artışa ve bu ekonomik koşullarda halkın et ve süt tüketiminin azalmasına ve milyarlarca döviz kaybına sebep olmaktadır. Hayvansal gıda kaynaklarının temininde dışa bağımlılığın ortadan kaldırılması ve kısa vadede istenilen verim özelliklerine sahip damızlık hayvanlardan elit sürü elde edilmesi ancak reproduktif biyoteknoloji yöntemlerinin sahada uygulanabilirliğinin artırılmasıyla mümkündür. Embriyo transferi, çok kısa sürede istenilen özellikte, damızlık değeri yüksek anne ve babanın yavrularından oluşan elit sürünün elde edilebilmesini sağlayan en önemli biyoteknolojik yöntemdir (Özdaş ve Baran, 2015; Sandal ve diğ., 2015; Ealy ve diğ., 2019). Bu teknolojilerin sunduğu başlıca avantajlar arasında, *in vivo* ve *in vitro* oosit toplama yöntemleri ile bir uygulamada fazla sayıda embriyo ve transferi ile gebelik eldesi, yüksek verim indeksli genomik buzağılar ile elit sürü oluşturulması, donör olabilecek potansiyelde dişi hayvan sayısının çeşitliliği ile nitelikli oosit eldesi sağlamak, embriyo üretmek için gereken

spermatozoona olan ihtiyacın özellikle *in vitro* fertilizasyon yöntemi ile azalması ve istenilen cinsiyette yavru elde edilmesi sayılabilir (Ferré ve diğ., 2020a). Bu da *in vitro* ve *in vivo* elde edilen embriyoların transferinin sığır endüstrisi için önemini yeniden gözler önüne sermektedir.

Günümüzde embriyo transferi artık ticari bir sektör haline gelmiştir. Dünya çapında, *in vivo* ve *in vitro* üretilen ve transfer edilen embriyo sayısı ortalama 1,5 milyon olup ilk kez *in vitro* embriyo transfer sayısı 1 milyonu aşmıştır. *In vitro* üretilen embriyolar, 2021'de tüm transfer edilebilir sığır embriyolarının %79,7'sini oluşturduğu, *in vitro* üretilen embriyo sayısının *in vivo* elde edilen embriyo sayısını aştığı rapor edilmiştir (Ferré ve diğ., 2020a; Viana, www.iets.org., Erişim tarihi:12.05.2024). Dünya genelinde embriyo üretimi ve transferi hızla devam ederken ülkemizde sahada kullanımı henüz istenilen düzeyde değildir. Sığırlarda embriyo transferi ülkemizde ilk olarak 1986'da anabilim dalımız emekli öğretim üyesi Prof. Dr. İ.Kamuran İleri önderliğinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, 1989'da Lalahan Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde dondurulmuş sığır embriyo transferi ile sağlıklı yavru elde edilmiş ve 2005 yılında *in vitro* olarak üretilen embriyoların transferi ile sağlıklı bir yavrunun doğduğu rapor edilmiştir (Kara ve Bekyürek, 2020). Fakat tüm bu çalışmalar embriyonun üretimini ve transferinin sahada yaygınlaşmasına imkân sağlayamamış ve günümüze dek daha çok laboratuvar çalışması olarak devam edebilmiştir. Bunların yanı sıra son yıllarda laboratuvar çalışmalarıyla beraber yükselen ivmeyle *in vitro* ve *in vivo* embriyo üretimi, dondurulması, transferi ve ülkeler arası aktarımı üzerine çalışmalar devam etmektedir. 2022 yılında 16. Azerbaycan Uluslararası Tarım Fuarı'nda topraklarımızda üretilen ve dondurulan Holstein ırkı embriyolar ilk kez, Prof. Dr. Yavuz Öztürkler, Prof. Dr. Cihan Kaçar ve Dr. Uğur Kara tarafından transferi gerçekleştirilmiştir ve Azerbaycan'da bulunan simental ırkı taşıyıcı ineklere nakledilmiştir (Öztürkler ve Kaçar, 2023). 2023 yılında tamamlanan Prof. Dr. Cihan Kaçar yürütücülüğünde “Zavot ırkı İneklerde Embriyo Transfer Çalışmaları” başlıklı proje ile ırka ait gen materyali temini sağlanmış ve iki adet sağlıklı Zavot ırkı buzağı elde edilmiştir (www.aa.com.tr., Erişim tarihi:01.12.2024). Bu çalışmaların yanı sıra Prof. Dr. Yavuz Öztürkler yürütücülüğünde sığır embriyosu üzerine halen devam eden “Dondurulmuş-Çözdürülmüş Beefmaster Sığır Embriyolarının Transfer Başarısına Bazı Faktörlerin ve Farklı Senkronizasyon Protokollerinin Etkisinin Araştırılması” başlıklı proje ve ülkemize getirilen Beefmaster ırkı embriyolar üzerine çalışmalar yapılmış, işlemlerin maliyeti hesaplanarak ekonomik değeri ortaya konulmuş, ülkemiz için dondurulmuş embriyo transferinin avantajlı olduğu kanısına varılmıştır. Embriyo transferi çalışmalarının hayvancılığımız adına ne derece

önem arz ettiği gözler önüne serilmiştir (Öztürkler ve diğ., 2022a). Ayrıca henüz yayınlanmamış verilerimize göre 2021-2022 yıllarında Hatice ŞENLİKÇİ, Asiye İzem SANDAL ve Özen Banu ÖZDAŞ'ın İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı bünyesindeki IVF-ET laboratuvarında ürettikleri embriyoların, senkronize edilmiş ve tekrarlı suni tohumlama ile gebe kalamamış düvelere transferi ile %90 gebelik ve %50 ikizlik elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar umut verici olsa da sahada halen istenilen yaygınlığa ulaşamadığı düşünüldüğünde, üreme biyoteknolojinin en değerlilerinden olan embriyo üretimi, dondurulması ve transferi üzerine olan araştırmaların devam etmesi gerekmektedir.

Sığır, at ve domuz gibi çiftlik hayvanı türlerinde *in vitro* embriyo üretim teknolojisinin verimliliğini ortaya koyan en büyük kriter olan olgunlaşmamış oositlerin blastosist aşamasına ulaşma oranı nadiren %30-40 eşliğini aşmaktadır (Rizos ve diğ., 2008). Bu da *in vitro* olgunlaşma, döllenme ve kültürünün ardından olgunlaşmasını tamamlayamayan oositlerin oranının oldukça yüksek olduğu anlamına gelmektedir (Aguila ve diğ., 2020). Dolayısıyla araştırmacılar, embriyo transferi ile sağlıklı yavrular elde etmek için *in vitro* kültür koşullarını iyileştirme çalışmalarına hızla devam etmektedir. Yapılan çalışmalar sonunda elde edilen modifiye medyumlar ile hem başarı oranları artmakta hem de patent ürünleri geliştirilmektedir. Son yıllarda bu amaçla çeşitli antioksidanların (sisteamin, sistin, L-Ergothioneine, β -merkaptotanol, kuersetin, karnitin, resveratrol, crocetin, propolis vs), protein kaynaklı maddelerin (Sığır Serum Albümini (BSA), Fötal Buzağı Serum (FCS)), hormonların ve büyüme faktörlerinin *in vitro* embriyo üretimindeki etkinliği araştırılmaktadır (Sandal ve Özdaş, 2015; Enginler ve diğ., 2015; Sovernigo ve diğ., 2017; Diogenes ve diğ., 2017; Dos Santos ve diğ., 2019; Sandal ve diğ. 2021; Öztürkler ve diğ., 2022b). Bu nedenle antioksidanların etkinlikleri, *in vitro* embriyo üretiminin farklı aşamalarında farklı dozlarda medyumlara ilave edilerek deneysel gruplar oluşturulmuş ve incelenmiştir. Kullanılan kimyasalların pozitif yönlü etkileri rapor edilmiş olsa da dünya genelinde bu etkilerin yeterli düzeyde olmadığı saptanmıştır. *In vitro* olgunlaşma, döllenme ve kültür ortamları üzerine yeni antioksidanların etkileri nükleer olgunlaşma, hücre içi oksidasyon varlığı, DNA hasarı tespit yöntemleri ve apoptoz analizleriyle embriyo üretimindeki etkinlikleri araştırılmaktadır. Özellikle farklı dokulara ait hücrelerdeki pozitif etkileri rapor edilen antioksidanların, *in vitro* koşullarda oosit ve embriyo üzerine etkilerinin araştırılması, transfer edilmeye uygun kalitede embriyo üretimine fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. EMBRİYO ÜRETİMİNİN TARİHÇESİ

Reprodüktif biyoteknoloji yöntemlerinin, tüm canlılarda ve özellikle çiftlik hayvan yetiştiriciliğinde yüksek orandaki uygulanabilirliği ve günümüzde rapor edilen başarısının ardında, ilk kez 1677’de kaydedilen spermatozoonun keşfinden bu yana üreme alanındaki bilim insanlarının üstün çalışma azmi ve bilime olan inançları yatmaktadır. Dolayısıyla spermatozoon, oosit ve embriyo üzerine yapılan araştırmaların tarihsel gelişim süreçlerinin izlenmesi, bilim insanlarına her zaman umut olmuş ve hedeflenen deneysel çalışmaların öncüsü olarak devamlılığını sağlamıştır (Clarke, 2006; Ombelet ve Van Robays, 2015).

Yardımcı üreme teknikleri olarak da anılan üreme biyoteknolojisi alanındaki gelişmeler ilk kez spermatozoonun keşfiyle başlamış (1677), köpeklerde ilk suni tohumlama (1780), spermanın soğutulması (1803), tavşanlarda ilk *in vivo* embriyo transferi (1891) ve ilk *in vitro* embriyo üretimi (1912), sığırlarda ilk suni tohumlama (1922), sığırlarda ilk iki blastomerli embriyo elde edilmesi (1930), sığırlarda ilk kez süperovulasyon tekniklerinin uygulanması (1943), gliserol ile sperma kriyoprezervasyonu (1949), dondurulmuş-çözündürülmüş spermadan ilk buzağı doğumu (1952), dondurulmuş-çözündürülmüş embriyodan ilk buzağı doğumu (1973), *in vitro* embriyo ile üretilen ilk buzağının doğumu (1987), akış sitometrisi ile spermanın cinsiyetinin belirlenmesi (1983), Oosit Toplama Tekniği (Ovum Pick Up-OPU) metodunun geliştirilmesi (1988), cinsiyeti belirlenmiş sperma ile ilk buzağı doğuşu (1993), *in vitro* embriyo üretim protokolleri, multiple ovulasyon, *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transfer teknolojilerinin geliştirilmesi (1994), Somatik Hücre Nükleus Transferi (Somatic Cell Nucleus Transfer- SCNT) ile ilk kez bir koyunun klonlanması (1997), transgenik sığır üretiminde SCNT kullanılması (1998) gibi kilit biyoteknolojik adımlarla devam etmiş ve günümüzde özellikle çiftlik hayvan yetiştiriciliğinde uygulanabilir hale gelmiştir (Brackett ve diğ. 1982; Moore ve Hasler, 2017). Bu sayede yüksek verimli ve istenilen özelliklere sahip yavruların doğumu ile kısa sürede az maliyetle hedeflenen nitelikte sürü oluşturulabilmektedir.

Memeli embriyolarının transferinden kaynaklanan belgelenmiş ilk canlı doğumun 1890 yılında Walter Heape tarafından gerçekleştirildiği yaygın olarak kabul edilmektedir. 1890'da

Heape, iki adet 4 hücreli Angora tavşanı embriyosunu, tohumlanmış bir Belçika tavşanına aktardığı ve daha sonra 4 Belçika ve 2 Angora tavşanının yavrusu dünyaya geldiği rapor edilmiştir. (Heape, 1891; Bó ve Mapletoft, 2013; Moore ve Hasler, 2017)

Farklı memeli türlerinde daha erken tarihlerde reproduktif biyoteknoloji yöntemlerinin uygulandığı ve başarıya ulaştığı kaydedilirken sığırlar için serüven 1900'li yılların başında Rusya ve Danimarka'da uygulanan suni tohumlama ile başlamıştır (Ivanoff, 1922; Perry, 1945). Sperma sulandırıcılarının kullanılması, 1949'da gliserol ile sperm kriyoprezervasyonun keşfedilmesi, 1950-1960'larda süperovulasyon protokollerinin geliştirilmesi, başarılı sığır embriyo üretimi ve transferine ulaşmada önemli yol kat edilmesini sağlamıştır (Moore ve Hasler, 2017). Embriyo transferi ile ilk buzağı doğumu ise 1951 yılında Wisconsin Üniversitesi'nden E.L. Willet ve diğ. atfedilir (Willett, 1951).

Sığır embriyo üretimi ve transferi üzerine yapılan çalışmalar devam ederken, 1970'lerin başında embriyo transferi endüstrisi sığır ırklarının Kuzey Amerika'ya girmesiyle ticari olarak hız kazanmıştır (Betteridge, 2003; Bó ve Mapletoft, 2013).

Embriyo üretiminde, 1959 yılında *in vitro* fertilizasyon (IVF) yöntemi ile canlı yavruların üretildiği bilinen ilk memeli türü tavşan olmuştur (Chang, 1968). Rapor edilen bir sonraki başarı 1968'de laboratuvar farelerinde olmuştur (Whittingham, 1968). 1977 yılında ise, sığırlarda IVF ilk olarak östrustaki ineklerin ovidukt veya uterusunda veya bir tavşanın uterusunda kapasite edilen semen ile gerçekleştirilmiştir (Iritani ve Niwa, 1977). IVF ile üretilen ilk canlı buzağı, dört hücreli bir embriyonun alıcı bir ineğin yumurta kanalına aktarılması sonucunda 1981 yılında doğmuştur (Brackett ve diğ. 1982). *In vitro* maturasyon (IVM) ve IVF ile elde edilen sığır embriyolarının, bir koyunun oviduktunda 5 gün boyunca kültüre edilmesi ve sonrasında transferi ile gebelikler elde edilmiştir (Critser ve diğ., 1986). Kalsiyum iyonofor kullanılarak kapasite kazandırılmış sperma ile IVF sonucu oluşan embriyoların ve tavşan oviduktunda kültürlenmiş zigotların transferinden sonra ise iki buzağı doğmuştur (Hanada ve diğ., 1986). Tamamen IVM, IVF ve *in vitro* kültürden (IVK) üretilen ilk buzağılar ise 1987 yılında doğmuştur (Fukuda ve diğ., 1990). Bununla birlikte, 1980'ler boyunca sığır *in vitro* teknikleri, embriyo transfer endüstrisi tarafından çok az kullanılan bir araştırma teknolojisi olarak kalmıştır (Goto ve diğ., 1988; Hasler, 2014; Ferre ve diğ. 2020a).

1980'lerde *in vitro* embriyo üretim sürecindeki tüm adımları içeren birkaç atılım, embriyo transfer endüstrisi tarafından teknolojinin ticari olarak benimsenmesi için zemin hazırlamıştır. Özellikle sığırlarda IVF'un 39°C'de en verimli şekilde ilerlediğinin keşfedilmesi (Lenz ve diğ. 1983) ve heparin kullanılarak spermatozoonun *in vitro* kapasitasyon tekniklerinin geliştirilmesi, IVF ile embriyo üretim teknolojisinin yaygın şekilde uygulanmasında en etkin buluşlar olduğunu düşündürmektedir (Parrish ve diğ. 1985; Hasler, 2014).

1988 yılında geliştirilen ve canlı sığırlardan oosit toplamak için başarılı bir şekilde kullanılan ilk tekrarlanabilir ve etkili metot, transvajinal ultrason kılavuzluğunda aspirasyon tekniğidir. Bu metot, Oosit Toplama Tekniği (OTT) (Ovum Pick-up -OPU) olarak adlandırılmaktadır. (Pieterse ve diğ., 1988). OPU *in vitro* embriyo üretim tekniği ile birleştirilerek sığırlarda sahada yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Ayrıca cinsiyeti belirlenmiş sperma ve embriyoların genomik seçiminin (Johnson, 1995; Welch ve Johnson, 1999) kullanılmaya başlanmasıyla *in vitro* embriyo üretiminin ticari uygulaması büyük ölçüde artmıştır (Sirard, 2018).

In vitro embriyo üretimindeki artışın öne çıkan en önemli faktörlerinden biri de dondurulmuş cinsiyetlendirilmemiş geleneksel spermanın birkaç pipetinin çözündürülmesi, ardından akış sitometrisi kullanılarak spermanın cinsiyete göre ayrılması ve hemen ardından cinsiyetlendirilmiş spermanın *in vitro* embriyo üretimi için kullanılmasını içeren 'ters ayıklama' teknolojisidir (Morotti ve diğ., 2014; Ferre ve diğ. 2020). Bu sayede *in vitro* sığır embriyo üretimi teknolojisinin sahada kullanımı, istenilen özellikte ve cinsiyette buzağı elde edilmesine olanak sağladığından, maliyetinin yüksek olmasına rağmen endüstriyel anlamda oldukça hız kazanmıştır.

Günümüzde ise *in vitro* embriyo üretim teknolojisi alanındaki çalışmalar, daha çok oosit kazanım yöntemleri, süperovulasyon, oositin olgunlaşması, döllenme, kültür, embriyo gelişimi, dondurma teknikleri, transfer ve gebelik oluşum aşamalarını iyileştirmeye yönelik devam etmektedir.

2.2. SIĞIRLARDA EMBRİYO OLUŞUMUNUN FİZYOLOJİSİ

Dünyaya gelen her dişi memelinin ovaryumlarında rezerve olan oositlerin yalnızca bir kısmı yaşamı boyunca ovulasyona uğrama şansı bulur. Bunun nedenleri arasında progesteronun luteinize edici hormon (LH) salınım sıklığı üzerindeki baskılayıcı etkileri nedeniyle ovulasyonun ancak pubertaya ulaşıldıktan sonra gerçekleşmesi, gebelik süresince östrus siklusunun duraksaması ve hayvancılık üretim sistemlerindeki çoğu hayvanın nispeten kısa yaşam süresiyle sınırlı olması sayılabilir. Özellikle sığır gibi, gebelik ve laktasyon baskısı nedeniyle üretken yaşam süresinin nispeten kısa olduğu çiftlik hayvanı türlerinde bu şans çok daha düşüktür. Bu nedenle, araştırmalarda kullanılmak veya canlı yavru üretmek üzere gelişmekte olan foliküllerdeki oositlerin geri kazanılabilmesi, hayvansal kaynaklı üretim mekanizmaları için büyük potansiyelde faydalara sahiptir (Lonergan ve Fair, 2016).

2.2.1. İn Vivo Oosit Olgunlaşması

Sığır östrus siklusunda, artan FSH etkisiyle gelişen foliküler dalgadan dominant olan folikül, progesteron konsantrasyonlarının düşük olduğu bir zamanda gelişirse, uygun bir LH salınımına maruz kalır ve folikül içerisinde olgunlaşan oositin ovulasyonu şekillenir. Dominant folikül içindeki oositte mayoz bölünmenin yeniden başlamasını, germinal vezikülün parçalanmasını ve metafaz II'ye ilerlemesini tetikleyen preovulatuvar LH dalgasıdır. LH dalgalanmasının başlamasından yaklaşık 27 saat sonra ovulasyon gerçekleşir ve artık olgunlaşmış olan oosit döllenme için oviduktun ampullasına salınır (Lonergan ve Fair, 2016). Tüm bu süreçte, oosit büyümesini, gelişimini ve gelişimsel yeterliliğin kademeli olarak kazanılmasını desteklemekten sorumlu, ovaryan foliküler mikroçevre ve materyal sinyallere aracılık eden, foliküldeki oosit ile somatik hücrelerin iletişimini koordine eden granüloza ve kumulus hücreleridir (Wrenzycki ve Stinshoff, 2013). Kumulus hücreleri, oositin olgunlaşması sırasında, germinal vezikül parçalanmasını uyarmaya ve gelişimi metafaz II'ye yönlendirmeye yardımcı olmak için metabolitlerin ve besin maddelerinin oosite kanalize edilmesini sağlar (Lonergan ve Fair, 2016).

Oosit olgunlaşması, fetal yaşam sırasında başlayan ve preovülatör folikülde oositin mayoz bölünmesini sürdürerek, nükleer ve sitoplazmik değişimleri başarıyla gerçekleştirerek önce fertilizasyon sonra embriyo gelişimi için tam yeterliliğine ulaşmasıyla sonuçlanan çok uzun bir fizyolojik süreçtir (Mermillod ve diğ., 2000; Lonergan ve Fair, 2016). Bu süreç, nükleer ve sitoplazmik olgunlaşmanın birbiriyle bağlantılı olmasına rağmen, karmaşık ve farklı olayları içerir. Nükleer olgunlaşma esas olarak kromozomal ayrışmayı içerirken, sitoplazmik

olgunlaşma organellerin yeniden düzenlenmesini ve genel olgunlaşma sürecinde, döllenmede ve erken embriyogenezde etkili olan mRNA' ların, proteinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin depolanmasını içerir (Hansen, 2002; Ferreira ve diğ., 2009; Perkel ve diğ. 2015). Bu süreç boyunca hem oosit hem de folikül büyümesi ilerledikçe transkripsiyonel aktivite yüksek kalır (Fair, 2013). Oositte aktif mRNA sentezi, paketlenmesi ve depolanması, hücre çapı 110 μm 'den büyük olana kadar gerçekleşir. Bu mRNA ve protein önbelleği, maternal-embriyonik geçişten önceki dönemde gelişmekte olan embriyo tarafından kullanılacaktır (Perkel ve diğ., 2015).

Foliküler ortam hem oositin profaz I'de (germinal vezikül aşaması) mayotik duraklamasının sürdürülmesinden hem de mayozun yeniden başlamasından sorumludur. Memelilerin çoğunda oositler fetal yaşam sırasında mayoz bölünmenin erken aşamalarına girer ve ovulasyona kadar profaz I'in diploten aşamasında duraklama yaşar. Yüksek seviyelerdeki intraoosit siklik adenozin monofosfat (cAMP), cAMP'a bağlı protein kinaz A'nın uyarılması yoluyla olgunlaşmayı teşvik eden faktör aktivitesini baskılayarak oositi mayotik duraklamada tutar. Nükleer fonksiyon (rRNA sentezi) dahil oosit transkripsiyonu sekonder folikülde aktive edilir. Preovulatuvar gonadotropin artışı foliküler ve oosit siklik guanozin monofosfat (cGMP) seviyelerinde düşüşe neden olarak oosit fosfodiesteraz aktivitesinde artışa yol açar. Bu da intraoosit cAMP'de düşüşe ve mayoz bölünmede yeniden başlamaya neden olur (Norris ve diğ., 2009; Vaccari ve diğ. 2009). Ayrıca Katalitik Siklin Bağımlı Kinaz 1 (CDK1) ve düzenleyici Siklin B alt biriminden oluşan bir heterodim olan Olgunlaşmayı Teşvik Edici Faktör (MPF-Maturation Promoting Factor) gibi proteinler, LH dalgalanmasını takiben artarak hücre döngüsünün yeniden başlamasına neden olur (Jones, 2004; Perkel ve diğ. 2015). Oosit, onu çevreleyen folikül yaklaşık 3 mm çapa ulaştığında (tersiyer folikül) yaklaşık 110 μm çapına ulaşır. Oosit, 100 ila 110 μm çapa ulaştığında, mayotik olgunlaşmaya girme ve embriyonik gelişimi sürdürme yeterliliği kademeli olarak gerçekleşmiştir (Fair ve diğ., 1995; Lonergan ve Fair, 2016). Profaz I aşamasında duraksamada olan oosit haploit (2n) kromozoma sahiptir. Mayoz bölünmenin yeniden başlamasıyla devreye giren olgunlaşma süreci, ilk polar cisimciğin atılımı (ekstrüzyonu) sayesinde diploit (n) kromozom olarak kalan oositin, metafaz II aşamasında duraksamasıyla son bulur. *İn vivo* olarak, mayoz bölünmenin yeniden başlaması için tetikleyici, preovulatör LH dalgasıdır. Bununla birlikte, oositin folikülün inhibitör etkisinden uzaklaştırılması mayoz bölünmenin kendiliğinden yeniden başlamasını sağlar (Pincus ve Enzmann, 1935). Bu gerçek sığır embriyolarının büyük ölçekli *in vitro* üretimi için kullanılmıştır (Gordon, 2003, Lonergan ve Fair, 2016).

2.2.2. Fertilizasyon ve Embriyo Oluşumu

Döllenme, oositin olgunlaşması sonrasında, kapasite olmuş spermatozoonla oviduktun ampulla bölgesinde bir seri etkileşime girmesi neticesinde, iki haploit genomun birleşmesiyle diploit kromozon yapısının yeniden oluştuğu komplike bir olaydır (Aksoy, 2023). Ovulasyon sonrası oosit, Metafaz II aşamasında iken oviduktun ampulla bölgesine spermatozoonları beklemek üzere transfer edilir. Döllenme sırasında kapasite olan spermatozoon, akrozom enzimlerinden daha çok hyaluronidaz enzimi sayesinde kumulus hücrelerinin bağlanmasını sağlayan hyaluronik asit kompleksini eriterek zona pellisudayı geçer, perivitellin boşluktan ilerler ve ovuma ulaşır. Oositin spermatozoon ile teması ve sonrasında gelişen penetrasyon, oositin devam eden mayoz bölünmesinin tamamlanıp ikinci polar cisimciğinin atılmasıyla sonuçlanır. Spermatozoonun zona pellisudayı geçmesiyle oosit sitoplazmasının periferinde yer alan kortikal granüller, hücre içi Ca^{++} iyonlarının artışının da etkisiyle ekzositoz yoluyla hücrenin yüzeyine doğru salgılanır. Kortikal granüller içeriğindeki enzimler ile zona pellisuda yapısında kimyasal değişimlere sebep olur ve zona reaksiyonu olarak adlandırılan bu değişim membranda blok oluşturarak diğer spermatozoonların oosite girişini engeller (Delilbaşı, 2008; Sandal, 2012). Penetrasyon sonrasında spermatozoonun nükleusunun zarı parçalanarak kromozonların dekonzasyonu başlar ve oosit sitoplazmasından köken alan yeni bir zar ile sarılır ve erkek pronükleusu oluşur. İkinci polar cismini atan oositin de kromozomu yeni bir sitoplazma ile sarılır ve dişi pronükleusu oluşur. Fertilizasyondan ortalama 16-18 saat sonra pronükleusların oositin merkezine göç etmelerinin ardından membranları eriyerek dişi ve erkek kromozomları birleşir. Oluşan yapı singami adını alır ve fertilizasyon tamamlanmış olur (Hunter, 1996; Brewis ve Wong, 1999; Nagai, 2001).

Döllenme sonunda embriyo oviduktta bir taraftan implantasyon için hazırlanırken bir taraftan uterusu göç için hareketlenir. Oviduktteki embriyo bir seri mitoz bölünmeyle yaşamını sürdürür ve öncelikle her birinin blastomer adını aldığı iki hücreli embriyo şekillenir. Bu ilk bölünme yarıklanma olarak da adlandırılır. Blastomerler mitozla devamlı olarak ikinin katları şeklinde bölünürler. Tek tek sayılamayacak seviyeye ulaşan blastomerler morulayı oluşturur. Artan mitoz bölünmeyle kompaktlaşan morulanın dış katman hücrelerindeki aktif sodyum pompaları, iyon artışına dolayısıyla sitoplazma içerisine sıvı akışına sebep olarak embriyonun

blastosist aşamasına ulaşmasını sağlar. Sığır embriyoları fertilizasyondan itibaren yaklaşık 4.-5. günlerde, morula aşamasındayken uterusu doğru göç eder. Uterusta blastosist aşamasına ulaşan embriyo, şekillenen hücresel farklılaşmasıyla beraber içeriğini sıvı ile doldurur, dolayısıyla iç basıncı artar ve genişlemiş (expanded) blastosist şekillenir. Artan basınç, steroid hormonlar, prostaglandin ve proteolitik enzimlerin etkisiyle gerçekleşen hatching ile embriyo zona pelusidanın incelen yerinden çıkarak uterusu implante olur (Aksoy ve Uçan, 2023).

Yarıklanma ile başlayan embriyo mitoz bölünmeleri başlangıçta anne ve babadan gelen DNA materyali ile yönetilirken, blastosist aşamasına geçerken değişime uğrar ve artık embriyonun DNA materyali ile yönetilmeye başlar. Bu sürece kadar ki gelişimi, oositin olgunlaşması aşamasında gerçekleşen sitoplazmik değişimler sırasında ribozomal aktivite dolayısıyla yüksek oranda sentezlenen ve depolanan protein ve mRNA ile sağlarken, gelişimin devamı için gerekli mRNA klirensi ve embriyonik genom aktivasyonu ile gen ifadesinin yeniden programlanır. Böylelikle yönetim embriyonun DNA materyaline geçmektedir. Maternal-Embriyonik Geçiş olarak tanımlanan bu değişim sürecinde etkin oldukça farklı faktörler olmakla beraber, DNA metilasyonu, translasyon, histon asetilasyonu, transkripsiyon ve mikroRNA (miRNA) düzenlenmesi ile organize edilir. Bu kontrol mekanizması memeli türlerinde farklı aşamalarda devreye girerken, ineklerde 8-16 blastomer aşamasında gerçekleştiği rapor edilmiştir (Fair ve diğ., 1995; Perkel ve diğ., 2015; Cuthbert ve diğ., 2019; Bogliotti ve diğ., 2020)

2.3. SIĞIRLARDA İN VİTRO EMBRİYO ÜRETİMİ

Reprodüktif biyoteknoloji yöntemlerinden *in vitro* embriyo üretim teknolojisi, çiftlik hayvanları üzerine temel araştırmalar yapmak ve klonlama ve transgenezis gibi ileri biyoteknolojik yöntemlerin uygulanabilirliğini arttırmak için ucuz ve yüksek sayıda embriyo üretilmesine olanak sağlamaktadır. *In vitro* embriyo üretimi; oositlerin *in vitro* olgunlaştırılması (IVM), olgunlaştırılmış oositler ile spermatozoonların birlikte inkübasyonu ile döllenmenin sağlandığı *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve döllenmiş zigotların blastosist aşamalarına ulaşmasını sağlayan *in vitro* kültürü (IVK) ile tamamlanan üç aşamalı bir metodolojidir (Lonergan ve Fair, 2016; Khazaei ve Aghaz, 2017).

Olgunlaştırılmak üzere oositler, araştırmalarda kullanılmak için daha çok mezbahada kesilen ineklerin ovaryumları üzerindeki foliküllerden doğrama yöntemi ile elde edilirken, endüstriyel sığır *in vitro* embriyo üretimi için yüksek genetik değere sahip ineklerin

ovaryumlarından ultrason kılavuzluğunda transvajinal folikül aspirasyonunu içeren OPU yöntemi ile toplanmaktadır. Bu yöntem genetik değeri yüksek ineklerin oositlerinden birçok kez embriyo üretilmesine olanak sağlanmaktadır. Elde edilen oositler *in vitro* maturasyon medyumunda 38.8 °C' de %90 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 22-24 saat süreyle kültüre edilir. Olgunlaşma medyumunu için TCM-199 Early Tuzları tercih edilmektedir. Böylece Profaz I aşamasında duraksama halindeki oosit mayoz bölünmesine devam ederek Metafaz II (MII) aşamasına ulaşması ile nükleer olgunlaşma sağlanır. Mayoz bölünme döllenmeye kadar MII'de durur. Döllenme gerçekleştikten sonra devam eder ve ikinci kutup cisimciğinin ayrılması ile tamamlanır (Ferre ve diğ., 2020a).

IVM' nin tamamlanmasından sonra, oositler IVF' ye tabi tutulurken 18 ila 24 saate kadar spermatozoonlar ile birlikte 38.8 °C' de, %90 nem, %5 CO₂ ve %5 O₂ içeren ortamda *in vitro* fertilizasyon medyumlarında IVF-TALP (Tyrode's medium base, albumin, lactate and pyruvate), BO (Bracket and Oliphant medium) inkübe edilir (Parrish, 2014). Fertilizasyon kabındaki sperm-oosit etkileşimi, düşük sayıda OPU donör oositleri için 50 ila 100 µl' lik damla halindeki medyumda gerçekleşirken, genellikle mezbahadan toplu olarak toplanan oositler için >400 µl' lik bir medyumda gerçekleşir (Gordon, 2003). Genellikle spermatozoon, sulanıcıyı, seminal plazmayı ve ölü spermatozoonları uzaklaştırmak ve daha hareketli fraksiyonu seçmek için swim-up veya yoğunluk gradyanı santrifüjleme prosedürleri kullanılarak yıkanır ve seçilir. Spermanın yıkama işlemi için Sperm TALP (Tyrode's medium base, albumin, lactate and pyruvate) veya Sperm TALP-H medyumları kullanılmaktadır (Parrish, 2014). Spermatozoonlara oositin zona pellusidasına (ZP) nüfuz etme yeteneği kazanmak için kapasite artırıcı faktörlerle de muamele edilmesi gerektiği düşünülmektedir (Parrish ve diğ., 1986). Oosit başına gereken minimum spermatozoon sayısı, boğalar ve ırklar arasındaki büyük farklılıklar nedeniyle iyi tanımlanmamıştır, ancak genellikle IVF için mililitrede 1 ila 2 milyon spermatozoon konsantrasyonu yaygın olarak kullanılmaktadır (Ward ve diğ., 2002). Cinsiyeti belirlenmiş sperma veya konvensiyonel spermanın eritilmesinden sonra 'ters ayıklanmış sperma (reverse-sorted semen)' yöntemi ile cinsiyeti belirlenerek IVF'de kullanılması da hem kullanılan spermatozoon sayısının azalmasına hem de cinsiyeti belirli buzağının doğması ile istenen elit sürünün oluşturulmasına fayda sağlamaktadır (Morotti ve diğ., 2014).

İn vitro kültür için fertilizasyonunu tamamlamış oositler, etrafındaki kumulus hücreleri ve spermatozoonlardan kurtulmak için denüstasyon veya vortekse maruz bırakılır. Zigot olduğu düşünülen oositler çıplak kaldıktan sonra kültür medyumuna aktarılır. Zigot olduğu düşünülen

ve kültür medyumuna aktarılan oositler %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ ve %90 nem içeren gaz karışımı inkübatörde 38.8°C'de 7-9 gün süre ile kültüre edilir.

Sığırlarda ticari ve araştırma amaçlı çalışan *in vitro* embriyo üretim laboratuvarlarının büyük çoğunluğu kendi kültür ortamlarını, Doku Kültürü Medyumu 199 (TCM 199; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), Tyrode Albumin Laktat Piruvat (TALP; Parrish ve diğ., 1986) ve SOF (Tervit ve diğ., 1972; Holm ve diğ., 1999), CR1aa-Charles Rosencrans (Rosencrans ve First, 1994), BECM (Lim ve diğ., 1999) ve KSOM (Liu ve Foote, 1995) gibi ticari olarak temin edilebilen memeli hücre kültürü solüsyonlarını kullanarak kendi bünyelerinde hazırlamaktadır (Ferre ve diğ., 2020a). Genel olarak, sığır *in vitro* kültür ortamları dengeli tuz çözeltisi (M199 için Earle tuzları), sodyum bikarbonat, esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler, L-glutamin, fosfataz, piruvat, antibiyotikler, vitaminler, EDTA, şeker (fruktoz veya glukoz) ve diğer koruyucu faktörler (örn. antioksidanlar) ve gamet/embriyo performans destekleyicileri veya besin maddeleri gerektirir (Gardner, 2008).

Elde edilen yüksek olgunlaşma ve bölünme oranları göz önüne alındığında, blastosist aşamasına kadar nispeten düşük embriyonik gelişim oranları gözlemlenmektedir (Merton ve diğ., 2003). Kültüre alınan muhtemel zigotların %20 ila %40'ı blastosist aşamasına ulaşmaktadır (Lonergan ve diğ., 2001). Bu durum, sitoplazmik oosit olgunlaşmasının tamamlanmamış olmasından, yetersiz kültür koşullarından, embriyonik genom aktivasyonunun bozulmasından veya DNA parçalanmasından kaynaklanıyor olabileceği bildirilmiştir (Sirard ve diğ., 2006).

2.4. İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO ÜRETİMİNDE ANTIOKSİDANLARIN ÖNEMİ

Mezbahada kesilen sığırların ovaryumlarından veya intravajinal olarak kazanılan oositlerin *in vitro* olgunlaştırılması, *in vitro* embriyo üretiminin ilk ve en önemli kilit aşamalarından biri olduğu, bu süreçte oositlerin daha fazla embriyonik gelişimi sürdürme potansiyeli kazandığı ve başarı oranını oldukça etkilediği araştırmacılarla rapor edilmiş bir gerçektir (Adona ve diğ., 2008; Lee ve diğ., 2016; Khazaei ve Aghaz, 2017, Sovernigo ve diğ. 2017; Naspinska ve diğ., 2023). Dolayısıyla deneysel çalışmalarda *in vitro* olgunlaşma protokolünün verimliliğini artırmaya odaklanılmış ve önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, *in vitro* olgunlaştırılmış oositlerin başarı oranı, *in vivo* sonuçlarına kıyasla düşüktür (Gilchrist, 2010; Sovernigo ve diğ., 2017). İn vitro olgunlaştırılmış oositlerin genel olarak

düşük kaliteli olmalarına birden fazla faktör sebep olmaktadır. Ancak bu önemli faktörlerden birinin oksidatif stres olduğu düşünülmektedir (Sovernigo ve diğ., 2017; Khazaei ve Aghaz, 2017; Soto-Heras ve Paramio, 2020; Zarbakhsh, 2021). Oksidatif stres, hücresel sistemde antioksidanların konsantrasyonu veya kullanılabilirliği azalırken, serbest radikallerin aşırı üretimi durumunda ortaya çıkan patofizyolojik bir durumdur. ROT'un oluşturduğu hasarın seviyesi, üretim ve uzaklaştırma hızları arasındaki dengeye bağlıdır (Agarwal ve diğ., 2005; Sovernigo ve diğ., 2017; Naspinska ve diğ., 2023). Biyolojik sistemlere zarar veren oksijensiz radikaller olarak da tanımlanan ROT, sığırlarda *in vitro* olgunlaşma ve embriyo üretiminin başarısını azalttığı, gelişen oositlerin ancak %30-40'ının blastosiste dönüştüğünü ve düşük verimliliğin başlıca nedeni olduğunu düşündürmektedir. Bu sonuç nedeniyle, embriyonik *in vitro* üretim verimliliği hala tatmin edici değildir (Luberda, 2005; Sovernigo ve diğ., 2017; Naspinska ve diğ., 2023). Ayrıca çalışmalar oksidatif stresin, oositler ve granüloza hücreleri arasındaki iletişimi etkilediğini, oosit kalitesini düşürdüğünü ve granüloza hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermektedir (Chaube ve diğ., 2014; Ghatebi ve diğ., 2019; Silva ve Silva, 2023). Öte yandan, ROT oosit fizyolojisinde sinyal molekülleri olarak da kabul edilir ve olgunlaşmayı teşvik edici faktör (maturation promoting factor-MPF) destabilizasyonu üzerindeki pozitif etkileri bildirilmiştir (Premkumar ve Chaube, 2016; Tiwari ve diğ., 2016; Khazaei ve Aghaz, 2017).

ROT, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip oksijenden türetilen, serbest radikallerin (hidroksil iyonu, süperoksit vb.), radikal olmayanların (ozon, tekli oksijen, lipid peroksitler, hidrojen peroksit) ve oksijen türevlerinin toplandığı geniş bir molekül sınıfını temsil eder. Oldukça reaktif ve kararsızdırlar. Dolayısıyla, ROT nükleik asitler, lipidler, proteinler ve karbonhidratlar ile reaksiyona girerek bir elektron alabilir ve stabil hale gelebilirler (Halliwell, 2012; Khazaei ve Aghaz, 2017; Sovernigo ve diğ., 2017; Soto-Heras ve Paramio, 2020). Bunlar, esas olarak oksidatif fosforilasyon sırasında elektron kaçağı nedeniyle düzenli hücre metabolizması tarafından üretilir ve ikinci haberciler olarak hareket ederek farklı hücresel sinyal kaskadlarının bir parçası olur (Fujii ve diğ., 2005). Dengeli ROT, doku rejenerasyonu, hormon sinyali, steroidogenez, hücre içi redoks düzenlemesi ve embriyogenez dahil olmak üzere fizyolojik süreçlerde sinyal molekülleri olarak faydalı bir şekilde hareket eder (Agarwal ve diğ., 2008; Sovernigo ve diğ., 2017). Bu nedenle, hücresel antioksidan mekanizmalar tarafından korunan düşük ve dengeli bir ROT seviyesi, hücre fonksiyonu için vazgeçilmezdir. Bununla birlikte, özellikle oksijen basıncının fazla olduğu ortamlarda oluşan fizyolojinin üzerinde bir ROT seviyesi, hücre zarlarını bozan lipid peroksidasyonu (Richter, 1987;

Esterbauer ve diğ., 1991), proteinlerin toplanması ve bozulması (Park ve diğ., 2010), DNA hasarı (Evans ve diğ., 2004) ve mitokondriyal hasar gibi farklı mekanizmaların fizyolojisini bozarak hücreye zarar verir (Soto-Heras ve Paramio, 2020; Silva ve Silva, 2023).

İn vivo koşullar sırasında, ovaryum folikülü içindeki intrinsik ve ekstrinsik antioksidanların varlığı, prooksidatif ve antioksidatif ortam arasındaki dengeyi koruyarak fazla ROT'u nötralize eder. Buna karşılık, *in vitro* embriyo üretiminde oositler veya embriyoların toplanması, manipülasyonu ve kültürü sırasında maruz kaldıkları çevresel koşullar (manipülasyon, ışık sıcaklığı, ortam bileşenleri, sperm ve O₂ konsantrasyonu) ROT artışını desteklemekte ve savunma mekanizmalarının etkinliğinin düşmesine sebep olmaktadır (Guerin ve diğ., 2001; Gonçaves ve diğ., 2010; Yu ve diğ., 2014; Savernigo ve diğ., 2017; Sidi ve diğ., 2022). Özellikle in vivo koşullarda ovidukt ve uterustaki %2-8 olan oksijen basıncının *in vitro* koşullarda %20'lere yükselmesi oksidatif fosforilasyona sebep olacağından ortamdaki ROT seviyesi oldukça artmakta bu da oositin maturasyonunun ve dolayısıyla embriyo gelişiminin istenilen seviyede olmasına engel olmaktadır (Özdaş ve Baran, 2015; Savernigo ve diğ., 2017; Soto-Heras ve Paramio, 2020; Zarbakhsh, 2021). Bunun yanı sıra embriyo kültürü sırasında, ROT seviyeleri benzer aşamalarda in vivo embriyolara kıyasla artmaktadır. Hajian ve diğ. (2017), embriyolarda ROT üretiminin döllenmeden yaklaşık 8 ila 16 hücre aşamasına kadar azaldığını ve kompakt moruladan blastosist aşamasına kadar arttığını bildirmiştir. ROT üretimindeki bu artışın anaerobik glikolizden aerobik glikolize geçişle ilgili olduğu düşünülmektedir, çünkü bu aşamadaki ATP üretimi Krebs döngüsüne bağlıdır, oysa bu aşamadan önce ATP üretimi esas olarak glikolize bağlıdır (Hajian ve diğ., 2017; Zarbakhsh ve diğ., 2021).

İn vitro embriyo üretimi üzerine yapılmış tüm çalışmalar her ne kadar kültür ortamlarını iyileştirmeye yönelik olsa da en büyük problem olan ROT'un zararlı etkileri halen istenilen seviyede etkisiz hale getirilememiş ve antioksidanların etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalara devam edilmesinin gerekliliği yayınlanan raporlarda oldukça fazla sayıda vurgulanmıştır. Dolayısıyla araştırmacıların antioksidanların üreme sistemindeki etkinlikleri in vivo ve *in vitro* olarak halen devam etmektedir. Antioksidanlar, organizmada oksitlenebilir bir substrata kıyasla az miktarda bulunan, substratın oksidasyonunu önleyen veya geciktiren maddelerdir. Antioksidatif enzimler, hücrenin akut oksijen toksisitesine karşı koruyan, ROT'u detoksifiye eden ve verdikleri zararı onaran enzimleri ifade eder. Tüm aerobik organizmalar oksidatif hasarı önlemek için oldukça etkili antioksidan stratejiler geliştirmiştir (Naspinska ve diğ., 2023).

Embriyolar tamamlayıcı sistemler olarak ROT'a karşı çoklu koruyucu mekanizmalara sahiptir. Foliküler ve oviduktal sıvılarda bulunan embriyonun ekstrasik koruması temel olarak hipotaurin, taurin ve askorbik asit gibi antioksidanları içerir. Embriyonun enstrümantal koruması ise süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve gama glutamilsistein sentetaz gibi enzimleri içerir. Bu enzimlerin transkriptleri oviduktta tanımlanmıştır. Bu önemli transkriptler embriyonal gelişim yeteneğine ulaşmak için saklanır. Bu noktalar göz önüne alındığında, antioksidanlar embriyo kültür ortamında yaygın olarak kullanılmaktadır (Öztürkler ve diğ., 2010).

Bahsi geçen antioksidanlar ROT oluşumunu baskılama veya eylemlerine engel olma gibi farklı etki mekanizmalarıyla ROT'u temizleyerek hücre içi oksidan/antioksidan dengesinin korunmasına yardımcı olur. Enzimatik ve non-enzimatik (enzimatik olmayan) olarak iki temel gruba ayrılan antioksidanlar (Zarbakhsh ve diğ., 2021), *in vitro* embriyo üretiminin farklı aşamalarına katılarak etkinlikleri analiz edilmiş ve kültür ortamını iyileştirmeyi desteklediği yönünde sonuçlar alınmıştır. Enzimatik antioksidanlar hücrelerde üretilir ve detoksifikasyon ile farklı bir grup oluşturan bazı enzimler aracılığıyla vücudu serbest radikallere karşı korur. (Jeeva ve diğ., 2015; Zarbakhsh ve diğ., 2021). Enzimatik olmayan antioksidanlar ise daha çok doğal bitkilerin ham maddesi olup, hidrojen iyonları bağlayarak serbest radikalleri stabilize eder (Parveen ve diğ., 2016; Maarman, 2017; Xu ve diğ., 2017; Haida ve Hakiman, 2019; Zarbakhsh ve diğ., 2021). Yapılan çalışmalarda hücre içi enzimlerden, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GSR) ve peroksiredoksinlerin oksidatif strese karşı hücre savunmasında görev aldığı gözlemlenirken, melatonin, glutatyon (GSH), resveratrol, askorbik asit, L-karnitin, L-Ergothioneine, N-asetil-sistein ve sisteamin, kuersetin, nobiletin, akteozid, mogrosid V, fikosiyenin, laminarin, koenzim Q10, ve likopen gibi enzimatik olmayan antioksidanların da oksidatif stresin kontrolünde önemli derecede etkili olduğu rapor edilmiştir (Öztürkler ve diğ., 2010; Truong ve Gardner, 2017; Liu ve diğ., 2018). Ayrıca antioksidanlar fonksiyonel yapılarına göre; radikalleri süpürerek etki gösteren “serbest radikal oluşumunu engelleyenler” ve radikallerle dengeli bir ürün oluşturarak reaksiyonları sonlandıran “zincir kırıcı antioksidanlar” olarak ikiye ayrılırlar. Serbest radikal oluşumunu engelleyen antioksidanlar, albümin, transferrin gibi metal iyon bağlayıcılar, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz olarak kendi içinde ayrılırken; zincir kırıcılar ise lipitte çözünen (alfa tokoferol, ubikinon, beta karoten) ve suda çözünen (glutatyon, sistein, askorbat) olarak ayrılır. Ayrıca, selenyum ve çinko gibi antioksidatif enzimler için kofaktör görevi gören maddeler de vardır (Öztürkler ve diğ., 2022b).

Yalnız tek başına antioksidan ilavesi de ROT'tan korunmak için yeterli değildir. Ayrıca, antioksidan seçimi ve konsantrasyonları *in vitro* embriyo üretiminde çok kritiktir. Antioksidanlar ve mekanizmaları ile ilgili gelişen ve artan bilgiler, *in vitro* kültür sistemlerinde oosit ve embriyo kalitesinin değerlendirme yöntemlerine ve embriyoların geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Bununla birlikte, farklı antioksidanların farklı kültür ortamlarında farklı etkilere sahip olduğu da çalışmalar tarafından ortaya konmuştur. Dolayısıyla antioksidanların, oksidatif stresi azaltmaktaki etkilerinin tespiti için daha fazla çalışma yapılması gerektiği savunulmuştur (Bucak ve diğ., 2010; Öztürkler ve diğ., 2010).

Geçmişten bu yana bahsi geçen antioksidanlar *in vitro* embriyo üretim çalışmalarında istenilen blastosist oranına ulaşmada tam anlamıyla kurtarıcı olamadığı gibi halen araştırmacılar arasında tartışma konusudur. Araştırmacılar son yıllarda yeni kimyasal madde arayışına girmişler, resveratrol, crocetin, propolis, kurkumin ve timokinon gibi maddelerin *in vitro* koşullarda hücreler üzerindeki etkilerini araştırmaya yönelmişlerdir. Bu maddeler arasından hücre yenileyici, DNA fragmentasyonunu inhibe edici, apoptozu baskılayıcı, antiproliferatif, antikarsinojenik, antiinflamatuvar ve reaktif oksijen türlerini inhibe edici etkisiyle bilinen kurkumin ve timokinonun (Hsuuw ve diğ., 2005; Kamarzaman ve diğ., 2014; Földeşiová ve diğ., 2016), *in vivo* ve *in vitro* koşullarda memeli somatik hücreleri üzerine etkinliği araştırılmıştır. Bahsedilen etkileri rapor edilmiş olmasına karşın spermatozoon, oosit ve embriyo üzerindeki etkilerine dair sığır *in vitro* çalışmalarına rastlanmamıştır. Bu sebeple planlanan tez çalışmasında sığır *in vitro* embriyo üretiminin en önemli aşaması olarak görülen oositin olgunlaşmasında, kurkumin ve timokinonun etkinliği araştırılmıştır.

2.4.1. Kurkumin

Kurkumin (diferuloilmetan, $C_{21}H_{20}O_6$), *Curcuma longa* L. (*C. longa*)'nin rizomlarından elde edilen sarı-turuncu renkli polifenolik bir bileşiktir. Kurkuminin antioksidan, antikanserojenik, antiviral, antibakteriyel, antifungal, antiseptik, antiinflamatuvar ve analjezik etkilerinin varlığı birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda tespit edilmiştir (Becit ve diğ. 2017; Yalçın ve diğ., 2017). Kurkumin, başta hidrojen peroksit olmak üzere; nitrojen dioksit radikalleri, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları gibi birçok serbest radikalın etkinliğini azaltıp, ortamdaki antioksidan enzimlerinden katalaz, SOD ve glutatyon peroksidaz düzeylerini artırarak oksidatif stresi azaltma, lipid peroksidasyonunu ve degradasyonunu, oksidatif DNA hasarını engellediği bildirilmiştir. Bunların yanı sıra kaspaz aktivasyonunu, tümör süpresörü, mitokondriyal ve protein kinaz yollarını etkileyerek oluşturdukları antiproliferatif ve

antiapoptotik gibi özellikleri araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Becit ve diğ., 2017). Dolaylı olarak, kurkumin anahtar antioksidan enzimlerin ekspresyonunu modüle ederek vücudun antioksidan savunmasını güçlendirir. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz gibi çeşitli antioksidan enzimlerin düzenlenmesine yol açan nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) yolunu aktive ettiği gösterilmiştir (Iqbal ve diğ., 2003; Cheng ve diğ., 2019). Wu ve diğ. *in vitro* ortamda fare embriyosunda yaptıkları bir çalışmada kurkuminin hücresel stres ve kaspaz aktivasyonunu bloke ederek yüksek glikoz kaynaklı neural tube defects (NTDs) oluşumunu azalttığını ve deneysel çalışmalarında 20 µM kurkuminin embriyoda yüksek glikozdan kaynaklı artan lipid peroksidaz seviyesini bloke ettiğini bildirmişlerdir (Wu ve diğ., 2015). Kurkuminin embriyolar üzerine toksik etkisi olduğunu bildiren birkaç çalışma vardır. Deneysel çalışmalarda oral olarak kurkumin ile beslenen ratlarda döllenme ve gebelikte toksik etki görülmediği ve yavrularda genetik malformasyona sebep olmadığı saptanmıştır (Ganiger ve diğ., 2007). Huang ve diğ. (2013), fare embriyoları üzerine yaptıkları bir *in vitro* araştırmada gebeliğin erken implantasyon sonrasındaki dönemde kurkuminin negatif etki gösterebileceği ve dikkatli dozlarda kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir (Huang ve diğ., 2013). Fare blastosistlerinde metilglioksal ile indüklenerek oluşturulan oksidatif stres ve apoptoza kurkuminin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kurkuminin JNK aktivasyonu, sitokrom C salınımı, kaspas 3 aktivasyonun apoptotik biyokimyasal değişiklikleri inhibe ettiği ve metilglioksal ile indüklenmiş hücre ölümünü kurkuminin koruduğu saptanmıştır (Hsuuw ve diğ., 2005).

2.4.2. Timokinon

Timokinonun ($C_{10}H_{12}O_2$, 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon), *Nigella Sativa* (çörek otu) bitkisinin biyoaktif bileşenlerinin en önemlisi olduğu, uçucu yağında %18,4-24 oranında bulunduğu, antihiperlipidemik, antihiperkolesterolemik, antioksidatif, antidiyabetik, antitümoral, antikarsinogenik, antibakteriyel, antihelmintik, antifungal, analjezik ve antiinflamatuvar etkisinin varlığı tespit edilmiştir (Güllü ve Avcı, 2013; Bulca, 2014; Kamarzaman ve diğ., 2014). Çok sayıda çalışma, timokinonun reaktif oksijen türlerini temizleyerek ve vücudun antioksidan savunmasını güçlendirerek oksidatif stresi etkili bir şekilde azalttığını ortaya koymuştur. Timokinonun, antioksidan potansiyelinden ve gen metabolizmasında etkin rol almasından kaynaklanabileceği düşünülen hipokolesterolemik özelliği ile kısmen düşük dansiteli lipoproteini (LDL) oksidasyona karşı koruyarak etkinliğini gösterdiği (Ismail ve diğ., 2010) ve çeşitli mekanizmalar ile antioksidan özellik göstererek

süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin süpürücüsü olduğu bildirilmektedir (Badary ve diğ., 2003). Yılmaz ve diğ. (2023), timokinonun böbrek, karaciğer ve kalp dahil olmak üzere çeşitli organlarda oksidatif hasarı azaltma yeteneğini vurgulamış ve böylece oksidatif stresle ilişkili yaralanmalara karşı koruyucu etkilerinin altını çizmiştir (Yılmaz ve diğ., 2023). Awad ve diğ. (2011), timokinonun antioksidan gen ekspresyonunu pozitif yönlü düzenlediğini ve iskemi-reperfüzyon hasarının neden olduğu hepatorenal disfonksiyona karşı koruyucu rolüne katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu da timokinonun sadece serbest radikallerin doğrudan temizleyicisi olarak hareket etmediği, aynı zamanda antioksidan savunma mekanizmalarında yer alan genlerin ifadesini de modüle ettiği görüşünü desteklemektedir (Awad ve diğ., 2011). Khan ve diğ. (2017) ise timokinonun düşük konsantrasyonlarda antioksidan olarak ikili rolünü tartışırken, daha yüksek konsantrasyonlarda potansiyel bir prooksidan olarak hareket ederek antioksidan ve oksidatif stres indükleyici özellikleri arasında karmaşık bir etkileşime işaret etmiştir (Khan ve ark., 2017).

Timokinonun üreme doku ve hücreleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmaların oldukça kısıtlı olduğu görülmüştür. Mohammed ve Farghaly'nin (2018) farelerde yaptığı çalışmada, diyetine çörek otu tohumu ilavesinin oosit kalitesini ve preimplantasyon embriyo gelişimini iyileştirerek üreme performansını arttırabileceği rapor edilmiştir (Mohammed ve Farghaly, 2018). Salahshoor ve diğ.'nin (2018) erkek farelerde yaptığı bir çalışmada, timokinonun antioksidan etkisiyle testis, aksesuar bezleri, epididimis ve dolayısıyla sperm üzerinde serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önlediği, antioksidan mekanizmasıyla hücre ölümünü inhibe ederek, apoptozda stres koşullarında sitokrom C salınımıyla etkin rol alan mitokondrinin bütünlüğünü koruduğu, sitozolik kalsiyumu serbest bırakarak mitokondriyal membran potansiyelini, kaspaz-3 aktivitesini ve apoptotik kaskad aktivitesini azaltabileceği ve timokinonun FSH ve LH etkisini arttırıcı özelliğinin testis üzerine yapıcı etkisinin olabileceği bildirilmiştir (Salahshoor ve diğ., 2018). Araştırmacıların timokinonun testis için FSH ve LH üzerine bulduğu bu pozitif etki, tez hipotezimizde oosit olgunlaşmasında önemli bir role sahip olan bu hormonların *in vitro* ortamda da aktivasyonları arttırabileceği ve sığır oositlerinin de olgunlaşmasına pozitif etki yaratabileceği düşüncesine paraleldir. Eini ve diğ. (2019), polikistik over sendromlu farelerden elde edilen oositlerin *in vitro* maturasyonunda timokinonun 1, 10 ve 100 μM dozlarında kullandığı bir çalışmada 10 μM grubunun yarıklanma ve blastosist oranlarını kontrol ve diğer gruplara göre daha yüksek ve istatistiksel olarak $p<0,05$ düzeyinde

önemli olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, timokinonun polikistik ovaryumdan elde edilen oositlerin *in vitro* maturasyonunda, önemli derecede ROT düzeyini azalttığını, sitoplazmik glutatyon (GSH) düzeyini arttırdığını ve apoptotik gen ekspresyonlarını azalttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, oosit maturasyonunda önemli rol oynayan MPF ve MAP kinaz aktivitesini, intrastoplazmik oksidatif stresin ve ROT'u inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Eini ve diğ. ise 10 μ M timokinon kullandıklarında siklik B ekspresyonunda değişiklik yapmadığını ancak Mapk ve Cdk1 genlerinin transkripsiyon seviyelerinin önemli ölçüde arttığını ve sonuç olarak kutup cisimciği (polar body) atılımını arttırdığını bildirmişlerdir (Eini ve diğ., 2019).

2.5. İN VİTRO MATURASYON ANALİZLERİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

İn vitro embriyo üretiminin en önemli aşamalarından sayılan oositin *in vitro* olgunlaştırılması, özellikle blastosiste ulaşma oranını arttırmanın yollarını arayan araştırmacılar için odak noktası olmuştur. Rapor edilen çalışmalara bakıldığında *in vitro* olgunlaşma medyumunun içeriği çeşitli antioksidanlar, protein kaynakları, enerji kaynakları, hormonlar ve vitaminler ile desteklenmiştir. Özellikle *in vitro* ortamda artan oksidatif stresin oluşturduğu reaktif oksijen türevlerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için kullanılan maddelerin antioksidan etkili oldukları dikkat çekmiştir. Kültür koşullarındaki iyileştirmeler, yalnızca antioksidan seçimine değil, aynı zamanda konsantrasyonuna, ortama ve bileşenlerine, türe ve gelişim aşamasına göre oositin özel gereksinimlerinin dinamik değişikliklerine bağlı olduğundan oldukça karmaşık ve zordur (Khazaei ve diğ., 2016). Dolayısıyla antioksidanların *in vitro* üretimindeki etkinliğini tam anlamıyla ortaya koymak için oositler olgunlaşma, döllenme ve zigot aşamasındayken birçok biyokimyasal, DNA ve immunohistokimyasal analizlere başvurulmuştur.

2.5.1. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için oosit, kültür ortamı veya oositi çevreleyen kumulus hücreleri değerlendirilmektedir. Özellikle oositin oksidatif strese karşı koruyan Glutatyon (GSH), Superoksitdismutaz (SOD), Katalaz seviyeleri ölçülerek, antioksidanların etkinlikleri araştırılmaktadır (Hidaka ve diğ., 2018). Ayrıca florasan (diklorohidro-floresin diasetat-DCHFDA) boyalar kullanılarak mikroskopta, florasan boyaya duyarlı spektrofotometrik veya akış sitometrilik cihazlar ile hücre içi oksidasyon seviyesi, reaktif oksijen türevleri miktarı veya maruz kalınan O₂ sitotoksiteleri belirlenerek antioksidanların etki mekanizmaları ortaya konulmaya çalışılmaktadır (Xu ve diğ., 2018; Ashibe ve diğ., 2019). Lipid değerlendirmeleri

için ise Nil Kırmızısı boyası ile oositler boyanarak konfokal mikroskopta lipid damlacıkları karşılaştırılmalı olarak tespit edilmektedir (Knitlova ve diğ., 2017). Antioksidanlara maruz kalma sonrası olası oosit olgunlaşması esnasında aktif olan genlerin veya proteinlerin, polimeraz zincir reaksiyonu (1. RNA izolasyonu için numunelerin alınması ve saklanması, 2. RNA ekstraksiyonu ve tamamlayıcı DNA sentezi, 3. Gerçek zamanlı PZR) yöntemi kullanılarak tespiti ile antioksidanların etkinlikleri belirlenmesinde kullanılmakta ve benzer sonuçlara sebep olan maddelerin sinerjik etkilerinden faydalanılarak *in vitro* kültür ortamları iyileştirilmeye çalışılmaktadır.

2.5.2. DNA Analizleri

2.5.2.1. Nükleer Olgunlaşma Analizleri

Oosit olgunlaşma aşamasının iki önemli kilit noktası olan nükleer olgunlaşma ve sitoplazmik olgunlaşma, döllenme ve embriyo gelişimindeki belirleyici faktör olmaları dolayısıyla deneysel çalışmalarda oosit olgunlaşmasının tam anlamıyla gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi amacıyla DNA odaklı analizlere başvurulmuştur. Özellikle olgunlaşma öncesi Profaz I aşamasında germinal vezikül (GV) olarak duraksama halinde olan çekirdeğin, mayoz bölünme yeniden başladığında, germinal vezikül parçalanması (GVBD) ile başlayan, kromotinin yoğunlaşması, homolog kromozomlar metafaz I'de mayotik iğ üzerinde hizalanması ile devam eden, anafaz ve telofaz sırasında homolog kromozomlar ayrılarak 1. polar cismin (PB) atılmasıyla Metafaz II'ye ulaşması sonucu olgun hale gelmesi beklenen oositin (Grøndahl, 2008), yapılan çalışmalarda *in vitro* olgunlaşma sonrası hangi aşama kaldığının veya döllenmeye hazır bir olgunlaşma süreci geçirdiğinin tespiti için kromozom boyayabilen özellikle florasan özellikli boyalar kullanılmıştır. Çeşitli protokollerle olgunlaşma sonrası oositler Hoechst, Propidyum İyodür (PI), Deoksiribonükleik asit (DAPI) ve Lakmoid gibi floresan boyalar veya Aseto-Orsein gibi tespit boyaları kullanılarak kromozonun hangi aşamada olduğu tespit edilerek olgunlaşmanın tamamlanma süreci takip edilir (Monsefi ve diğ., 2017; Wang ve diğ., 2018; Emanuelli ve diğ., 2019).

2.5.2.2. DNA Parçalanmasının Analizleri

Vücut sisteminin devamlılığı için önemli olan ve programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, oositin olgunlaşması esnasında da oldukça etkin rol oynar. Özellikle *in vitro* koşullarda oositin maruz kaldığı yüksek oksijenin sebep olduğu oksidatif stres veya deney amaçlı kullanılan maddelerin oluşturdukları sitotoksikite oositin apoptoz sürecine etkileyerek

DNA parçalanmasına sebebiyet vermektedir. Dolayısıyla oositin *in vitro* olgunlaşması sonrası erken apoptozis için Annexin-V boyası, geç apoptozis için TdT Aracılı dUTP Nick end Labeling (TUNNEL) boyası kullanılarak floresan mikroskopta DNA parçalanma testleri yapılmaktadır (Wang ve diğ., 2018; Ashibe ve diğ., 2019). Ayrıca Akridin Orange/Etidyum Bromür (AO/EB) boyaarı da apoptotik hücrelerde nükleer morfolojinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. Akridin orange yaşamsal bir boyadır ve hem canlı hem de ölü hücreleri boyarken, Etidyum Bromür sadece membran bütünlüğünü kaybetmiş hücreleri boyamaktadır. Floresan mikroskopta değerlendirilen oositlerde veya granüloza hücrelerinde canlı olanlar tekdüze yeşil görünürken, erken apoptotik hücreler yeşil renkte boyanır ve kromatin yoğunlaşması ile nükleer parçalanmanın bir sonucu olarak çekirdeklerde parlak yeşil noktalar içermektedir. Geç apoptotik hücreler ise etidyum bromür içerir ve bu nedenle turuncu renkte boyanmaktadır. Anilin Mavisi, kromatin yoğunlaşma deneyi için kullanılır ve kondanse kromatin koyu mavi renkte boyanmış olarak ışık mikroskobu altında tespit edilir (Monsefi ve diğ., 2017).

2.5.3. İmmunohistokimyasal Analizler

In vitro embriyo üretiminde etkinliği araştırılmak istenen antioksidan özellikli kimyasalların oosit, kumulus hücreleri, granüloza hücreleri ve zigotun farklı gelişim aşamalarında sebep oldukları değişimlerinin tam olarak ortaya konulabilmesi için çeşitli immunohistokimyasal testlere başvurulmuştur. Özellikle olgunlaşma, döllenme ve embriyo gelişiminde, apoptozda, kumulus hücrelerinin boşluklu bağlantılarındaki (gap junction) madde alışverişlerinde fizyolojik olarak etkin rol alan proteinlerin farkındalığından sonra Western Blot, PZR, Akış Sitometrisi ve Spektrofotoflorometre gibi metotlarla Kaspaz 2L, Kaspaz 3, Kaspaz 9, Konneksin 43 gibi proteinlerin miktarları tayin edilerek ve BAX, BCL2 gibi gen ekspresyonları belirlenerek antioksidanların hücresel döngünün hangi aşamalarına etkiledikleri ayrıntılarıyla analiz edilmektedir (Vozzi ve diğ., 2001; Orozco-Lucero ve Sirard, 2014; Chen ve diğ., 2019).

Oosit gelişim yeterliliğini ortaya koyan bir başka yaklaşım da Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz (G6PDH) aktivitesinin Parlak Kresil Mavisi (Brilliant Cresyl Blue-BCB) boyama yoluyla değerlendirilmesidir. BCB, G6PDH'nin hücre içi aktivitesini belirleyen bir boyadır. G6PDH aktivitesi, nükleotid sentezi için riboz-6-fosfat talebi nedeniyle oosit büyüme fazı sırasında gözlenir (BCB(-): renksiz sitoplazma, artmış G6PDH). Büyüme evresini tamamlamış

oositlerde ise bu aktivite düşüktür (BCB(+): renkli sitoplazma, düşük G6PDH). Bu teknik, sığırlar da dahil olmak üzere çeşitli türlerde başarıyla kullanılmaktadır (Aguila ve diğ., 2020).

Ayrıca Tripan Mavisi, Nötral Kırmızı boya ile yapılan hücre canlılık testleri, Luminometre ile ATP içeriği testleri, Lucifer Yellow (LY) boyası kullanılarak yapılan kumulus ve oositler arasındaki gap junctional iletişim derecesi testi, granüloza hücrelerindeki lipid damlacıklarının Oil Red boya ile tayini tercih edilen diğer analiz yöntemlerindendir (Monsefi ve diğ., 2017; Sugimura ve diğ., 2018; Xu ve diğ., 2018).

2.5.3.1. Kaspaz 3

Son yıllarda özellikle biyoteknolojinin gelişmesiyle etkinlikleri daha ayrıntılı şekilde ortaya konan enzimlerin terapötik ajan olarak kullanıldığı ve hastalıkların tedavilerini olumlu yönde güçlendirdiği rapor edilmektedir. Tüm bu terapötik enzimler arasında kaspaz-3 en önemlilerinden biridir. Kaspaz-3, CASP3 geni tarafından kodlanan bir proteindir (CPP32 veya apopain olarak da adlandırılır); hedef proteini aspartik asit kalıntısından ayırmak için aktif bölgesinde katalitik nükleofil olarak bir sistein kullanan endoproteaz (sistein-aspartik proteazlar) ailesinin bir üyesidir. Kaspaz-3, apoptotik hücrelerde hem ekstrinsik (ölüm ligandları) hem de intrinsik (mitokondriyal) yollarla aktive edilen apoptozun önemli bir aracı olarak tanımlanmıştır. Ayrıca doku farklılaşması, rejenerasyon ve nöral gelişim gibi apoptotik olmayan çeşitli işlevlere de sahiptir (D'amelio ve diğ., 2010; Shalini ve diğ., 2015; Asadi ve diğ., 2022). Kaspaz 3, sığır embriyo gelişiminde de varlığı ve etkinliği tayin edilmiş kaspaz proteinlerinin en önemlilerindendir (Yuan ve diğ., 2005). Son yıllardaki çalışmalar, kaspaz 3'ün büyükbaş ve sığır luteal hücre apoptozunda önemli rol oynadığını göstermiştir (Carambula ve diğ., 2002; Tatsukawa ve diğ., 2006). Protein kinaz C (PKC) sinyal yolunun aktivasyonunun ve cAMP birikiminin kaspaz-3 mRNA ekspresyonunu baskılayarak sığır luteal hücrelerini apoptozdan koruyabileceği de bildirilmiştir (Jin ve diğ., 2011). Vandaele ve diğ. (2007), *in vitro* üretilen farklı gelişim kapasitesine sahip sığır embriyoları üzerine yaptığı bir çalışmada kaspaz-3 apoptozun hem reseptör aracılı hem de intrinsik yolunda yer aldığından, embriyolarda apoptoz insidansını belirlemek için aktif kaspaz-3'ün immünofloresan boyaması ile analizini tercih etmişlerdir (Vandaele ve diğ., 2007) Dolayısıyla *in vitro* embriyo üretimin aşamalarını destekleme amaçlı kullanılan maddelerin etkinliklerini ortaya koymak adına kaspaz-3 tayini ölçüt olarak kullanılmaktadır (Zhao ve diğ., 2017).

2.5.3.2. Konneksin 43

Konneksinler, vücut içerisindeki çeşitli doku ve organlardaki hücrelerarası iletişimin sağlanmasında komşu iki hücre arasında yer alan boşluk bağlantılarının (gap junction) oluşumunda rol alan en etkin proteinlerdir ve memelilerde hücrelerarası iletişimi geniş bir yayılım gösterirler. Memeliler gibi hücrelerarası iletişimi çeşitli ve ileri seviyede olan kompleks organizmalarda, haberleşmenin çeşitlerinden olan gap bağlantıları 6 adet konneksin monomerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Konneksin çeşitlerinden olan, doku ve organlarda en çok rastlanan ve 43 kilodalton molekül ağırlığına karşılık gelmesiyle Konneksin 43 olarak adlandırılan proteinler, ovaryumların granüloza hücrelerinde en yüksek seviyede tespit edilmiş konneksin tipi olup, kumulus ve oosit arası iletişimde etkin oldukları sığır dahil olmak üzere birçok memeli hayvanlarda tespit edilmiştir (Granot ve Dekel, 2002; Tuzcu ve diğ., 2010). Primordial foliküllerde tespit edilen ve foliküler büyümeye eşlik eden konneksin 43 gonadotropin hormonlarından etkilendiği, kan serumunda FSH seviyesi yükselmişken miktarının arttığı, LH'da ise konneksin 43'ü kodlayan mRNA seviyesinin düştüğü bildirilmiştir (Wiesen ve Midgley, 1993; Granot ve Dekel, 1997; Granot ve Dekel, 2002). Foliküler gelişimin yanında oositlerin gelişimsel yeterliliğe ulaşması için kumulus hücreleri arasındaki boşluk bağlantıları gereklidir. Read ve diğ.'nin (2018) yaptığı çalışmada, konneksin 43 ekspresyon seviyesinin sığır IVF ve embriyo kültüründen sonra geç morula/blastosist aşamasına kadar gelişen yüksek gelişimsel yetkinlikteki kumulus-oosit kompleksinin, iki hücre aşamasında duran düşük gelişimsel yetkinlikteki kumulus-oosit kompleksine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca, yüksek gelişimsel yetkinliğe sahip olduğu düşünülen kumulus-oosit kompleksinden elde edilen kumuluslarda gap junctional hücreler arası bağlantı oranı önemli ölçüde daha yüksek olduğu ve sığır oositlerinin sağlığını noninvaziv olarak test edebilmek için bir olanak sağladığı rapor edilmiştir (Read ve diğ., 2018).

Kurkumin ve timokinonun *in vitro* olgunlaşmadaki etkinliklerini ortaya koymak adına, doktora tez çalışması için, yapılan araştırmalarda rapor edildiği üzere antioksidan özellikleri dolayısıyla hücre içi oksidasyon testi, apoptozda etkin kaspaz-3 aktivasyonunda yaptıkları değişimler ve konneksin 43'ün kumulus hücreleri ile oosit arasındaki iletişimi sağlayan gap junction oluşumuna etkisi göz önünde bulundurularak kaspaz-3 ve konneksin 43 protein tayinleri analiz için seçilmiştir.

2.6. EMBRİYO DONDURMA YÖNTEMLERİ VE KRİYOPROTEKTANLAR

Sığır *in vivo* ve *in vitro* embriyo üretiminin yanı sıra embriyonun dondurularak uzun süreli saklanması, verimi yüksek değerli hayvanların genetik materyalinin kazancı, dünyanın farklı noktalarındaki çiftliklerde istenilen özellikte hayvanların üretiminin devam edebilmesi, transport sırasında stres kaynaklı meydana gelen hayvan zayıyatı ve harcanan maliyet açısından değerlendirildiğinde, devleşen embriyo ticareti için önem arz etmektedir. Bu sebeple bilim insanları soğutma ve kriyoprezervasyona karşı hala çok hassas olan embriyolar için yeni dondurma protokolleri oluşturarak uygun kriyoprotektan maddeleri ve bu maddelerin miktarları üzerine çalışmalar yapmaya devam etmektedir (Ferre ve diğ., 2020b).

Mevcut bilgilere göre embriyo kriyoprezervasyonu için iki temel yaklaşım vardır: kontrollü yavaş dondurma ve vitrifikasyon. Uluslararası Embriyo Teknolojisi Topluluğu'nun (IETS) 2017 yılında elde ettiği verilere göre, dünya genelinde kriyoprezerve edilen *in vivo* kaynaklı sığır embriyolarının yaklaşık %60'ında ve sığır IVK embriyolarının %34'ünde yavaş dondurma yöntemi kullanılmıştır (Viana, 2018). Kontrollü yavaş dondurma yaklaşımında, embriyolar dondurulmadan önce yaklaşık 1-2 M hücre zarını geçebilen ya da geçemeyen kriyoprotektanlarda inkübe edilerek ozmotik bir dengeye ulaşır, bu da sırasıyla dondurma sıcaklığının düşmesine ve kısmi embriyonik dehidrasyona neden olur ve ardından embriyolar kontrollü bir hızda, yavaş dondurma makinesi kullanılarak 0,2-2 °C/dakika (dk) hızla -30 ila -70 °C'ye soğutulur. Son olarak, embriyolar kısa veya uzun süreli saklama için sıvı nitrojen (LN₂) içine daldırılır (Palasz ve Mabletoft, 1996; Youngs ve diğ., 2010). Vitrifikasyon ise yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanlara (~7-8 M) kısa süreli maruz bırakma ve ardından embriyoların doğrudan sıvı nitrojene daldırılmasıyla uygulanır ve ultra hızlı soğutma ile sonuçlanır. Bu teknoloji ile cam benzeri amorf bir duruma ulaşılır ve hem hücre içi hem de hücre dışı buz kristallerinin oluşumu önlenir (Fahy ve diğ., 1984; Rall ve Fahy, 1985; Kuwayama, 2007; Najafzadeh ve diğ., 2021).

Yavaş dondurma tekniğinde embriyonun kriyotoleransı oldukça düşük iken, vitrifikasyon yönteminin uygulanmasıyla embriyonun dondurmada kaynaklı aldığı hasarın az da olsa önüne geçilebilmiştir. Ancak yavaş dondurma ve doğrudan transfer protokolü çiftlikte uygulanabilirliği açısından popülerliğini korumaktadır. *In vivo* taze ve dondurulmuş embriyolar arasındaki gebelik oranı farkı oldukça düşükken, *in vitro* kaynaklı embriyolar için durum böyle değildir. Şu anda, *in vitro* üretilen embriyolar için en popüler kriyoprezervasyon yöntemi hala vitrifikasyondur (Vajta, 2000; Ferre ve diğ., 2020b). Geliştirilen dondurma yöntemlerine

rağmen *in vitro* embriyo üretim sonrası kriyotoleransın düşük oluşu, embriyo ağırlığına, kültür sırasında farklı lipid damlacık deseni düzenlemeleriyle yüksek sitoplazmik lipid içeriğine (Abe ve diğ; 2002; Seidel, 2006) ve nispeten daha küçük iç hücre kütesine (inner cell mass), yol açan anormal oosit ve embriyo metabolizmasına bağlanmıştır. Dondurma hasarının ana kaynakları, potansiyel olarak dondurma ve çözme sırasında lipid fazı geçişi ve lipid peroksidasyonu sırasında meydana gelir. Fizyolojik sıcaklıklarda, lipid damlacıkları genellikle membranlara ve hücre içi yapılara esneklik sağlayan akışkan bir fazdadır. Bununla birlikte, soğutulduktan sonra ve ana lipid faz geçişinin altında, hidrofobik moleküllerin difüzyon hızı ve membranların geçirgenliği azalır, bu da membranların sertleşmesine, hücre içi lipidlerin yeniden dağılmasına ve lipid damlacıklarıyla ilişkili organellerin potansiyel olarak bozulmasına yol açar (Sudano ve diğ., 2011; Ferre ve diğ., 2020b).

Son zamanlarda muhtemelen belirli katkı maddeleri, embriyo kalite destekleyicileri, rekombinant albümin ve hyaluronan (Lane ve diğ, 2003), sentetik serum ikameleri (Duque ve diğ, 2003) ve ayrıca oviduktal ve uterus sıvıları (Lopera-Vasquez ve diğ., 2016) ile desteklenen tanımlanmış (veya yarı tanımlanmış) kültür ortamının kullanılması nedeniyle dondurulmuş embriyo transferlerinde tekrar bir artış görüldüğü bildirilmiştir (Ferre ve diğ., 2020).

Dondurma esnasında embriyoya zarar veren en önemli sebep hücre içi sıvı dolayısıyla oluşan buz kristalleridir. Oluşan bu zarardan korunmak için vitrifikasyon medyumlarına yüksek dozlarda etilen glikol (EG), dimetilsulfoksit (DMSO), gliserol, sükroz, galaktoz ve trehaloz gibi kriyoprotektan maddeler ilave edilmektedir. Kriyoprotektanlar, sıfırın altındaki sıcaklıklara ve donma sonrası çözünmenin sebep olduğu yaralanmalara karşı embriyoyu korur. Embriyolar kriyoprotektan içeren yüksek hipertonic solüsyona yerleştirilerek hücrelerdeki su dışarı atılır ve soğutma öncesinde embriyonik hücreler etkili bir şekilde dehidre edilir. Kriyoprotektan bileşikleri embriyonun hücre zarından geçerek hücre içi etki ya da makro molekül olması sebebiyle hücre zarından geçmeden hücre dışı etki gösterir. Embriyonik hücre membranından geçebilen kriyoprotektanlar küçük moleküler ağırlığa ve suyunkine benzer polar moleküler yapıya sahiptir, bu nedenle kolayca geçerler. Sığır embriyolarında yavaş dondurma için hücre zarını geçebilen etilen glikol ve gliserol kullanılırken, penetran olmayan kriyoprotektanlar hücre zarını geçemez ve hücre dışı olarak çalışır. Bu bileşikler dondurucu çözeltinin ozmolaritesini etkiler ve membranı stabilize ederek koruyucu etkisini gösterirler. Genellikle sükroz, galaktoz ve trehaloz gibi şeker türevleridir. Bu kriyoprotektanlar yavaş hızda dondurmada kullanılan dondurma çözeltilerine dahil edilmesi gerekmesi de çözülme

sonrasında suyun hücre zarı boyunca hareketini kontrol etmek için sıklıkla kullanılır. Hücre membranını geçemeyen bu kriyoprotektanlar daha çok vitrifikasyon medyumunda tercih edilirler (Jones, 2021). Sığır embriyoları için kullanılan vitrifikasyon solüsyonlarının çoğu, iki veya daha fazla penetran kriyoprotektan ile süktroz veya trehaloz gibi penetran olmayan kriyoprotektan kombinasyonundan oluşur. Sığır embriyoları için tipik bir vitrifikasyon solüsyonu %15-20 EG, %15-20 dimetil sülfoksit (DMSO) ve 0,3-0,5 mol/L sukroz veya trehalozdan oluşur. EG ve DMSO'nun birleşik konsantrasyonu, yavaş hızda dondurma için kullanılan EG veya gliserol konsantrasyonunun en az üç katıdır. Bu kriyoprotektan konsantrasyonlarına uzun süre maruz kalmak embriyo için toksik olabilir, bu nedenle embriyolar kademeli olarak daha yüksek konsantrasyonlara maruz bırakılır ve nihai vitrifikasyon çözeltisine maruz kalma süresi 40-45 saniye ile sınırlıdır (Jones, 2021).

Embriyo yapısını oldukça etkilediğinden kullanılan kriyoprotektanların türü ve konsantrasyonları çok önemlidir. Bazı araştırmacılar, embriyoları kriyoprotektan içeren dondurma ortamına yerleştirmeden önce, vitrifikasyon ortamında kullanılacak olandan (%30-40) daha düşük konsantrasyonlarda (%3-40) başlayan bir kriyoprotektan ile dengeleme ortamında ön inkübasyonunu kullanmaktadırlar (Ortiz-Escribano ve diğ., 2016; Dujičková ve diğ., 2021). Vitrifikasyon için soğutma 1000 °C/dakika olacak kadar hızlı olduğundan başarılı bir dondurma işleminde embriyonun maruz kaldığı yüzey alanı/hacim oranının yüksek olması gerekir. Bu yüzden açık uçlu payet (open pulled straw) yönteminin yanında Cryoloop™, Cryotop™ ve Cryoleaf™ yöntemleri bulunmaktadır (Saragusty ve Arav, 2011). Bu yöntemler, embriyonun minimum miktarda vitrifikasyon solüsyonu içine yerleştirilebildiği çeşitli platformlar veya taşıyıcıların oluşmasına fırsat vermektedir (Jones, 2021). Tüm bu gelişmeler embriyo dondurma işlemini başarılı olarak gerçekleştirilmesine fırsat verse de halen istenilen düzeyde eritme sonrası canlılık ve gelişme oranına ulaşamadığından, yenilikçi embriyo dondurma protokolleri ve kriyoprotektanlar üzerine çalışmalar devam etmektedir.

3. YÖNTEM

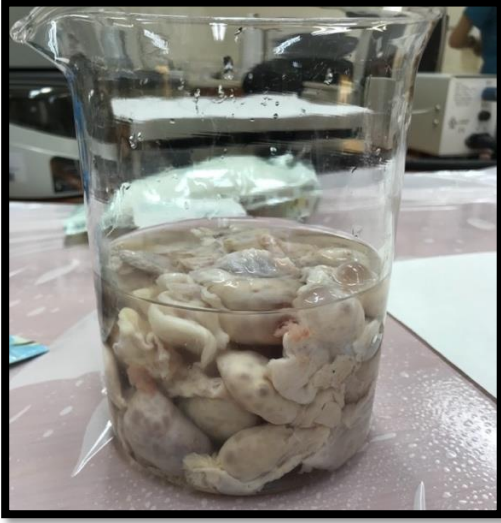
3.1. OOSİTİN ELDE EDİLMESİ

Doktora tez projesinde çalışma materyali olarak Holstein ırkı inek ve düvelerin ovaryumları kullanılmıştır. Ovaryumlar Kırklareli bölgesindeki mezbahalardan postmortem olarak toplanmış ve ovaryumların antibiyotik ilaveli Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS) içerisinde 30-35 °C’de ısısı korunarak 2-3 saat içerisinde laboratuvara ulaşması sağlanmıştır. Laboratuvara gelen ovaryumlar PBS ile tekrar yıkanarak behere aktarılmıştır (**Tablo 3.1, Şekil 3.1**). Ovaryumlar hemostatik pens ile sabitlenmiş ve üzerinde bulunan 2-8 mm çapında foliküller seçilmiştir. Foliküllerin üzerine bisturi yardımıyla kanama olmamasına dikkat edilerek sık ve ufak kesitler atılmıştır (**Şekil 3.2**). Foliküller açılan kesitlerden, içerisinde sıgır oosit yıkama medyumuna (heparinli TCM-199 medyumuna) (OWM) bulunan 20 ml’lik enjektör ve ince (22 gauge) kanül yardımı ile petriye yıkanmıştır (**Tablo 3.2**). Petriye yıkanan oositler stereo mikroskop altında incelenmiş ve cam pastör pipet yardımıyla 35 mm’lik petride bulunan, 38,8 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde gazlanmış sıgır oosit yıkama medyumuna seçilmek üzere aktarılmıştır. Tüm malzemeler steril olarak kullanılmıştır (Sandal, 2012).

Çalışma gününün öncesinde medyumların içerisine ilave edilen tüm stok solüsyonları hazırlanmış ve saklanma koşullarına uygun şekilde kullanım ömrü dikkate alınarak muhafaza edilmiştir (**Tablo 3.3**).

Tablo 3.1: Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS)

Kimyasal Madde	Miktar (gr)	Final Konsantrasyon
NaCl(Sodyum Klorür)	8 gr	137 mM
KCl(Potasyum Klorür)	200 mg	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	300 mg	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	2,16 gr	8,1 mM
Penisilin	300 mg	250 IU/mL
Streptomisin	250 mg	125 µg/mL
Neomisin	250 mg	125 µg/mL
Distile Su	1000 ml ye tamamla	
pH: 7,2-7,4 Osmotik basınç: 280 mOsm/kg 4 °C ay		



Şekil 3.1: Mezbahadan gelen sığır ovaryumları



Şekil 3.2: Doğrama metodu ile elde edilecek oositlerin laboratuvar görseli

Tablo 3.2: Oosit Yıkama Medyumu (OYM-OWM)

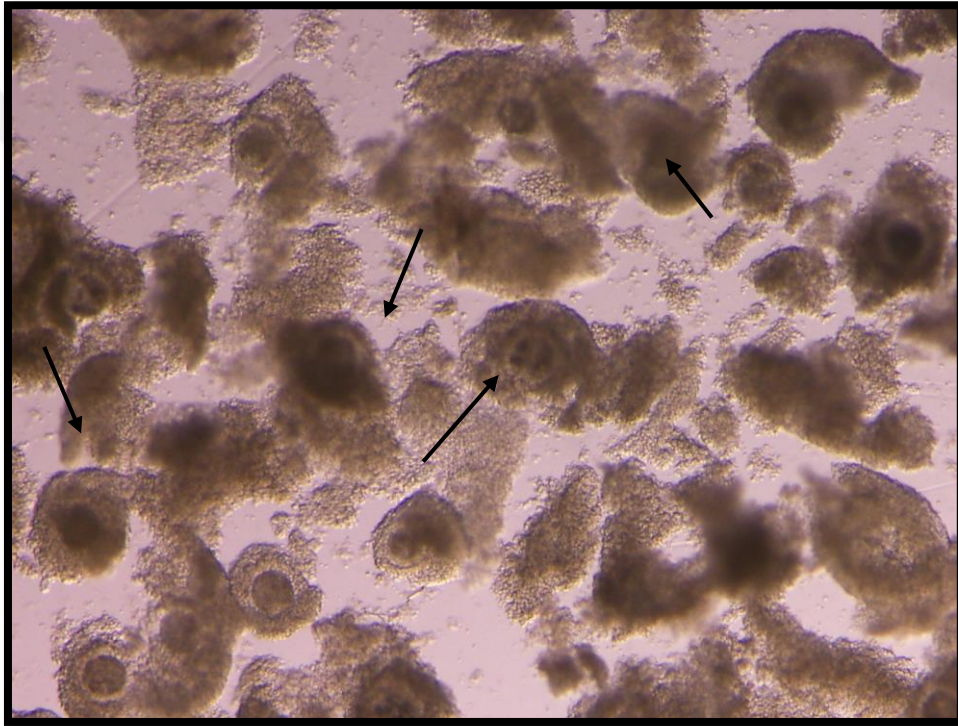
Kimyasal Madde	Heparinsiz Yıkama	Heparinli Yıkama	Final Konsantrasyon
TCM-199 (Hepes)	660 mg	660 mg	45 mL'ye tamamla
NaHCO ₃	99 mg	99 mg	45 mL'ye tamamla
Gentamisin sülfat (200x)	230 µL	230 µL	50 /mL
L-glutamin Stok (200x)	230 µL	230 µL	1 mM
Heparin Stok (50x)	-	900 µL	20 U/mL
pH: 7,2-7,4 Osmotik basınç: 280-285 mOsm/kg 4 °C 1 hafta			

Tablo 3.3: Medyumlar için Hazırlanan Stok Solüsyonları

Kimyasal Madde	Miktar	Sıvı Miktarı	Saklama Koşulları
Gentamisin sülfat Stok (200x)	300mg	30 mL ETS	4 °C'de 1 ay
Na-pirüvat Stok (20 mM)	22	10 mL ETS	4 °C'de 1 hafta
Heparin Stok (1gr/ml)	10 mg	100 mL Sperm-Talp Stok	-20 °C'de 1 ay
Magnezyum Klorit Stok (MgCl ₂ 6H ₂ O) (100 mM)	203 mg	10 mL ETS	-20 °C'de 1 ay
L-Glutamin Stok (200mM)	292,2 mg	10 mL ETS	-20 °C'de 1 ay

3.2. OOSİTLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Toplama işlemi tamamlandıktan sonra oositler, stereo mikroskop altında 5 kez OWM ile pasajlanarak yıkanmışlar ve morfolojik yapıları göz önünde bulundurularak seçilmişlerdir (**Tablo 3.2**). Oositler seçilirken, kompakt kumulus ooforus ve korona radiataya varlığına, kumulus ooforus hücrelerinin 3-4 sıra ile çevrili ve homojen sitoplazmaya sahip olmasına, hücre çeperlerinin sağlıklı ve zona pellusidalarının zarar görmemiş olmasına dikkat edilmiştir. Bahsedilen kriterlere uygun olan oositler pasajlama işlemlerinde seçilerek olgunlaşma medyumu (IVM) içeren petrilere aktarılmıştır (**Tablo 3.4, Şekil 3.3**).



Şekil 3.3: Olgunlaşmamış (Immature) sığır oositleri

3.3. OOSİTLERİN İN VİTRO OLGUNLAŞTIRILMASI

Çalışmada antioksidan madde olan Kurkumin ve Timokinonun sığır oositlerinin *in vitro* olgunlaşmasına olan etkileri araştırılmak istendiğinden, olgunlaşma için hazırlanan *in vitro* maturasyon (IVM) medyumuna yapılan ön deneysel çalışmalar sonucunda Kurkuminin ($5\mu\text{M}$ ve $10\mu\text{M}$) ve Timokinonun ($10\mu\text{M}$ ve $20\mu\text{M}$) iki farklı dozu ilave edilerek deney grupları oluşturulmuştur. Kontrol, K5, K10, T10ve T20 olmak üzere toplam beş grup oluşturulmuş ve *in vitro* olgunlaşma medyumları hazırlanmıştır. Stereo mikroskop altında olgunlaştırılmak

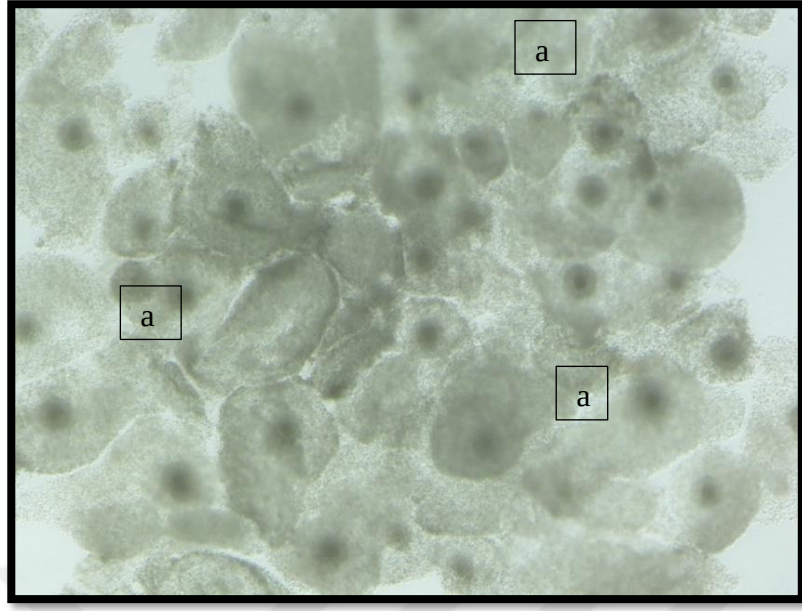
üzere seçilen oositler, sıgır *in vitro* olgunlaşma medyumunun (TCM-199) her grup için ayrı ayrı hazırlanan yıkama petrilere pasajlanmak üzere tesadüfi olarak sayıları beş eşit şekilde bölünmüştür. Yıkanan oositler kendi grupları dikkate alınarak olgunlaştırılmak üzere 700'er µL IVM içeren dört kuyucuklu petrilere, kuyucuklarda ortalama 30-50 oosit olacak şekilde aktarılmıştır. Antioksidan ilave edilmeyen Kontrol grubu ile kurkumin ve timokinon ilave edilmiş K5, K10, T10 ve T20 grubu olacak şeklinde toplam beş grup olarak hazırlanan IVM petrilere aktarılan oositler 38,8 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre 22-24 saat süreyle olgunlaştırılmaya bırakılmışlardır (**Tablo 3.4, Şekil 3.4**).

Tablo 3.4: İn Vitro Olgunlaşma Medyumu (IVM)

Kimyasal Madde	Miktar
TCM-199	285 mg
NaHCO ₃ (Sodyum Bikarbonat)	66 mg
Na-pirüvat Stok	300 µL
L-Glutamin Stok	45 µL
EGF (10 µg/mL) (200x)	75 µL
FSH ve LH *	(2 IU/mL)
Gentamisin sülfat stok (200x)	150 µL
Embriyo test edilmiş su (ETS)	30 ml tamamla
pH: 7,2-7,4 osmotik basıncı: 280±10 mOsm/kg 4 °C 1 hafta	

*FSH ve LH çalışma sabahında ml'de 2IU olacak şekilde *in vitro* olgunlaşma medyumuna ilave edilmiştir.

Çalışma sabahında *in vitro* olgunlaşma medyumunu hazırlandıktan sonra gruplar için beş eşit parçaya bölünerek kurkumin için 5µM ve 10 µM ve timokinon için 10µM ve 20µM olacak şekilde antioksidanların ilavesi yapılarak gruplar oluşturulmuştur.



Şekil 3.4: Olgunlaşmış (mature) sığır oositleri (a: genişlemiş kumulus hücreleri)

3.4. DENEYSEL ÇALIŞMALARIN PLANI

Mezbahalarda kesimlerin az ve düzensiz oluşu, kesilen hayvanların sağlık problemleri, toplanan ovaryumların kalitesizliği ve elde edilen oosit sayılarının az olması dolayısıyla oositlerin olgunlaşmasının sonrasında hedeflenen deneyler 3 aşamada gerçekleştirilmiştir.

- Deney 1; Fertilizasyon ve SOF kültür medyumunda embriyonun geliştirilmesi ve dondurulması
- Deney 2; Fertilizasyon ve CR1aa kültür medyumunda embriyonun geliştirilmesi ve dondurulması
- Deney 3; Oosit maturasyon analizlerinin yapılması
- Deney 4; Dondurulan Embriyoların Eritilmesi, Kültüre Edilmesi ve Gelişimlerinin Değerlendirilmesi

3.5. OLGUNLAŞAN OOSİTLERİN DONDURULMUŞ SPERMA İLE DÖLLENMESİ

Olgunlaşan oositlerin döllenmesi için sığır *in vitro* fertilizasyon medyumunu olan IVF-TALP medyumunu kullanılmıştır. IVF-TALP medyumunu yıkama için 35mm'lik petrilere 2 mL ve döllenme için dört kuyucuklu petriye her kuyucukta 400 µL olacak şekilde hazırlanmış ve fertilizasyon öncesinde 38,8°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre gazlanmaya bırakılmıştır.

Olgunlaşmasını tamamlayan oositler her bir grup göz önünde bulundurularak, öncelikle gazlanmış yıkama petrisinde 3 kez yıkandıktan sonra döllenme petrisine her kuyucukta 25-35 oosit olacak şekilde aktarılmıştır (**Tablo 3.5, Tablo 3.6, Tablo 3.7**) (Sandal, 2012).

Tablo 3.5: İn Vitro Fertilizasyon Medyumu Stok Solüsyonu (IVF TALP-Stok)

Kimyasal Madde	Miktar	Final Konsantrasyon (mM)
NaCl(Sodyum Klorür)	1,3324 gr	114
KCl (Potasyum Klorür)	47,7 mg	3,2
NaHCO ₃ (Sodyum Bikarbonat)	420,1 mg	25
Laktik Asit Solüsyonu	374 µL	10
NaH ₂ PO ₄ (Sodyum Fosfat Monobazık)	9,6 mg	0,40
CaCl ₂ , 2H ₂ O	58,8 mg	2,00
MgCl ₂ , 6H ₂ O (100 mM stok)	1 mL	0,5
Fenol Red	1 mg	5 g/mL
ETS	200 mL'ye tamamla	-
4 °C 1 ay		

Tablo 3.6: IVF-TALP Medyumu

Kimyasal Madde	20 mL	Final Konsantrasyon
IVF-TALP Stok	20 mL'ye tamamla	
PHE Stok (100x)	200 µL	20 µM-10 µM-1 µM
Heparin Stok (170 USP/mg)	600 µL	30 µg/mL
Na-pirüvat Stok (80x stok)	250 µL	0,25 mM
Gentamisin Sülfat Stok (10 mg/mL)	100 µL	50 µg/mL
BSA (Fraksiyon V)*	120 mg	6 mg/mL
pH: 7,2-7,4 Osmotik basınç: 295±5 mOsm/kg 4 °C 1 hafta *BSA medyuma ilave edildikten sonra 37 °C etüvde erimesi sağlanır.		

Tablo 3.7: PHE Stok Solüsyonu

Kimyasal Madde	30 mL 100x PHE stok	100x PHE stok içindeki konsantrasyonu	IVF-TALP içindeki konsantrasyonu
Penisilamin (10 mM)	6 mL	2 mM	20 µM
Hipotaurin (10 mM)	3 mL	1 mM	10 µM
Epinefrin (1 mM)	3 mL	100 µM	1 µM
NaCl (157 mM)	18 mL	-	-
--NaCl 157 mM: 918 mg NaCl /100 mL ETS --Laktat bisülfid stok: 126 µL Sodyum Laktat 50 mg Sodyum metabisülfid 50 mL ETS (1 M HCl ile pH'sı 4,0'e ayarlanır.) --Penisilamin (10 mM): 15 mg/10 mL NaCl solüsyonu --Hipotaurin (10 mM): 11 mg/10 mL NaCl solüsyonu --Epinefrin (1 mM): 1,8 mg/10 mL Laktat bisülfid stok solüsyonu (Epinefrin solüsyonu ışıktan korunarak hızlı şekilde hazırlanıp ana karışıma katılmıştır.)			

Döllenme için Holstein ırkı boğaya ait dondurulmuş sperma payetlerinden 2 adet kullanılmıştır. Çözündürme için payetler 37 °C'deki su banyosunda 30 sn süre ile eritilmiştir. Süre sonunda payetler kurutulmuş, kesilmiş ve sperma içeriği mikrosantrifüj tüpüne boşaltılmıştır. Çözündürülen spermaların mikroskopta CASA (Computer Assisted Sperm Analyser) sistemi ile motilite ve konsantrasyon analizleri yapılmış ve %45-55 motiliteye sahip spermalar çalışmada kullanılmıştır. Çözündürülen sperma fertilizasyonda kullanılmak üzere bir seri yıkama işleminden geçirilmiştir. Yıkama için Sperm-TALP medyumunu kullanılmıştır. 37 °C etüvde 15 ml'lik konik tüpte 4mL olacak şekilde hazırlanan Sperm TALP medyumunun içine çözündürülen sperma ilave edilmiştir. Tüpteki içerik otomatik pipet yardımıyla yavaşça karıştırılmış ve 1500 g' de 5 dk'ya ayarlanan santrifüj cihazına yerleştirilmiştir. İşlem sonunda dibe çöken spermatozoonlara dikkat edilerek oluşan süpernatant tüpten uzaklaştırılmıştır. İkinci kez santrifüj işlemi için tüp içeriği Sperm-TALP medyumunu ile tekrar 4 mL'ye tamamlanmış, karıştırılması sağlanmış ve cihaza yerleştirilmiştir. Son kez 1500 g'de 5 dk santrifüj edilen spermadan çıkan süpernatant yine dipteki spermatozoonların hareket etmemesine dikkat edilerek uzaklaştırılmış bu kez 500 µL tamamlanacak şekilde Sperm TALP medyumunu eklenmiştir (Tablo 3.8, Tablo 3.9) (Sandal, 2012).

Tablo 3.8: Sperma Yıkama Medyumu Stok Solüsyonu (Sperm TALP)

Kimyasal Madde	200 mL	Final Konsantrasyon (mM)
NaCl	1,168 gr	100
KCl	46,2 mg	3,1
NaHCO ₃	420 mg	25
Laktik asit solüsyonu	807 µL	21,6
NaH ₂ PO ₄	7 mg	0,29
CaCl ₂ , 2H ₂ O	61,7 mg	2,1
MgCl ₂ , 6H ₂ O Stok	3 mL	1,5
Hepes (asit)	476,6 mg	10
Fenol Red	1 mg	5 µg/mL
ETS	200 mL'ye tamamla	-

Tablo 3.9: Sperm-TALP Medyumu

Kimyasal Madde	20 mL	Final konsantrasyon
Sperm-TALP Stok	20 mL (tamamla)	-
Gentamisin sülfat Stok	100 µL	50 µg/mL
Na-pirüvat Stok	1 mL	1 mM
BSA (Fraksiyon V)*	120 mg	6 mg/mL
pH: 7,2-7,4 Osmotik basınç: 305±7 mOsm/kg 4 °C – 1 hafta * BSA medyuma ilave edildikten sonra 37 °C etüvde erimesi sağlanır.		

İşlemler sonucunda spermatozoonların motilitesi mikroskopta incelenerek döllenmeye uygunluğu kontrol edilmiştir. Hazırlanan sperma, kuyucuk başına $4-6 \times 10^5$ spermatozoon olacak şekilde, döllenme medyumuna daha önce aktararak gazlı ortama alışmaları sağlanan olgun oositlerin üzerine otomatik pipet yardımıyla bırakılmıştır. Bir araya gelen oosit ve spermatozoonların son kontrolleri mikroskopta yapılarak, 18-22 saat süre boyunca fertilizasyon için 38,8 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilmiştir (Sandal, 2012).

3.6. DÖLLENEN OOSİTLERİN KÜLTÜR MEDYUMUNA AKTARILMASI

3.6.1. Kültür Medyumunun Hazırlığı

Çalışmada döllenmiş oositlerin kültüre edilmesi için SOF ve CR1aa olmak üzere iki farklı medyum kullanılmıştır. Kültür medyumlarının stok solüsyonları çalışma gününden önceki günlerde hazırlanmış ve kültüre aktarım gününde kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edilmiştir (Tablo 3.10 ve Tablo 3.11).

Tablo 3.10: SOF Stok Solüsyonları

Kimyasal Madde	Miktar
SOF- Stok A Solüsyonu (4 °C – 1 ay)	
NaCl	3,145 gr
KCl	267 mg
KH ₂ PO ₄	81 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	91 mg
Na-Laktat Solüsyonu	300 µL
ETS	49,20 mL
SOF- Stok B Solüsyonu (4 °C – 1 ay)	
NaHCO ₃	1,050 gr
Fenol Red	5 mg
ETS	50 mL
SOF- Stok C Solüsyonu (4 °C – 1 hafta)	
Na-pirüvat	80 mg
ETS	10 mL
SOF- Stok D Solüsyonu (4 °C - 1 ay)	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	262 mg
ETS	10 mL

Tablo 3.11: CR1aa Kültür Medyumu Stok Solüsyonları

Kimyasal Madde	Miktar
CR1aa- Stok A (4 °C - 1 ay)	
NaCl	440 mg
KCl	15 mg
Na-pirüvat	3 mg
NaHCO ₃	144 mg
Fenol Red (% 0,5)	0,032 (µL)
ETS	50 mL'ye tamamla
CR1aa- Stok B (4 °C - 1 ay)	
LaktikAsit HemikalsiyumTuzu	150 gr
ETS	50 mL

Döllenme sonunda kültüre aktarma işlemi için aktarma saatinden en az 2 saat önce kültür medyumları hazırlanmış ve 38,8 °C’de %5 CO₂, %5 O₂ ve %90 nem içeren gaz karışımı inkübatöre gazlanmak için bırakılmışlardır. Kültür için dörtlü kuyucuk petrilerine damlalar şeklinde ve yıkama için ise 35mm’lik petrilere 2 ml olacak şekilde SOF ve CR1aa medyumları hazırlanmıştır. Dörtlü kuyucuklara otomatik pipet yardımıyla 100 µL’lik damlalar dağılmayacak şekilde hazırlanmış ve üzerine damlayı kapatacak şekilde mineral yağ ilave edilmiştir. Dörtlü kuyucuk petrileri ve 35mm’lik yıkama petrileri tüm gruplar düşünülerek ayrı ayrı hazırlanmış ve gazlanmak üzere inkübatöre bırakılmışlardır (**Tablo 3.12, Tablo 3.13**) (Sandal, 2012).

Tablo 3.12: SOF Kültür Medyumları

Kimyasal Madde	50 mL
ETS	39 mL
SOF-Stok A	5 mL
SOF-Stok B	5 mL
SOF-Stok C	500 µL
SOF-Stok D	500 µL
Tri-Na-sitrat-dihidrat	5 mg
Miyo-inositol	25 mg
BME (50X)	1,5 mL
MEM (100X)	500 µL
L-Glutamin Stok	50 µL
Gentamisin Sülfat Stok	250 µL
FCS (%5)	2,5 mL
pH: 7,4 Osmotik basınç: 275-285 mOsm/kg 4 °C 1 hafta	

Tablo 3.13: CR1aa Kùltür Medyumunu

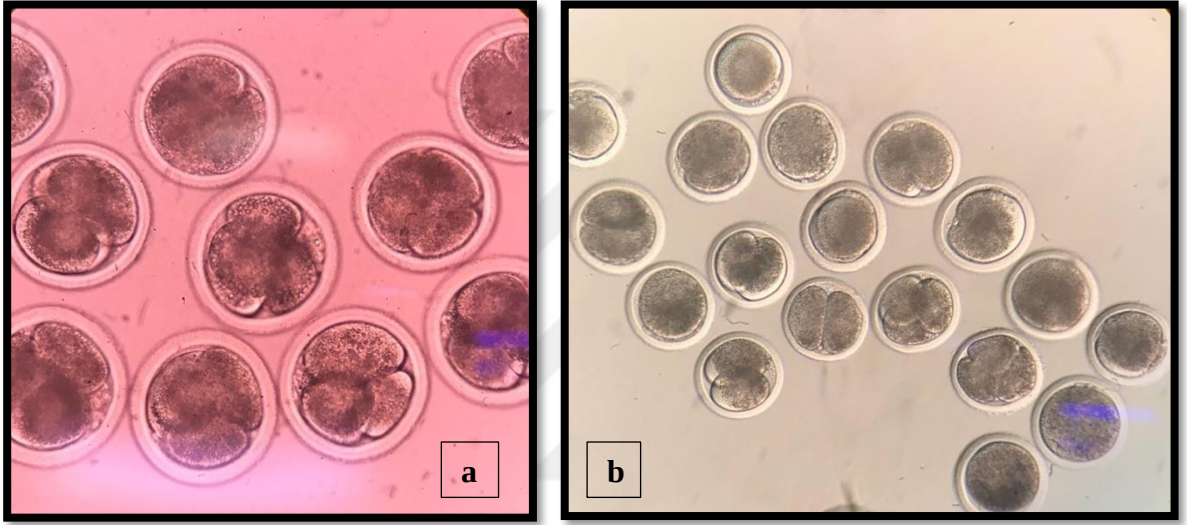
Kimyasal Madde	50 mL
H ₂ O	50 mL'ye tamamla
CR1aa Stok A	38 mL
CR1aa Stok B	10 mL
BME 50X	1,0 mL
MEM 100X	500 µL
L-Glutamin Stok	50 µL
Penisilin 100 U/mL	3,5 mg
Streptomisin 100 µg/mL	5 mg
FCS (%5)	2,5 ml
pH: 7,4 Osmotik basınç: 280-285 mOsm/kg 4 °C 1 hafta	

3.6.2. Kùltür Medyumuna Aktarma

Aktarıma başlanılmadan önce fertilizasyon medyumundan çıkan oositler etraflarındaki kumulus hücreleri ve spermatozoonlardan ayrılması için kendi grupları göz önünde bulundurularak ayrı ayrı hazırlanmış oosit yıkama medyumunda (Hepesli TCM-199) karıştırılarak yıkanmışlardır. Bu işlem için oosit yıkama medyumunu her birinde 1mL olacak şekilde hazırlanan 15ml'lik konik tüplerde 38,5 °C'de saklanmıştır. Öncelikle dörtlü kuyucukta yer alan oositler otomatik pipet yardımıyla hazırlanan konik tüplere aktarılmıştır. Konik tüpler vortex cihazı yardımıyla 1 dk boyunca karıştırma işlemine tabi tutulmuşlardır. İşlem sonunda 35 mm'lik boş steril petri kabına boşaltılmışlardır. Petri stereo mikroskop altında incelenerek, bulunan embriyolar önceden hazırlanmış, içerisinde oosit yıkama medyumunu bulunan ve gazlanmaya bırakılan yeni petriye aktarılarak yıkama işlemi tamamlanmıştır. Yıkanan embriyolar kùltür medyumlarına aktarılacak için önceden hazırlanmış ve gazlanmış SOF ve CR1aa yıkama petrilerinde 3 kez yıkandıktan sonra dört kuyucuklu petrilere her damlada 20-30 embriyo olacak şekilde aktarılmışlar ve 7-9 gün süre ile 38,8 °C'de %5 CO₂, %5 O₂ ve %90 nem içeren gaz karışımı inkübatörde kùltüre edilmiş ve gelişimleri izlenmiştir (Sandal, 2012).

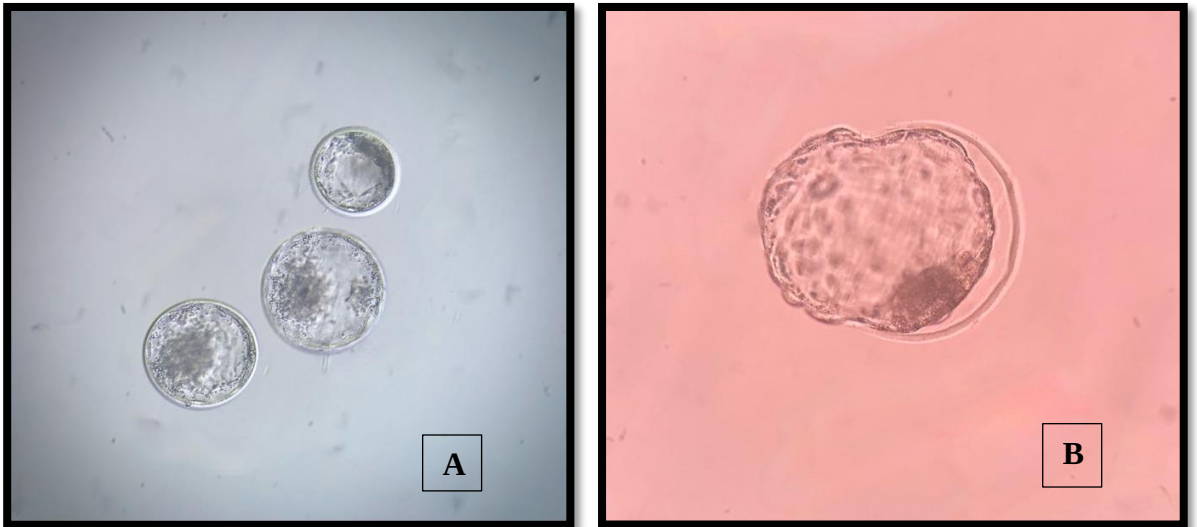
3.7. KÜLTÜRE AKTARILAN EMBRİYOLARIN BÖLÜNMELELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Embriyolar *in vitro* kültür medyumuna aktarılmalarından 24 saat sonra yarıklanma (cleavage) kontrolleri yapılmış ve deney gruplarının bölünen embriyo sayıları kaydedilmiştir. Sonrasında *in vitro* kültürün 5. ve 8. günlerinde embriyolar kontrol edilerek morula, kompakt morula, erken blastosist, blastosist, genişlemiş blastosist (expanded blastosist), hatching ve hatched blastosist olmak üzere değerlendirilerek kaydedilmiştir (Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8) (Sandal, 2012).

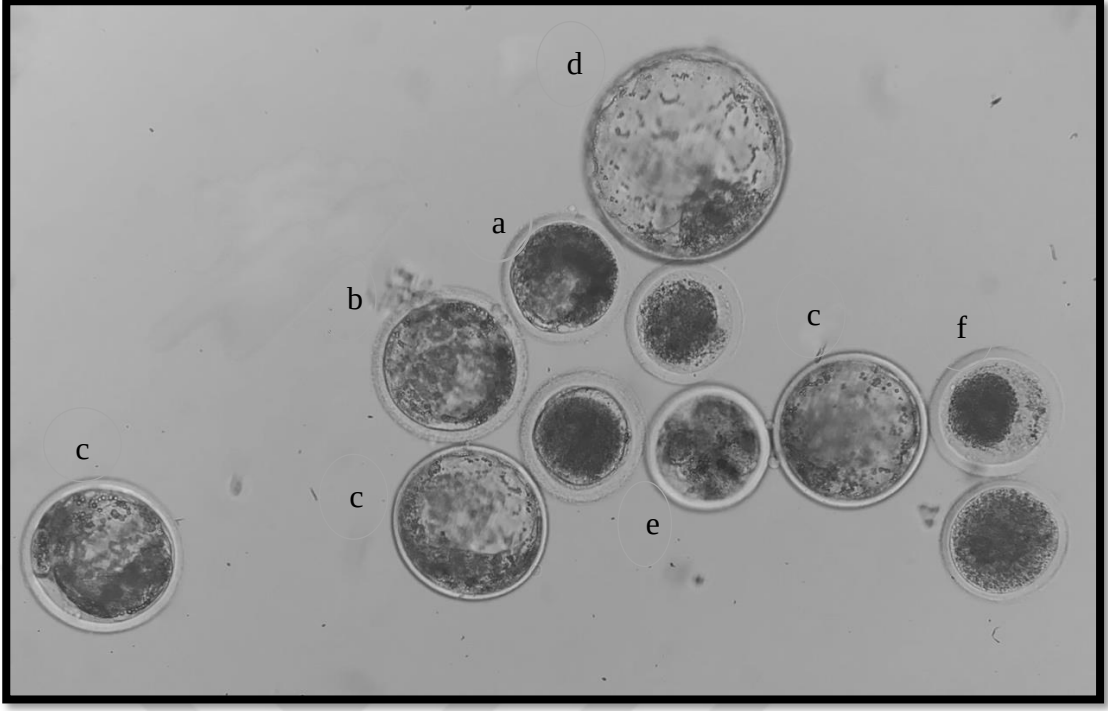


Şekil 3.5: SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen 2 ve 4 blastomerli embriyolar.

a: CR1aa medyumunu , b: SOF medyumunu



Şekil 3.6: A) Expanded blastosistler, B) Hatching blastosist



Şekil 3.6: SOF medyumunda geliştirilen embriyolar.

(a:kompakt morula, b: erken blastosist, c: blastosist, d: expanded blastosist, e:dejenere embriyo, f: döllenmemiş oosit)



Şekil 3.7: 8. günde kaydedilen hatched embriyolar.

3.8. GELİŞEN EMBRİYOLARIN DONDURULMASI

Çalışmada embriyoların dondurma işlemi için hızlı dondurma metodu olan payet içerisinde camlaştırma (vitrifikasyon) yöntemi kullanılmıştır. Dondurma için SOF ve CR1aa kültür medyumlarında gelişen blastosist ve expanded blastosist aşamasına ulaşan embriyolar seçilmişlerdir. Embriyolar dondurulması için üç aşamalı (yıkama, ekilibrasyon, vitrifikasyon) medyumlarına aktarılmıştır. Üç aşamada kullanılan medyumlar; Temel Solüsyonu (PBS-TS), Vitrifikasyon Solüsyonu-1 (VS1) ve Vitrifikasyon Solüsyonu-2 (VS2) medyumlarıdır (**Tablo 3.14, Tablo 3.15**). Öncelikle yıkama için Temel Solüsyon olarak %20 fetal buzağı serumu (FCS) içeren, antibiyotik ilaveli fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS-TS) hazırlanmıştır. Ekilibrasyon medyumunu olarak VS1, temel solüsyonun içerisine 1 M dimetilsülfoksit (DMSO) ve 1,5 M etilen glikol (EG) olacak şekilde kimyasallar eklenerek hazırlanmıştır. Vitrifikasyon medyumunu olarak VS2 de temel solüsyonun içerisine 2 M DMSO, 2,5 M EG ve 0,5 M sükröz ilave edilerek hazırlanmıştır (Sandal, 2012).

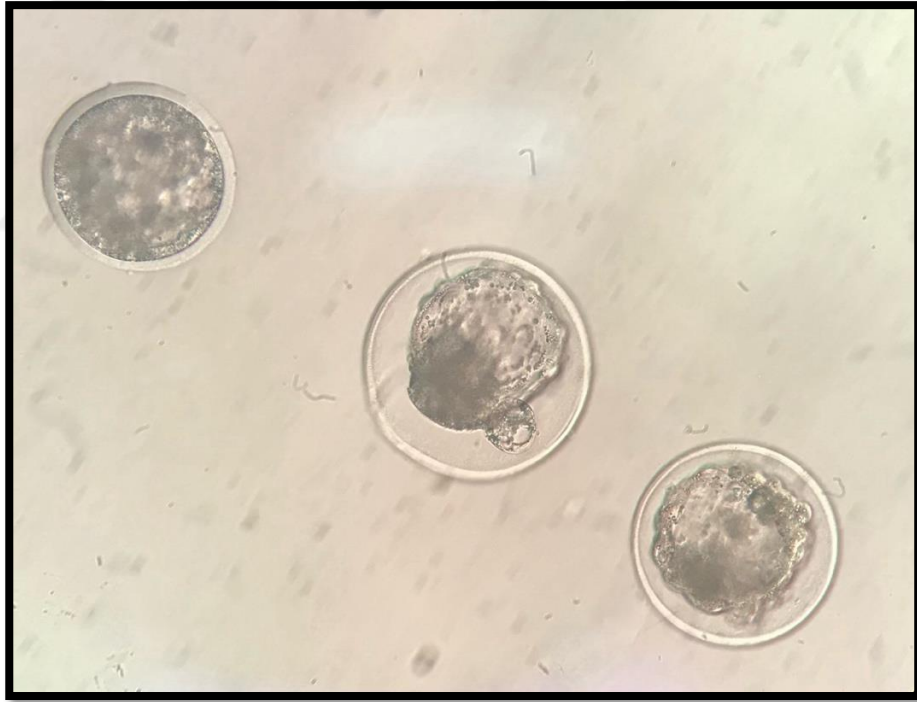
Tablo 3.14: Vitrifikasyon Medyumunun Temel Solüsyonu (PBS-TS)

Kimyasal Madde	Miktar (gr/L)	Final Konsantrasyon	Saklama Koşulları
NaCl	8 gr	137 mM	pH: 7,2-7,4 Osmotik basınç: 280-285 mOsm/kg 4 °C 1 ay *Kimyasallar ayrı kaplarda çözündürülerek solüsyona ilave edilmişlerdir.
KCl	200 mg	2,7 mM	
KH ₂ PO ₄	300 mg	1,5 mM	
Na ₂ HPO ₄ anhidroz	1,15 gr	8,1 mM	
CaCl ₂ 2H ₂ O*	133mg	1,2 mM	
MgCl ₂ 6H ₂ O*	100 mg	0,49 mM	
D-Glukoz	100 mg	5,5 mM	
Na-Pirüvat	36 mg	0,32 mM	
Penisilin	66 mg	100 IU/mL	
Streptomisin	50 mg	50 µg/mL	

Tablo 3.15: Ekilibrasyon, Vitrifikasyon ve Dondurma-Eritmede Kullanılan Medyumları

Kimyasal Madde	(VS1) Ekilibrasyon Medyumu	(VS2) Vitrifikasyon Medyumu	0,5 M Sükröz Medyumu	1M Sükröz Medyumu
Dimetilsülfoksit (DMSO)	1M- (781 µL)	2M- (1,560 mL)	-	-
Etilen Glikol (EG)	1,5M- (931 µL)	2,5M- (1,550 mL)	-	-
Sükröz	-	0,5M- (1,71 gr)	1,71 gr	3,42 gr
Temel Solüsyon (%20 FCS'li PBS-TS)	8,288 mL	10 mL'ye tamamla	10 mL'ye tamamla	10 mL'ye tamamla

Vitrifikasyon için kullanılacak tüm medyumlar oda sıcaklığında 60 mm'lik petrilere 70 μ L'lik damlalar halinde hazırlanmışlardır. Ayrıca dondurma için kullanılacak payetlerin işlem öncesinde 1M süktroz içeren temel solüsyon ile boşluklar bırakılarak doldurulması sağlanmış ve dondurma işlemi için hazırlanmıştır. Vitrifikasyon için seçilen embriyolar önce temel solüsyonuna aktararak yıkama ve adaptasyon amacıyla kısa süre bekletilmişlerdir. Yıkanan embriyolar ekilibasyon için VS1 solüsyonuna aktarılmış ve 3 dk süre ile muhafaza edilmişlerdir (**Şekil 3.9**). Süre sonunda VS2 solüsyonuna aktarılmış ve 30 sn içerisinde önceden hazırlanan payetin boşluk kalan kısmına en fazla 3 embriyo olacak şekilde yerleştirilmişlerdir. Payetin açık olan ucu önce polivilin alkole (PVA) daldırılıp sonra suya daldırılarak katılaşp kapanması sağlanmıştır. Sonrasında payet -196°C'lik sıvı azota 45°'lik açıyla daldırılarak dondurulmuştur (Sandal, 2012).



Şekil 3.8: Blastosist aşamasına ulaşan embriyoların dondurma esnasında VS1 medyumuna aktarılması

Vitrifikasyon için kullanılacak tüm medyumlar oda sıcaklığında 60 mm'lik petrilere 70 μ L'lik damlalar halinde hazırlanmışlardır. Ayrıca dondurma için kullanılacak payetlerin işlem öncesinde 1M süktroz içeren temel solüsyon ile boşluklar bırakılarak doyumu sağlanmış ve dondurma işlemi için hazırlanmıştır. Vitrifikasyon için seçilen embriyolar önce temel

solüsyonuna aktararak yıkama ve adaptasyon amacıyla kısa süre bekletilmişlerdir. Yıkanan embriyolar ekilibrasyon için VS1 solüsyonuna aktarılmış ve 3 dk süre ile muhafaza edilmişlerdir (**Şekil 3.9**). Süre sonunda VS2 solüsyonuna aktarılmış ve 30 sn içerisinde önceden hazırlanan payetin boşluk kalan kısmına en fazla 3 embriyo olacak şekilde yerleştirilmişlerdir. Payetin açık olan ucu önce polivilinalkole (PVA) daldırılıp sonra suya daldırılarak katılaşp kapanması sağlanmıştır. Sonrasında payet -196 °C'lik sıvı azota 45°'lik açıyla daldırılarak dondurulmuştur (Sandal, 2012).

3.9. DONDURULAN EMBRİYOLARIN ERİTİLMESİ, KÜLTÜRE EDİLMESİ VE GELİŞİMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dondurulan embriyoların eritilmesi için eritme işleminden önce %20 FCS katkılı PBS ile 1M ve 0,5 M süktroz içeren iki ayrı medyum hazırlanmıştır. Eritme sırasında medyumlar 35mm' lik petride 1 ml olacak şekilde hazır olarak bulundurulmuştur. Dondurulan payet önce 10 sn havada tutulmuş sonra 37°C'deki su banyosuna daldırılmış ve 30 sn boyunca bekletilerek eritilmiştir. Su banyosundan çıkarılan payet peçete ile iyice kurulandıktan sonra önce PVA'lı kısım sonra pamuklu kısım kesilmek üzere içerik önceden hazırlanan 1M Süktroz içeren PBS'nun bulunduğu petriye boşaltılmıştır. Bu solüsyonda 3 dk süre ile bekletilmiştir. Bu süre içerisinde petri taranarak embriyolar bulunmuş ve süre sonunda 0,5 M süktroz içeren PBS'in bulunduğu petriye aktarılmış ve burada da 1 dk boyunca bekletilerek embriyoların ortama adaptasyonu sağlanmıştır (**Şekil 3.9**).



Şekil 3.9: Dondurulan embriyoların eritme sırasında 0,5 M süktroz içeren vitrifikasyon temel solüsyonu içerisine aktarılması

Eritme ve sonrasındaki işlemler bittikten sonra kültür medyumlarına aktarılmadan önce embriyolar yıkama işlemi için Hepseli TCM199 medyumuna aktarılmış ve 3 kez yıkanmışlardır. Tüm embriyolar kendi gruplarına uygun olarak yıkama ve kültür petrisi olarak hazırlanan ve gazlanma için önceden 38,8 °C’de %5 CO₂, %5 N₂ ve %90 nem içeren gaz karışımı inkübatöre bırakılan SOF ve CR1aa medyumunda önce yıkanmış sonra kültüre edilmek üzere dörtlü kuyucuk petrisinde bulunan damlalarına aktarılmışlardır. Eritme sonrası kültür medyumuna aktarılan embriyoların, inkübatöre bırakılma saatleri dikkate alınarak 24 ve 48 saat süreyle gelişimleri takip edilmiştir (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11) (Sandal, 2012).



Şekil 3.10: Dondurulan ve eritilen embriyoların 24. saat kontrolünde gelişmiş expanded blastosist



Şekil 3.11: CR1aa medyumunda geliştirilen embriyoların dondurma eritme sonrası 48. saatte hatched blastosist görüntüsü

Doktora tez çalışmasında *in vitro* embriyo üretimi süresince aksi belirtilmedikçe tüm kimyasallar Sigma-Merck marka kullanılmıştır.

3.10. OLGUNLAŞMA ANALİZLERİ İÇİN OOSİTLERİN AYRILMASI

3.10.1. Hücre İçi Oksidasyon Analizi

Tez çalışmamızda hücre içi oksidasyon düzeyi Loetchutinat ve diğ. (2005) ile Sá ve diğ. (2020) tarafından önerilen yöntemlerde bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Olgunlaşması tamamlanan oositler, 100 μ L gazlanmış maturasyon medyumunu içeren mikrosantrifüj tüpüne her grup için ayrı ayrı olmak koşuluyla 10 oosit olacak şekilde hücre içi oksidasyon analizi için ayrılmıştır. Deney grupları 5000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüjlenmiştir, üst sıvı tamamen uzaklaştırılmıştır ve 1 ml PBS ilave edilmiştir. Dichlorofluorescein diacetate (DHCF-DA) çözeltisi (7.7 mM'lık stok olarak etanolde çözündürülmüş) son derişim 40 μ M olacak şekilde 5,2 μ L eklenmiştir ve oda ısısında 5 dk inkübe edilmiştir. Ardından tekrar 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır ve 400 μ L PBS ilave edilmiştir. 200 μ L olacak şekilde iki tekrarlı olarak 96 kuyulu platlere konulan örnekler, 490 nm eksitasyon ve 524 nm emisyon dalga boylarında olacak şekilde spektrofloreometrede (Bio-tek FLx800) ölçülmüştür (Şekil 3.12). DHCF floresans yoğunluğu belirlenen deney grupları kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir.

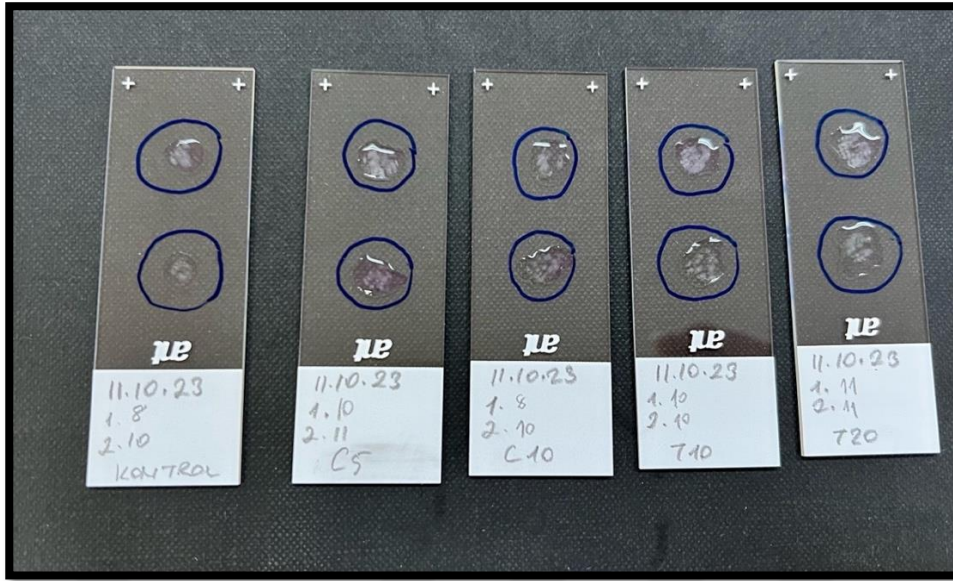


Şekil 3.12: Spektrofotometre (Bio-tek FLx800)

(<https://www.thelabworldgroup.com/product/biotek-flx800-microplate-reader> [Ziyaret tarihi: 12.05.2024])

3.10.2. İmmünohistokimyasal Analizler

Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler için her grup için lizinli lama iki ayrı halka çizilmiş ve lamdaki halka içerisine kumulus hücreleri ile beraber oosit yerleştirilmiş ve üzerine 10 μ L %3'lük paraformaldehit damlatılarak buzdolabında 1 saat fıkse edilmiş, ardından paraformaldehit uzaklaştırılmıştır (**Şekil 3.13**). Fiksasyonun ardından, hücrelerdeki apoptoz belirteci olan aktif kaspaz-3 ve konneksin 43 proteininin immünoreaktiviteyi, Streptavidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (StrepABC) yöntemi ile immünohistokimyasal olarak incelenmiştir.

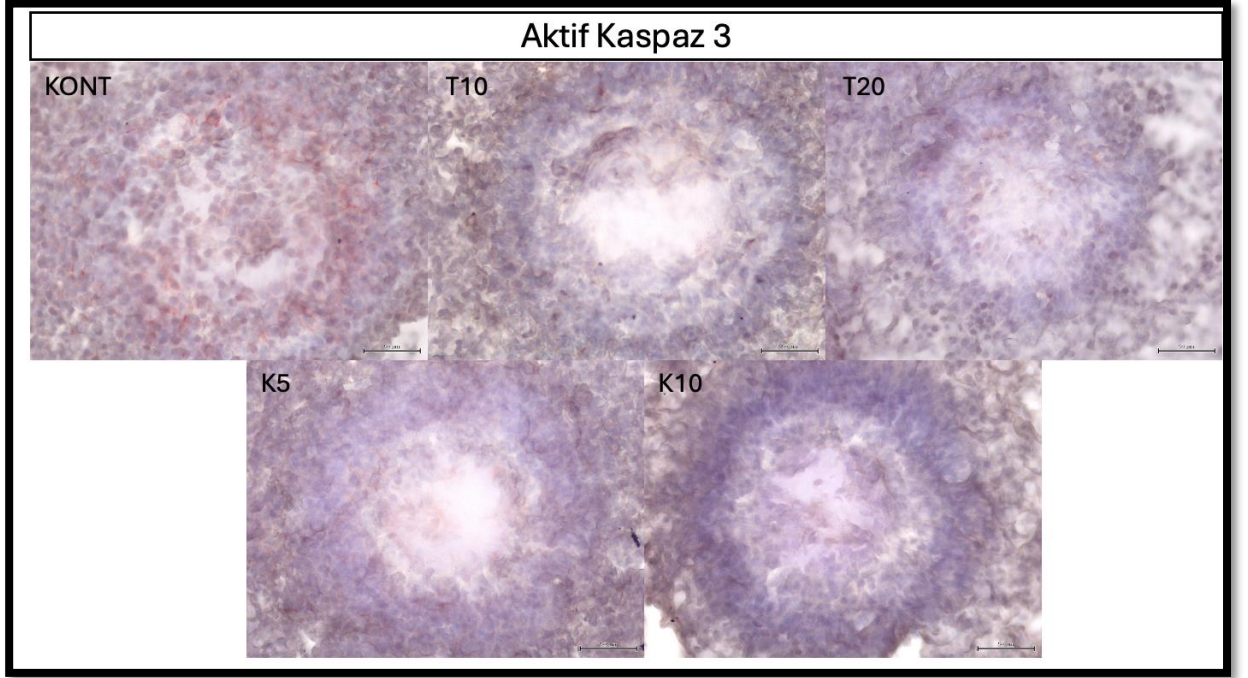


Şekil 3.13: Analiz için lizinli lama fikse edilen kumulus-oosit kompleksi

3.10.2.1. Streptavidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (StrepABC) Yöntemi:

Pozitif şarjlı lamlarda fikse edilen oosit-kumulus kompleksleri yükselen alkol serilerinden geçirildikten sonra saf su ile yıkanmıştır. Ardından 9 dakika (3x3 dakika) boyunca PBS’de bekletilmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için %3’lük hidrojen peroksit (H_2O_2) (Metanolde hazırlanmış)’de 15 dakika süre ile karanlık ve nemli ortamda, oda sıcaklığında tutulduktan sonra tekrar tween 20’li PBS’e alınmıştır. Ardından 10 dakika boyunca oosit-kumulus komplekslerine bloklayıcı seruma (Thermo Scientific, TA-125-UB; Deutsch, Germany) maruz bırakılmıştır. Oosit-kumulus komplekslerine antikor uygulama protokolüne uygun olarak aktif kaspaz-3 (1:500 dilüsyonla, + 4°C bir gece) ve konneksin 43 (1:500 dilüsyonla, + 4°C bir gece), antikor sulandırıcı (Thermo Scientific, TA-125-UD) ile sulandırılarak inkübe edilmiştir. Antikor uygulamasının ardından, oda sıcaklığında tween 20’li PBS’de 10 dk yıkandıktan sonra, keçiden elde edilmiş biyotinlenmiş anti-tavşan sekonder antikor (Thermo Scientific, TP-125-BN) ile 30 dk boyunca inkübe edilmişlerdir. Lamlar, tween 20’li PBS’de 10 dakika yıkandıktan sonra, peroksidaz ile işaretli streptavidin (Thermo Scientific, TS-125-HR)’de oda sıcaklığında 30 dk tutulmuştur. Mikroskopta reaksiyonun izlenmesi temel alınarak, renkli reaksiyon ürününün oluşması için oosit-kumulus kompleksleri, karanlık ortamda yaklaşık 20 dk süreyle 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Thermo Scientific, TA-004-HAC) ile inkübe edilmiş ve ardından distile su ile yıkanarak reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Yıkanan lamlar, Mayer’s hematoksilen (Thermo Scientific, TA-125-MH) ile zıt

boyama aşaması için 1 dk boyunca boyanmıştır. Lamlar, 5 dakika boyunca musluk suyuyla yıkandıktan sonra su bazlı kapatıcı (Thermo Scientific, TA-060-UG) ile kapatılmıştır. Negatif kontrol kesitlerine, primer antikor yerine antikor sulandırıcı uygulaması yapılmıştır (Gurel ve diğ., 2007; İkitimur-Armutak ve diğ., 2016). Örneklerin incelemesinde mikroskop olarak Olympus BX53F Tokyo-Japon kullanılmış ve fotoğraflar Olympus DP21 kamera görüntüleme sistemi ile çekilmiştir (Şekil 3.14, Şekil 3.15).



Şekil 3.14: Tüm gruplara ait olgunlaşmış oosit-kumulus komplekslerinde hücre sitoplazmalarının aktif kaspaz-3 reaksiyonu

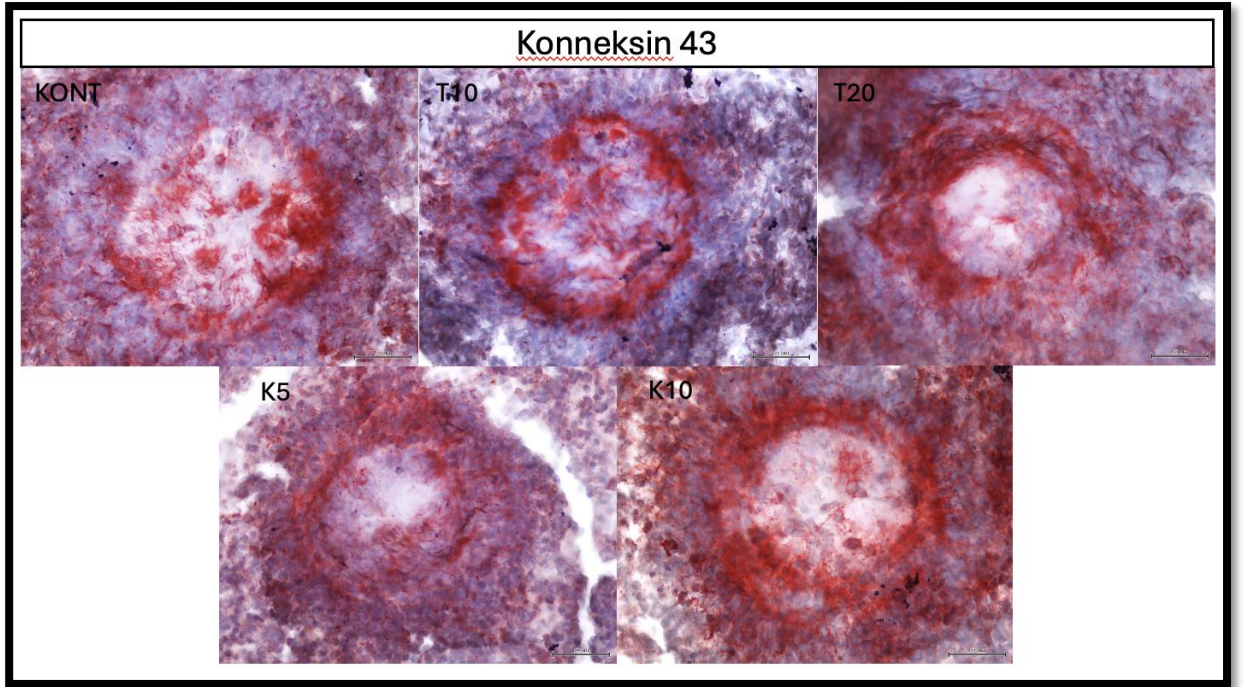
Zıt boyama Mayer's Hematoksilen. Bar: 50 µm

3.10.2.2. H-Skor ve Apoptotik İndeksin Hesaplanması

Tüm değerlendirmeler bağımsız olarak iki kör gözlemci kullanılarak yapılmıştır. Yapılan immünohistokimyasal boyama sonrasında oosit-kumulus komplekslerindeki reaksiyonlar, 40x büyütmede ve 8-10 farklı sahada rastgele seçilerek değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal olarak Konneksin 43 reaksiyonunu analiz etmek için, oosit-kumulus komplekslerine immün pozitif hücreler histolojik skor (H-Skor) kullanılarak değerlendirilmiştir (Senturk ve diğ., 1999; Taşkın ve diğ., 2008). Boyanma yoğunluğuna bağlı olarak, pozitif reaksiyon gösteren hücreler sayılmış ve derecelendirilmiştir: 0, negatif; 1, hafif; 2, orta; 3,

yoğun olarak kabul edilmiştir. Her bir örnekte, H-Skor = $\sum_{i=1}^n P_i (i+1)$ formülüyle H-Skor değeri hesaplanmıştır. Formülde, “ P_i ” ise boyanma gösteren hücrelere ait yüzde değeri iken “ i ” yoğunluk skoru (derecesi) olarak kabul edilmiştir.

Aktif kaspaz-3 analizinde ise, gruplar bağımsız olarak iki kör gözlemci kullanılarak, 40x büyütmede, 8-10 farklı sahada, ortalama 800-1000 hücre içinden rastgele seçilip sayım yapılarak % indeksi belirlenmiştir. % İndeks hesabı için formül olarak; $100 \times (\text{pozitif hücre nükleus sayısı} / \text{toplam hücre nükleus sayısı})$ kullanılmıştır (Taşkın ve diğ., 2009; Esener ve diğ., 2018).



Şekil 3.15: Tüm gruplara ait olgunlaşmış oosit-kumulus komplekslerinde hücre sitoplazmalarının konneksin 43 reaksiyonu görüntüleri

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İn vitro embriyo üretimi, dondurulması ve eritilmesi ile elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinde SPSS Statistics 29 (IBM Corp. Armonk, NY, ABD) ve GraphPad Prism (GraphPad Prism Sürüm 6 Yazılım Programı, San Diego, CA) yazılımları kullanılmıştır. Verilerin tanımlayıcı istatistikleri (frekans, yüzde, ortalama, standart hata) hesaplanmıştır ve normal dağılıma uygunluk Kolmogorov–Smirnov ve Shapiro–Wilk testleri ile incelenmiştir. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Pearson Ki-Kare testi ve Fisher Exact testleri kullanılmıştır. Nicel veriler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır ve ANOVA sonrasında Tukey çoklu karşılaştırmalar testi gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

Hücre içi oksidasyon analizinde 8 tekrarlı olarak yapılan deneylerden elde edilen verilerin istatistiki analizi, GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile gerçekleştirilmiş ve grafikler oluşturulmuştur.

İmmünohistokimyasal analizler sonunda elde edilen bulgular, öncelikle ortalama±standart hata (S.E.M.) olarak hesaplanmıştır. Grupların dağılımının normal dağılıma uygunluğunun analiz edilmesinin ardından, GraphPad Prism (GraphPad Prism Version 6 Software Program, San Diego, CA) Programı ile istatistiksel değerlendirme yapılmıştır. Ayrıca tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonrasında Tukey çoklu karşılaştırmalar testi ile analiz desteklenmiş, $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

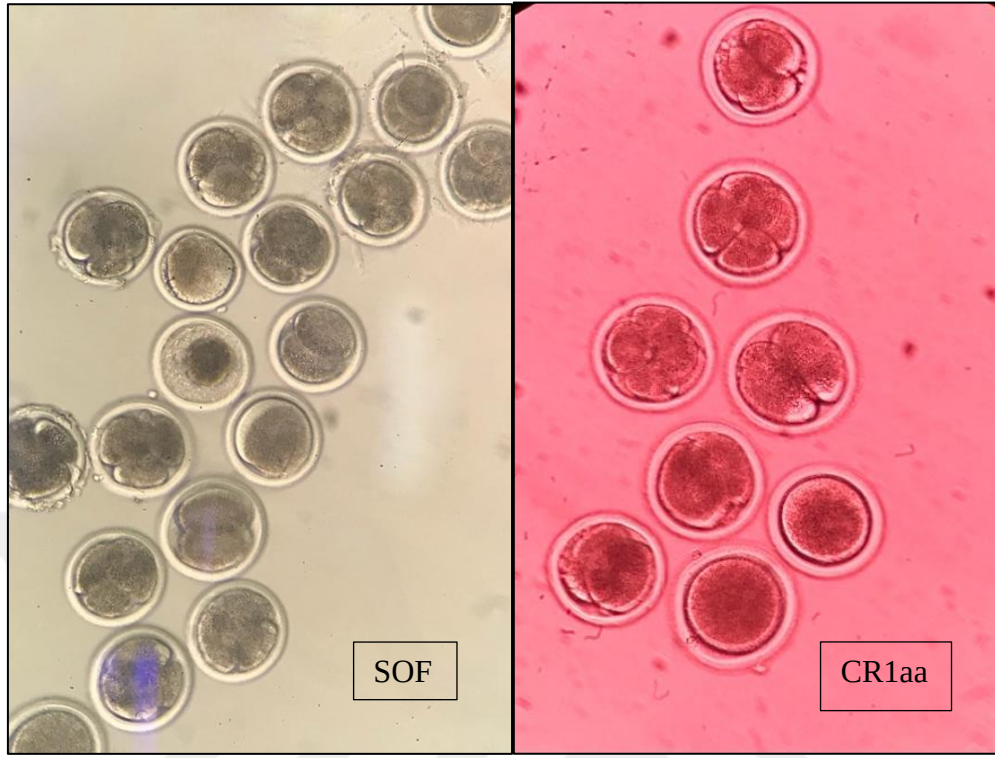
4. BULGULAR

Doktora tez çalışması boyunca mezbahada kesilen 550 inek ve düveden toplamda 1082 ovaryum kullanılmıştır. Sığır *in vitro* embriyo üretim sisteminin oturması ve analiz etmek istediğimiz kurkumin ve timokinonun dozajlarının ayarlanması için 4 hafta boyunca ön deneysel çalışmalar yapılmıştır. Ön çalışmalar sonunda 4 aşama olarak planladığımız doktora tezinin asıl çalışmalarına geçilmiş ve 1. aşama olan “SOF kültür medyumunda embriyonun geliştirilmesi ve dondurulması” için 16 hafta çalışılmış, laboratuvar koşullarında yaşanan aksilikler sebebiyle ancak 12 hafta değerlendirmeye alınmıştır. 2. aşama olan “CR1aa kültür medyumunda embriyonun geliştirilmesi ve dondurulması” için 17 hafta çalışılmış yine laboratuvar koşullarında yaşanan aksaklıklar sebebiyle ancak 14 hafta değerlendirmeye alınmıştır. 3. Aşama olan oositin olgunlaşma sonrası hücre içi oksidasyon ve immunohistokimya analizleri için 8 hafta çalışılarak istenen oosit sayısına ulaşılmıştır. Deneysel çalışmaların tüm aşamalarında istatistiki analizi yapılabilen oosit sayısı **Tablo 4.1**’de görüldüğü üzeredir.

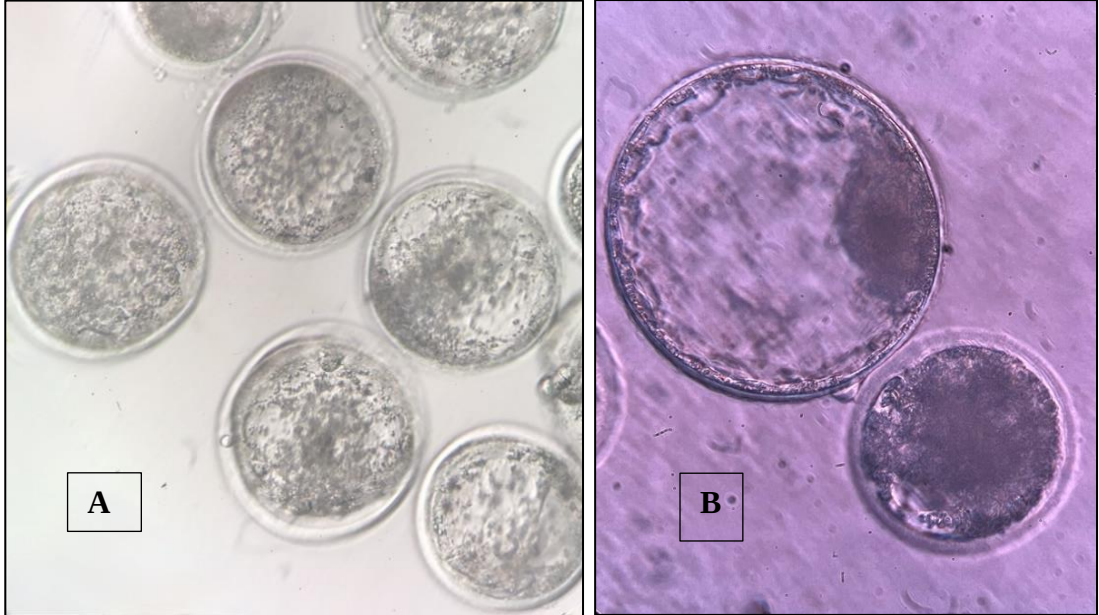
Tablo 4.1:Doktora tez çalışmasında analizlerde kullanılan oosit sayısı

Gruplar	Olgunlaştırılan Oosit Sayısı	Olgunlaşma Sonrası Kullanılabilen Oosit Sayısı*	İn vitro döllen oosit sayısı		İmmunohistokimya testler de kullanılan oosit sayısı		Hücre İçi oksidasyon analizinde kullanılan oosit sayısı
			SOF	CR1aa	Kaspaz 3	Konneksin 43	
Kont	1015	946	325	381	80	80	80
K5	995	930	313	377	80	80	80
K10	961	945	321	384	80	80	80
T10	973	945	396	309	80	80	80
T20	912	875	305	330	80	80	80
TOPLAM	4856	4641	1660	1781	400	400	400

* Olgunlaştırılan oosit ile kullanılabilen oosit sayıları arasındaki fark, yeterli olgunluğuna ulaşmadığı için kültür ile analizlere alınmayan ve işlemler sırasındaki kayıp olan oositlerden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.1: SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen 2,4 ve 8 blastomerli embriyolar



Şekil 4.2: A) SOF medyumunda geliştirilmiş erken ve expanded blastosist embriyo
B) CR1aa medyumunda geliştirilmiş blastosist ve expanded blastosist embriyolar

4.1. SOF VE CR1 MEDYUMLARINDA GELİŞTİRİLEN EMBRİYOLARA AİT BULGULAR

Tablo 4.2: SOF medyumunda kültüre edilen embriyoların bölünme, blastosist, expanded blastosist, hatching ve hatched blastosist aşamasına ulaşma yüzdeleri

Gruplar	Olgunlaşan Oosit Sayısı	Kültüre Edilen Embriyo Sayısı	Bölünme Oranı	Blastosist Oranı	Expanded Blastosist Oranı	Hatching Blastosist Oranı	Hatched Blastosist Oranı	Toplam Blastosist Embriyo Oranı
Kont	379	325	189/325 (%58,2)	14 ^a /189 (%7,4)	47/189 (%24,9)	1/189 (%0,5)	13/189 (%6,9)	75/189 (%39,7)
K5	358	313	179/313 (%57,2)	15 ^{abc} /179 (%8,4)	46/179 (%25,7)	2/179 (%1,1)	4/179 (%2,2)	67/179 (%37,4)
K10	323	321	169/321 (%52,6)	9 ^{ab} /169 (%5,3)	36/169 (%21,3)	0/169 (%0,0)	7/169 (%4,1)	52/169 (%30,8)
T10	398	396	198/396 (%50,0)	28 ^c /198 (%14,1)	37/198 (%18,7)	2/198 (%1,0)	4/198 (%2,0)	71/198 (%35,9)
T20	322	305	152/305 (%49,8)	19 ^{ac} /152 (%12,5)	25/152 (%16,4)	3/152 (%2,0)	8/152 (%5,3)	55/152 (%36,2)

*Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Tablo 4.3: CR1aa medyumunda kültüre edilen embriyoların bölünme, blastosist, expanded blastosist, hatching ve hatched blastosist aşamasına ulaşma yüzdeleri

Gruplar	Olgunlaşan Oosit Sayısı	Kültüre Edilen Embriyo Sayısı	Bölünme Oranı	Blastosist Oranı	Expanded Blastosist oranı	Hatching Blastosist Oranı	Hatched Blastosist Oranı	Toplam Blastosist Embriyo Oranı
Kont	396	381	228 ^a /381 (%59,8)	21/228 (%9,2)	44/228 (%19,3)	1/228 (%0,4)	31 ^a /228 (%13,6)	97/228 (%42,5)
K5	397	377	204 ^{abc} /377 (%54,1)	18/204 (%8,8)	40/204 (%19,6)	2/204 (%1,0)	20 ^{ab} /204 (%9,8)	80/204 (%39,2)
K10	398	384	237 ^{ad} /384 (%61,7)	21/237 (%8,9)	38/237 (%16,0)	4/237 (%1,7)	24 ^{ab} /237 (%10,1)	87/237 (%36,7)
T10	335	309	189 ^{acd} /309 (%61,2)	20/189 (%10,6)	31/189 (%16,4)	4/189 (%2,1)	17 ^{ab} /189 (%9,0)	72/189 (%38,1)
T20	350	330	166 ^b /330 (%50,3)	18/166 (%10,8)	23/166 (%13,9)	5/166 (%3,0)	10 ^b /166 (%6,0)	56/166 (%33,7)

*Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark istatistiki olarak $P < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Tablo 4.4: Kontrol grubu için SOF ve CR1aa medyumlarında embriyo gelişim oranlarının karşılaştırılması

Kültür medyumları	Olgunlaşan Oosit Sayısı	Kültüre Edilen Embriyo Sayısı	Bölünme Oranı	Blastosist Oranı	Expanded Blastosist oranı	Hatching Blastosist Oranı	Hatched Blastosist Oranı	Toplam Blastosist Embriyo Oranı
SOF	379	325	189/325 (%58,2)	14/189 (%7,4)	47/189 (%24,9)	1/189 (%0,5)	13 ^a /189 (%6,9)	75/189 (%39,7)
CR1aa	396	381	228/381 (%59,8)	21/228 (% 9,2)	44/228 (%19,3)	1/228 (%0,4)	31 ^b /228 (%13,6)	97/228 (%42,5)

*Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark istatistiki olarak $P < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Tablo 4.5: K5 grubu için SOF ve CR1aa medyumlarında embriyo gelişim oranlarının karşılaştırılması

Kültür medyumları	Olgunlaşan Oosit Sayısı	Kültüre Edilen Embriyo Sayısı	Bölünme Oranı	Blastosist Oranı	Expanded Blastosist oranı	Hatching Blastosist Oranı	Hatched Blastosist Oranı	Toplam Blastosist Embriyo Oranı
SOF	358	313	179/313 (%57,2)	15/179 (%8,4)	46/179 (%25,7)	2/179 (%1,1)	4 ^b /179 (%2,2)	67/179 (%37,4)
CR1aa	397	377	204/377 (%54,1)	18/204 (%8,8)	40/204 (%19,6)	2/204 (%1,0)	20 ^a /204 (%9,8)	80/204 (%39,2)

*Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark istatistiki olarak $P < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Tablo 4.6: K10 grubu için SOF ve CR1aa medyumlarında embriyo gelişim oranlarının karşılaştırılması

Kültür medyumları	Olgunlaşan Oosit Sayısı	Kültüre Edilen Embriyo Sayısı	Bölünme Oranı	Blastosist Oranı	Expanded Blastosist oranı	Hatching Blastosist Oranı	Hatched Blastosist Oranı	Toplam Blastosist Embriyo Oranı
SOF	323	321	169 ^b /321 (%52,6)	9/169 (%5,3)	36/169 (%21,3)	0/169 (%0,0)	7 ^b /169 (%4,1)	52/169 (%30,8)
CR1aa	398	384	237 ^a /384 (%61,7)	21/237 (%8,9)	38/237 (%16,0)	4/237 (%1,7)	24 ^a /237 (%10,1)	87/237 (%36,7)

*Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark istatistiki olarak $P < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Tablo 4.7: T10 grubu için SOF ve CR1aa medyumlarında embriyo gelişim oranlarının karşılaştırılması

Kültür medyumları	Olgunlaşan Oosit Sayısı	Kültüre Edilen Embriyo Sayısı	Bölünme Oranı	Blastosist Oranı	Expanded Blastosist oranı	Hatching Blastosist Oranı	Hatched Blastosist Oranı	Toplam Blastosist Embriyo Oranı
SOF	398	396	198 ^b /396 (%50,0)	28/198 (%14,1)	37/198 (%18,7)	2/198 (%1,0)	4 ^b /198 (%2,0)	71/198 (%35,9)
CR1aa	335	309	189 ^a /309 (%61,2)	20/189 (%10,6)	31/189 (%16,4)	4/189 (%2,1)	17 ^a /189 (%9,0)	72/189 (%38,1)

*Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark istatistiki olarak $P < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur

Tablo 4.8: T20 grubu için SOF ve CR1aa medyumlarında embriyo gelişim oranlarının karşılaştırılması

Kültür medyumları	Olgunlaşan Oosit Sayısı	Kültüre Edilen Embriyo Sayısı	Bölünme Oranı	Blastosist Oranı	Expanded Blastosist oranı	Hatching Blastosist Oranı	Hatched Blastosist Oranı	Toplam Blastosist Embriyo Oranı
SOF	322	305	152/305 (%49,8)	19/152 (%12,5)	25/152 (%16,4)	3/152 (%2,0)	8/152 (%5,3)	55/152 (%36,2)
CR1aa	350	330	166/330 (%50,3)	18/166 (%10,8)	23/166 (%13,9)	5/166 (%3,0)	10/166 (%6,0)	56/166 (%33,7)

**Şekil 4.3:** CR1aa medyumunda kültüre edilen embriyoların 7. günde erken blastosist, blastosist, expanded ve hatching blastosist aşamalarındaki görüntüsü**Şekil 4.4:** CR1aa medyumunda kültüre edilen 8. gündeki hatched blastosist embriyo

Blastosist ve expanded blastosist aşamasına 8. günde ulaşan embriyolar gruplarına dikkat edilerek vitrifikasyon yöntemiyle dondurulmuştur. Kontrol, K5, K10, T10 ve T20 grubundan SOF medyumunda geliştirilen sırasıyla 32,32,35,36 ve 28 adet olmak üzere 143 adet embriyo dondurulmuştur. CR1aa medyumunda ise sırasıyla 28,28,27,28 ve 23 adet embriyo olmak üzere toplamda 133 adet embriyo dondurulmuştur. Dondurma ve eritme esnasında embriyoların saklandığı payetlerin çatlaması sebebiyle kayıplar yaşanmış ve **Tablo 4.9** ve **Tablo 4.10**'da görülen sayıda embriyolar istatistiki değerlendirmeye alınmıştır.

Tablo 4.9: SOF medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi

Gruplar	Dondurulan embriyo sayısı	Değerlendirilen Embriyo Sayısı**	24. saat canlı embriyo sayısı	48. saat canlı embriyo sayısı
Kont	32	24	8/24 ^a (%33,3)	2/24 (%8,3)
K5	32	18	1/18 ^b (%5,6)	0/18 (%0)
K10	35	21	6/21 ^{ab} (%28,6)	1/21 (%4,8)
T10	36	21	8/21 ^a (%38,1)	2/21 (%9,5)
T20	28	18	7/18 ^a (%38,9)	0/18 (%0)

*Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark istatistiki olarak $P < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

** Dondurulan embriyo sayısı ile değerlendirilen embriyo sayısı arasındaki fark, eritme sırasında oluşan zarar görmüş zona pelisudalardan veya kayıplardan kaynaklanma

Tablo 4.10: CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi

Gruplar	Dondurulan Embriyo Sayısı	Değerlendirilen Embriyo Sayısı**	24. saat canlı embriyo sayısı	48. saat canlı embriyo sayısı
Kont	28	21	4/21 (%19,0)	0/21 (%0)
K5	28	23	7/23 (%30,4)	1/23 (%4,3)
K10	27	18	5/18 (%27,8)	1/18 (%5,6)
T10	28	19	4/19 (%21,1)	0/19 (%0)
T20	23	22	8/22 (%36,4)	1/22 (%4,5)

*Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark istatistiki olarak $P < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

** Dondurulan embriyo sayısı ile değerlendirilen embriyo sayısı arasındaki fark, eritme sırasında oluşan zarar görmüş zona pelisudalardan veya kayıplardan kaynaklanmaktadır.

Tablo 4.11: Kontrol grubu için SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi

Kontrol	Toplam Embriyo	24 saat kontrol	48. saat kontrol
SOF	24	8/24 (%33,3)	2/24 (%8,3)
CR1aa	21	4/21 (%19,0)	0/21 (%0)

Tablo 4.12: K5 grubu için SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi

K5	Toplam Embriyo	24 saat kontrol	48. saat kontrol
SOF	18	1/18 (%5,6)	0/18 (%0)
CR1aa	23	7/23 (%30,4)	1/23 (%4,3)

Tablo 4.13: K10 grubu için SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi

K10	Toplam Embriyo	24 saat kontrol	48. saat kontrol
SOF	21	6/21 (%28,6)	1/21 (%4,8)
CR1aa	18	5/18 (%27,8)	1/18 (%5,6)

Tablo 4.14: T10 grubu için SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi

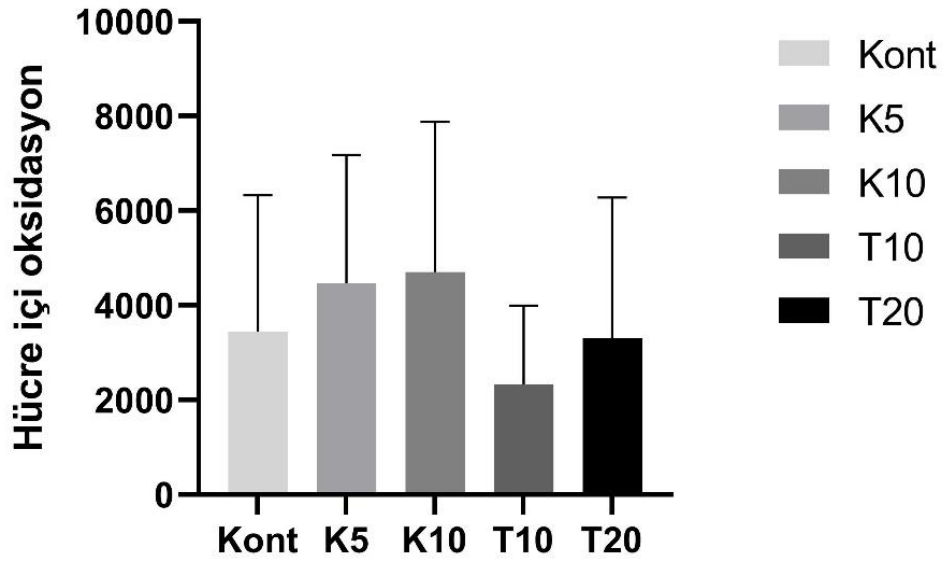
T10	Toplam Embriyo	24 saat kontrol	48. saat kontrol
SOF	21	8/21 (%38,1)	2/21 (%9,5)
CR1aa	19	4/19 (%21,1)	0/19 (%0)

Tablo 4.15: T20 grubu için SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen, dondurulan ve eritilen embriyoların değerlendirilmesi

T20	Toplam Embriyo	24 saat kontrol	48. saat kontrol
SOF	18	7/18 (%38,9)	0/18 (%0)
CR1aa	22	8/22 (%36,4)	1/22 (%4,5)

4.2. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE ELDE EDİLEN BULGULAR

Kurkumin ve timokinonun farklı dozlarda ilave edilerek ve edilmeyerek oluşturulan gruplarda *in vitro* olgunlaşma medyumunda olgunlaşmaları tamamlanan oosit ve kumulus hücreleri komplekslerinin hücre içi oksidasyon düzeylerine göre bir karşılaştırma yapıldığında **Şekil 4.5**'de verilen grafikler elde edildi. 5µM ve 10 µM kurkumin arasında bir fark gözlenmezken, 20 µM timokinon ilave edilen T20 grubu ve kontrol grubundaki hücre içi oksidasyon miktarı benzer bulundu. 10 µM timokinon ilave edilmiş medyumda geliştirilen hücrelerde ise kontrol grubunun yaklaşık yarısı kadar hücre içi oksidasyon belirlendi. Kontrol ve deney grupları arasında hücre içi oksidasyon miktarı karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık görülmedi.



Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonda kurkumin ve timokinon uygulanmış ve uygulanmamış kontrol grubu hücrelerde karşılaştırılmalı hücre içi oksidasyon miktarının tek yönlü varyans analizi

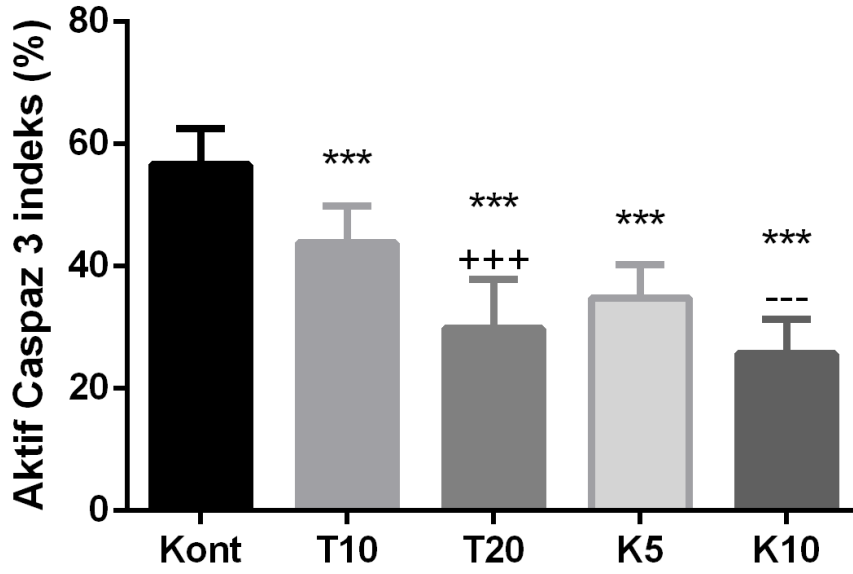
4.3. AKTİF KASPAZ 3'ÜN APOPTOTİK İNDEKS (%) DEĞERLENDİRİLMESİNDEN ELDE EDİLEN BULGULAR

Tablo 4.16: Tüm gruplara ait oosit-kumulus kompleksi örneklerinde aktif kaspaz-3 İndeks (%) sonuçlarına ait ortalama $\pm$ standart hata değerleri

	Aktif Kaspaz-3 İndeks (%)
Kont	56,65 $\pm$ 1,127
K5	38,83 $\pm$ 1,002***
K10	25,71 $\pm$ 1,09***
T10	43,86 $\pm$ 1,039***
T20	29,81 $\pm$ 1,26***

***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.

Oosit-kumulus kompleksine ait apoptozis belirteçlerinden biri olan aktif kaspaz-3'ün apoptotik indeks değerlerine bakıldığında tüm deney gruplarında apoptotik indeksin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü belirlendi ($p<0,001$) (**Tablo 4.16**, **Şekil 4.6**). Oositlere timokinon uygulanmasının kumulus hücrelerinde aktif kaspaz-3 immunreaksiyonunu doza bağlı baskıladığı belirlendi (Sırasıyla T10 ve T20 uygulamasına ait aktif kaspaz-3 değerleri; 43,86 $\pm$ 1,039, 29,81 $\pm$ 1,26 ($p<0,001$). Oositlerde kurkumin uygulamasının da kumulus hücrelerinde aktif kaspaz 3 immunreaksiyonunu doza bağlı belirgin baskıladığı belirlendi (sırasıyla K5 ve K10 uygulamasına ait aktif kaspaz-3 değerleri; 38,83 $\pm$ 1,002, 25,71 $\pm$ 1,09 ($p<0,001$). T20 ve K10 grubundaki apoptotik hücre miktarındaki azalmada benzerlik tespit edildi (sırasıyla 29,81 $\pm$ 1,26 ve 25,71 $\pm$ 1,09). Oosit çevresinde bulunan kumulus hücrelerinde kurkumin uygulamasının timokinon uygulamasına kıyasla daha etkili bir şekilde aktif kaspaz-3 indeksini yani apoptozu baskıladığı görüldü (**Tablo 4.16**, **Şekil 4.3**, **Şekil 4.6**).



***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.

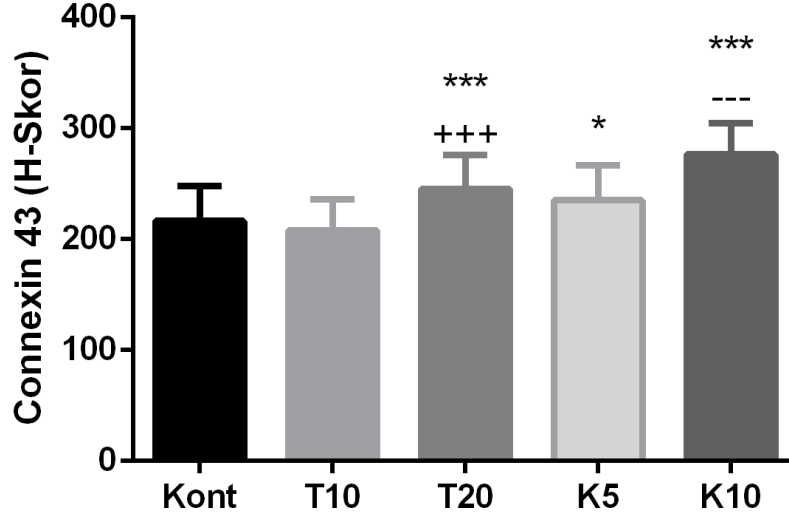
Şekil 4.6: Tüm gruplara ait oosit-kumulus kompleksi örneklerinde aktif kaspaz-3 indeks (%) değerleri.

4.4. KONNEKSİN 43'E AİT H-SKOR DEĞERLENDİRİLMESİNDE ELDE EDİLEN BULGULAR

Tablo 4.17: Tüm gruplara ait oosit-kumulus kompleksi örneklerinde konneksin 43 (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama $\pm$ standart hata değerleri

	Konneksin 43 (H-skor)
Kont	216,5 $\pm$ 5,09
K5	235,2 $\pm$ 4,54*
K10	276,5 $\pm$ 4,54***
T10	208,2 $\pm$ 4,39
T20	245,6 $\pm$ 4,84***

*P<0,05; ***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



*P<0,01; ***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri

Şekil 4.7: Tüm gruplara ait oosit-kumulus kompleksi örneklerinde Konneksin 43 (H-Skor) değerleri.

Gap junction belirteçlerinden biri olan konneksin 43'e ait oosit-kumulus kompleks yapısının immünohistokimyasal boyamalarından elde edilen H-skor değerlerine bakıldığında kontrol grubuna göre en fazla anlamlı artışın T20 ve K10 grubunda olduğu (sırasıyla; $245,6 \pm 4,84$ ve $276,5 \pm 4,54$, $p < 0,001$) görüldü (**Tablo 4.17, Şekil 4.7**). T10 uygulamasına ait konneksin 43 değerinin kontrole benzer olduğu gözlemlendi. K5 uygulamasına ait konneksin 43 değerleri incelendiğinde kontrole göre anlamlı artış bulundu ($235,2 \pm 4,54$, $P < 0,05$). (**Tablo 4.17, Şekil 4.7**).

5. TARTIŞMA

Sığırlarda *in vivo* embriyo üretimi 1930 yılında başlamış ve biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmasıyla da *in vitro* embriyo üretimine geçilerek ticari kazanç kapısı olmuştur. Geçmişten günümüze *in vitro* embriyo üretiminde çeşitli kültür medyumları TCM-199, SOF, CR1aa vb. kullanılmıştır. Daha yüksek oranda kaliteli blastosist elde etmek için FCS, BSA gibi protein kaynaklarının yanı sıra pirüvik asit, glikoz galaktoz gibi şeker türevleri ve sistin, sisteamin, L-Ergothioneine, β -merkaptotanol, tokoferol, resveratrol, melatonin, askorbik asit, E vitamini gibi antioksidan maddeler kullanılmıştır (Sandal ve Özdaş, 2015; Enginler ve diğ., 2015; Sovernigo ve diğ., 2017; Diogenes ve diğ., 2017; Dos Santos ve diğ., 2019; Sandal ve diğ., 2021; Öztürkler ve diğ., 2022b). Son yıllarda ise bilim insanları antioksidan maddelerin embriyo gelişiminde pozitif yöndeki etkilerinin tespit etmişler, farklı olarak kurkumin timokinon, mangiferin gibi hücre koruyucu özelliği olan, apoptozu engellediği düşünülen bu maddeleri fare, tavşan ve mandalarda sperma, oosit ve embriyo gelişimleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu tez projesinde özellikle sığır embriyo üretiminin en önemli aşamalarından biri olan oositlerin olgunlaşmasında, pozitif etkisi olabileceği hipotezine dayanarak, kurkumin ve timokinon TCM-199 olgunlaşma medyumuna eklenmiş ve etkileri araştırılmıştır.

Bilim camiasında *in vitro* sığır embriyo üretimi için yeni sayılabilecek kurkumin ve timokinonun, olgunlaşma medyumuna eklenmiş ve SOF ve CR1aa farklı kültür medyumlarındaki embriyonel gelişimleri değerlendirilmiştir. Bugüne kadar araştırılan literatür bilgilerine göre 5 μ M Kurkumin (K5), 10 μ M Kurkumin (K10), 10 μ M Timokinon (T10) ve 20 μ M Timokinon (T20)'nun sığır oositlerinin TCM-199 da *in vitro* olgunlaşmasına ve SOF ile CR1 medyumlarında embriyo gelişimi üzerine olan etkileri ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır.

Deneyisel çalışmalarda **Tablo 4.1**'de görüldüğü üzere 4641 adet oosit kullanılmıştır. Bu oositler kendi gruplarında olgunlaştırıldıktan sonra toplam 1660 tanesi SOF medyumundaki embriyo gelişimlerinin incelenmesi için ayrılmıştır. 5 μ M ve 10 μ M kurkumin ve 10 μ M ve 20 μ M timokinon ilave edilen ve edilmeyen TCM-199 medyumunda olgunlaştırılan, zigot olduğu farz edilen ve SOF medyumuna aktarılan embriyoların bölünme oranları (cleavage)

sırasıyla Kontrol, K5, K10, T10 ve T20 için %58,2, %57,2, %52,6, %50,0 ve %49,8 olarak kaydedilmiştir. SOF medyumunda bölünme oranlarını istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında yarıklanma açısından bir fark bulunmamıştır (**Tablo 4.2, Şekil 4.1, Şekil 4.2**). Shang ve diğ. (2013) kurkuminin 2,5, 5, 10 ve 20 μM dozda ilave edildiği manda kültür medyumunda geliştirdikleri embriyolarının bölünme oranlarında istatistiksel bir fark saptamamışlardır. Bulduğumuz bu sonuçlar Shang ve diğ.'nin çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir. Aynı araştırmacılar 5 μM kurkumin grubunda blastosiste ulaşma oranını $26,80 \pm 13,15$ ve 10 μM kurkumin grubunda ise $27,48 \pm 12,29$ olarak belirtmişler ve aralarında fark saptamazlarken, kurkuminin dozajını 20 μM a çıkardıklarında blastosist oranı oldukça düşmüş ve $9,82 \pm 7,42$ olarak bildirilmiş ve aralarında istatistiksel olarak fark tespit etmişlerdir (Shang ve diğ., 2013).

Tür farkı olsa da Chen ve Chan (2012), fare oositlerinin *in vitro* olgunlaşmasında ve blastosiste ulaşma oranında kurkuminin 5 μM , 10 μM ve 20 μM dozlarının etkilerini araştırmışlar ve 5 ile 10 μM gruplarının bölünme oranlarında herhangi bir fark saptamazlarken, 20 μM olan grubun aleyhine olmak üzere $p < 0,01$ oranında istatistiki olarak önemli bulmuşlardır. CR1aa medyumunda gelişen embriyolarımız yarıklanma oranlarını karşılaştırdığımızda, K5 (%54,1) ve K10 (%61,10) arasındaki farkın K10 lehine istatistiki olarak önemli çıkması dikkat çekmektedir (**Tablo 4.3, Şekil 4.1**). Aynı zamanda araştırmacılar blastosist hücre sayısını, kontrol grubuna göre 20 μM 'da daha düşük saptamışlar ve trofektoderm hücrelerinin etkilemediğini bildirmişlerdir (Chen ve Chan, 2012).

Kurkumin ilaveli olgunlaşma medyumunda geliştirilen oositler, döllenmeden sonra CR1aa medyumuna aktarılmış ve yarıklanma oranları Kontrol, K5 ve K10 grupları sırasıyla %59,8, %54,1 ve %61,7 olarak kaydedilmiş ve K5 ile K10 arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunurken kontrol ile aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p < 0,05$) (**Tablo 4.3, Şekil 4.1**). Kurkuminin, çinko oksit taşıyıcı nanopartiküller ile işlevselleştirilerek kullanıldığı ve CR2 kültür medyumunda sığır embriyosunun *in vitro* gelişimine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmada, her ne kadar araştırmacılar olgunlaşma medyumuna eklemeseler de bölünme oranlarını incelediklerinde fark bulamamışlardır. Bu durum bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir (**Tablo 4.3, Şekil 4.1**). Aynı araştırmacılar yaptıkları çalışmada 12 μM kurkuminin eklendiği grupta blastosist oranını oldukça düşük ($7,62 \pm 3,00$) saptamışlar ve kontrol grubunun lehine olmak üzere istatistiki olarak önemli bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında

ise CR1aa medyumunda geliştirilen embriyoların toplam blastosist oranlarını, Miglio ve diğ.'nin çalışmasına göre daha yüksek bulmakla birlikte, kontrol, K5 ve K10 grubu için sırasıyla % 42,5, %39,2 ve %36,7 olarak saptanmış ve istatistiki olarak fark bulunmamıştır (**Tablo 4.3, Şekil 4.2, Şekil 4.3**). Miglio ve diğ.'nin (2023), yaptığı çalışmadaki blastosist oranları ise kontrol, 3, 6 ve 12µM kurkumin için sırasıyla $24,4 \pm 9.41$, $22,1 \pm 6.61$, $19,7 \pm 2.49$, $7,62 \pm 3.00$ olarak belirlenmiştir (Miglio ve diğ., 2023).

Bari ve diğ.'nin (2021), polikistik ovaryum sendromu (PKOS) oluşturdukları farelerden elde ettikleri oositleri döllemişler ve *in vitro* kültür medyumlarına 6, 12, ve 24 µM kurkumin ekleyerek embriyonik gelişimlerini incelemişlerdir. Araştırmacılar bölünme oranlarında en yüksek %92,12 olan kontrol grubu lehine olmak üzere istatistiki olarak $p < 0,01$ düzeyinde önem bulurlarken, kurkumin eklenmiş diğer gruplar arasında istatistiki önem saptamamışlardır. Aynı araştırmacılar PKOS'lu grupta yarıklanma oranını %59,88 ile düşük bulmuşlar ve kurkumin ilave edilen grupların lehine olmak üzere istatistiki fark saptamışlardır ($p < 0,01$). Kurkumin ilavesinin PKOS'lu hastalarda bölünme oranlarına pozitif yönlü etkilediğini savunmuşlardır. *In vitro* embriyo kültürüne sadece 6 µM kurkumin ilavesinin polikistik over grubuna göre daha yüksek oranda blastosiste ulaştığını saptamışlar ve istatistik olarak önemli bulmuşlardır ($p < 0,01$) (Bari ve diğ., 2021).

Földešiová ve diğ. (2016) tavşan *in vitro* embriyo kültür medyumuna 0,1µg/ ml, 0,01µg/ ml ve 0,001µg/ ml kurkumin ilave ederek etkinliğini araştırdıkları bir çalışmada, en iyi bölünme oranını 0,001µg/ml kurkumin ekledikleri en düşük dozlu grupta %82,1 olarak bulmuşlar ve en düşük bölünme oranını en yüksek dozaj olan 0,1 µg/ml kurkumin ekledikleri grupta saptamışlardır ($p < 0,01$). Aynı araştırmacılar yüksek dozda kurkumin kullanımında hiç blastosist elde edemediklerini ve embriyoların morula aşamasında kaldıklarını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar Chen ve diğ.'nin (2010) yüksek dozdaki kurkuminin apoptozis insidansını indüklediği tezini desteklemektedir (Chen ve diğ., 2010; Földešiová ve diğ., 2016).

Kurkumin ve timokinonun *in vitro* olgunlaşma medyumuna ilavesinin sığır embriyo gelişiminde etkinliğini araştırdığımız bu tez çalışmasında, SOF medyumunda en iyi bölünme oranı %58,2 ile kontrol grubu iken, en düşük bölünme oranına %49,8 ile T20 grubunda bulunmuş ancak istatistiki bir fark gözlemlenmemiştir (**Tablo 4.2**). Blastosist oranını, 10 µM timokinon ilave edilen T10 grubu %14,1 ile en yüksek orana sahipken, 10 µM kurkumin ilave

edilen K10 grubu %5,3 ile en düşük blastosist oranına sahip olarak kaydedilmiş ve aleyhine olmak üzere $p < 0,05$ düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur (**Tablo 4.2, Şekil 4.2**). Bulduğumuz bu sonuçlar, türü ve medyumları farklı olsa dahi timokinonun 10 μ M ilave edildiği grupta blastosiste ulaşma oranında pozitif etki gösterdiği, Eini ve diğ.'nin yaptığı çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir (Eini ve diğ., 2019). SOF ve CR1aa medyumunda geliştirilen embriyolarda, kendi gruplar arasında expanded blastosist, hatching ve hatched blastosist oranlarında istatistiksel bir fark gözlemlenmemiştir (**Tablo 4.2 ve Tablo 4.3**).

CR1aa medyumundaki bölünme oranlarına bakıldığında, *in vitro* olgunlaşma medyumuna 20 μ M timokinonun ilave edildiği grup, %50,3 ile en düşük bulunmuş, kontrol, K10 ve T10 grubuna göre $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel fark saptanmıştır (**Tablo 4.3**). CR1aa için en iyi bölünme oranları ise 10 μ M timokinon ve 10 μ M kurkumin ilave edilen K10 ve T10 gruplarında sırasıyla %61,7 ve %61,2 olarak kaydedilmiştir. Bu durum yüksek doz timokinon kullanımının farklı çevresel koşullarda ya da medyumda oositin olgunlaşmasında inhibitör etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Çalışmada SOF ve CR1 gruplarında tüm gruplara ait hatched blastosiste kadar olan toplam embriyo ulaşma oranları incelendiğinde, gruplar ve medyumlar arasında herhangi bir istatistiksel fark gözlemlenmemiştir. Bu antioksidan maddelerin sadece maturasyon medyumuna eklenmesinin, kültür medyumundaki etkilerinin zamanla azalabileceğini ve sonuç olarak hatched blastosiste kadar olan toplam embriyo gelişiminde fark oluşturmayacağını düşündürmektedir.

Her ne kadar timokinon ve kurkumin *in vitro* sığır embriyo üretiminde araştırılmamış olsa da **Tablo 4.2 ve Tablo 4.3**'e bakıldığında SOF ve CR1aa medyumunda 8. gündeki toplam blastosist embriyolardan elde edilen sonuçlar (%30,8-42,5) diğer araştırmacıların bildirdiği sonuçlara (%20-25) nazaran yüksektir (Cheuqueman ve diğ., 2015; Sprícigo ve diğ., 2017; Cajas ve diğ., 2020; Ferre ve diğ., 2020a). Sonuçlar yüzdesel olarak yüksek çıksa da gruplar arası fark olmaması, %20 oksijen basıncı altında pozitif etkilerinin daha rahat açığa çıktığı düşüncesiyle farklı antioksidanlarla olgunlaştırılan oositlerin embriyo gelişiminde beklenen etkiyi göstermediğini düşündürmektedir.

Kurkumin 5 ve 10 μ M ile timokinon 10 ve 20 μ M içeren ve kontrol gruplarının SOF ve CR1aa kültür medyumunda embriyo gelişimleri grup içi karşılaştırıldığında, kontrol grubunda bölünme ve hatching blastosiste kadar olan gelişimlerinde herhangi bir istatistiksel fark saptanmamıştır. Hatched blastosiste ulaşma oranları CR1aa %13,6 ve SOF'ta ise 6,9 olarak kaydedilmiş ve CR1a medyumunun lehine olmak üzere $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur

(**Tablo 4.4**). Kurkumin 5 μ M grubunda ise yine hatching blastosiste ulaşma oranında fark bulunmaz iken, hatched blastosist SOF'ta %2,2 ve CR1aa medyumunda %9,8 bulunmuştur (**Tablo 4.5**). Kurkuminin ve timokinonun 10 μ M kullanıldığı gruplarda ise bölünme oranları, sırasıyla SOF medyumunda %52,6 ve CR1aa'da %61,7, timokinonda SOF'da %50 ve CR1aa'da %61,2 olarak bulunmuştur. Hatched blastosist oranları incelendiğinde yine sırasıyla K10 için SOF %4,1 ve CR1 da %10,1, T10 grubunda SOF %2,0, CR1aa da %9,0 olarak bulunmuştur. K10 ve T10 içerisindeki bu sonuçlar karşılaştırıldığında CR1 medyumunun lehine olmak üzere embriyonun bölünme ve hatched blastosiste ulaşma oranında $p < 0,05$ düzeyinde önemli istatistiki fark gözlemlenmiştir (**Tablo 4.6, Tablo 4.7, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4**). Bu sonuçlar bize K10 ve T10 için CR1aa medyumunda oositlerin gelişim kapasitelerinin bulundukları ortamda SOF medyumuna göre daha pozitif yönlü olduğunu düşündürürken, medyum türünün, antioksidan miktarlarının blastosiste ulaşma oranlarında önemli olduğunu göstermektedir (Van Soom ve diğ., 2002; Nedambale ve diğ., 2006; Sandal, 2012). Bu durum özellikle uzun süreli *in vitro* kültürde embriyoların enerji ve mineral madde içeriği oldukça çeşitli olan farklı medyumlarda, gelişim süreçlerinin değişik dönemlerinde kendilerine uygun atmosferi, gerekli besin maddelerini ve ihtiyaç duydukları internal ve eksternal antioksidanları kullanarak hatched blastosist aşamasına kadar ulaştıklarını düşündürmektedir (Lane ve Gardner, 2007; Goovaerts ve diğ., 2009; Özdaş ve diğ., 2012; Sandal, 2012). Bazı araştırmacılar zigot bölünmesinin erken aşamalarında embriyonun birincil antioksidan kapasitesinin maternal kalıtsal mRNA'nın oositte depolanmasına bağlı olduğuna ve fetal genin üretilen oksidanlarla etkileşime girebilmesinin, embriyonik genom aktivitesi aşamasında gerçekleştiğine inanmaktadır. Sonuç olarak embriyonik genom aktivasyonunun öncesinde ve sonrasında embriyonun ihtiyaç duyduğu eksternal antioksidanlar değişiklik gösterebilir (Bari ve diğ., 2021).

Timokinonun 20 μ M ilave edildiği T20 grubunda ise bölünme, hatched blastosiste ulaşma oranlarında SOF ve CR1aa medyumlarında herhangi bir istatistiki fark saptanmamıştır (**Tablo 4.8, Şekil 4.4**). Bu sonuçlar bize sığır oositlerinin olgunlaştırılmasında 20 μ M konsantrasyonda timokinonun medyum fark etmeksizin, maturasyondaki gelişim kapasitesini toksik etkiye bağlı olarak aynı oranda etkilediğini ve bu etkinin uzun süreli kültür sonuna kadar embriyonun erken dönem gelişim kapasitesini inhibe ettiği hipotezini düşündürmektedir.

Araştırmacılar yüksek konsantrasyondaki kurkuminin, metilglioksalı inhibe ederek ROT'u azaltabileceğini bildirilmişlerdir. Fakat farklı laboratuvarlarda deneysel çalışmalarda *in vitro* olarak kurkumin yüksek dozda embriyonik kültür medyumuna eklendiğinde, erken

embriyonik hücrelerde ve blastosist aşamasında zarar oluşturabildiği rapor edilmiştir. ROT ile birlikte yüksek kurkumin dozajı blastosist hücrelerine yıkıcı etkide bulunabilir. Aynı zamanda mitokondriyal sinyallere müdahale eder ve böylece fötal büyümeyi bozabilir. Birçok çalışma göstermiştir ki artan ROT oosit ve spermatozoonun hücre içi nükleik asit, protein ve lipidlerin peroksidasyonuna neden olur ve böylece fertilizasyon ve embriyonik gelişim azalır (Wagner ve diğ., 2018; Alahmar, 2019). Bari ve diğ. (2021) de ancak belirli dozlarda kurkumin kullanımının embriyonik gelişimde pozitif etkili olabileceğini söylemiştir (Bari ve diğ., 2021).

Hsuuw ve diğ. (2005), reaktif dikarbonil yapısında ve glikolizisin metabolik bir ürünü olan metilglioksal (MG), diyabetik hastaların kanında yüksek düzeyde bulunduğunu bildirmişlerdir. MG'nin varlığı, GSH'ı yıkımlayarak ciddi toksik etkilere sebep olur. MG'ye maruz kalmak hücrelerde oksidatif stresi provoke eder ve ROT ciddi apoptatik indükleyicidir. Hsuuw ve diğ., yaptıkları bir çalışmada kurkuminin ROT gibi hareket ederek apoptatik biyokimyasal değişikliği indükleyen MG'ye inhibitör etki göstererek hücrenin korunmasını sağladığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar yaptıkları çalışmada fare embriyonik kök hücrelerinde ve blastosiste MG sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda MG, oksidatif stres süresince sebep olduğu hücre yaralanmalarını mitokondriyal süreç ve kaspazlar aracılığıyla indüklediği bildirilmektedir (Hsuuw ve diğ., 2005). Yaptığımız çalışmada hücre içi oksidasyon testinde gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemli çıkmasa da kaspaz 3 analizi ile kurkuminin antiapoptatik etkilerinin kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli bulunması, oksidatif stresin kaspazlar aracılığıyla sebep olduğu hücre yaralanmalarında koruyucu etkisi olduğu düşüncesini destekler niteliktedir (**Tablo 4.16, Şekil 4.5, Şekil 4.6**).

Kurkuminin enzim aktivitesi ve gen ekspresyonu etkileri üzerine detaylı çalışmalar olmasına rağmen embriyo toksik etkileri üzerine birkaç rapordan bahsedilmiştir. Farelerde kurkuminin yüksek dozajının blastosist oranına negatif etkisi olduğu savunulurken Saini ve diğ.'nin bildirdiğine göre 12 μ M kurkumin konsantrasyonunda geliştirilen domuz embriyolarının *in vitro* olgunlaşma ve dölleme oranları üzerine önemli ölçüde olumlu etkileri olduğunu saptamışlardır (Saini ve diğ., 2024).

Hidrofobik polifenolik bir kimyasal olan kurkuminin, ısı stresinin oluşturduğu negatif etkileri iyileştirebileceği ve erken embriyonik gelişimi olumlu yönde etkileyebileceğini savunan Saini ve diğ., kültür ortamında kurkumin takviyesinin erken embriyonik gelişimde önemli bir rol oynadığını, bu antioksidanın, hem normal kültür koşullarında hem de ısı stresinin

ROT seviyelerinde önemli bir artışa neden olduğu durumlarda oluşan ROT'un etkinliğini azaltarak embriyoyu koruduğunu bildirmişlerdir. Buna karşılık Saifi ve diğ. daha yüksek dozlarda mitokondriyal sinyalizasyon ile etkileşimler yoluyla embriyonik gelişim üzerinde zararlı etkiler gösterdiğini bildirilmişlerdir (Saifi ve diğ., 2022; Saini ve diğ., 2024).

Ghanem ve diğ.'nin (2020), manda granüloza hücrelerinin kurkumin ilaveli medyumda *in vitro* kültüre edildiği çalışmada, kurkumin 24 saat süre boyunca farklı antioksidan enzimlerinin aktivitesine destek olarak ROT'un negatif etkileri ile mücadele edebiliyorken, 48 saat sonunda artan ROT seviyesinde, kurkumin etkinliğini sürdüremediğinden, hücreler canlılığını kısmen yitirmiş, dolayısıyla yüksek konsantrasyon veya uzun süreli kurkumin kullanımının zararlı etkilerinin olduğu sonucuna varmasına sebep olmuştur (Ghanem ve diğ. 2020).

Ghanem ve diğ.'nin (2020), kurkumin takviyesinin *in vitro* kültür koşullarında manda granüloza hücrelerinin canlılığı ve antioksidan kapasitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, granüloza hücreleri TCM-199 medyumunda 1, 2,5, 5 ve 10 μM dozlarda kurkumin ilave edilerek 24 ve 48 saat süre ile inkübatörde kültüre edilmiş, canlılığının kontrol grubuna (%93.60) kıyasla 1, 2.5, 5 ve 10 μM kurkumin ile tedavi edilen gruplarda (sırasıyla %86.0, %86.26, %83.0 ve %74.0) önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. 10 μM kurkumin ile kültüre edilen grupta, kontrol ve diğer deney gruplarına kıyasla ROT seviyesinde önemli bir artış olduğu, hücre içi oksidasyonla mücadelede önemli rol oynayan Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH) ve 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) enzimlerinin aktivitesinin 5 μM kurkumin ilave edilen grupta arttığı, fakat 48 saat sonunda önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Bu durum da araştırmacıların, *in vitro* kültür granüloza hücrelerine 24 saat boyunca, ancak 2,5 μM gibi düşük konsantrasyonda kurkumin ilavesinin hücre içi metabolik aktiviteyi ve antioksidan koruyucu sistemi iyileştirirken, bu etkiyi 48 saat boyunca sürdüremediğinden, yüksek konsantrasyon veya uzun süreli kurkumin kullanımının zararlı etkilerinin olduğu sonucuna varmasına sebep olmuştur. Yaptığımız çalışmada hücre içi oksidasyon testinin istatistiki olarak önemli çıkmasa da kurkumin ilaveli grupların kontrole göre ve K5 grubuna oranla K10 grubunda daha yüksek çıkması ve mevcut çalışmada 5 μM ilave edilen grupta artan ROT seviyesi dolayısıyla canlılığın azalmasına uyumlu olmakla beraber yüksek konsantrasyonun riskli olabileceği düşüncesini desteklemektedir (Ghanem ve diğ., 2020) (Şekil 4.5).

Son çalışmalarda, ışık ve kültür medyumunun içeriği gibi çevresel faktörlerin sitoplazma içerisindeki metabolik değişiklikleri indüklediği bunun sonucunda da mitokondrinin disfonksiyonunu ve lipid peroksidasyonunun artması, DNA fragmentasyonuna, apoptoza ve kültüre edilen oositlerin embriyo gelişiminin durdurulmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Agarwal ve diğ., 2006). Bu sebeple oksidatif stres kültür medyumlarında azaltılmalı ve düzenlenmelidir. Kültür medyumları, uygun antioksidanlar ile güçlendirildiğinde oositlerin olgunlaşma oranı artmaktadır (Wang ve diğ., 2014). Antioksidan ve antiapoptatik aktiviteye sahip olan timokinon *in vitro* ve *in vivo* koşullarda oksidatif stresin başladığı anlarda serbest radikalleri süpürücü mekanizmasıyla etkinliğini göstermektedir. Aynı zamanda timokinon SOD, Katalaz, Glutasyon S-transferaz gibi farklı endojen antioksidanların oksidatif strese karşı etkinliğini güçlendirir. Bu nedenle timokinon, *in vitro* olgunlaşma sırasında oksidatif hasarlara ve organ işlev bozukluklarına neden olan çeşitli yetersiz gelişim koşullarının olumsuz etkilerini modüle edebildiği bildirilmiştir (Amin ve Hosseinzadeh, 2016; Arif ve diğ., 2016; Goyal ve diğ., 2017). Yaptığımız çalışmada bahsi geçen beklentiler ise *in vitro* maturasyon medyumuna ilave ettiğimiz antioksidanlarda total hücre içi oksidasyon testinde gruplar arasında fark çıkmaması, kullanılan antioksidanların kültür medyumlarına ilavesi ve SOD, CAT ve GSH gibi endojen antioksidanların tayini ile daha ayrıntılı sonuçlar alınabileceğini düşündürmüştür (Şekil 4.5).

Eini ve diğ. (2019), farelerde polikistik over sendromu oluşturmuşlar ve kurkumin yerine timokinonun 1, 10 ve 100 μM timokinonu oositlerin olgunlaşma medyumunda kullanmışlardır. Oositlerin ekspansiyonlarına ve metafaz II safhasına ulaşmasını incelediklerinde, en iyi metafaz II'ye ulaşma oranını 10 μM timokinon ilave edilen grubun lehine olmak üzere $p < 0,01$ düzeyinde istatistiki olarak anlamlı bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar *in vitro* kültür sonucu fertilizasyon, bölünme ve blastosist oranını en yüksek $p < 0,01$ düzeyinde 10 μM timokinon kullandıkları grupta bulmuşlardır. İlginçtir ki 1 μM ile 100 μM arasında blastosiste ulaşma oranlarında istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir. GSH ve ROT analizlerinde çıkan sonuçlar ise yine 10 μM timokinon ilave edilen grubun oksidatif stresle mücadelede en etkin grup olduğunu göstermektedir (Eini ve diğ., 2019).

Oositlerin *in vitro* olgunlaşma kültüründe, ROT seviyesinin artması gibi olumsuz değişimler mitokondriyel fonksiyonu etkileyebilirler ve sonuç olarak düşük gelişim kapasitesine sebep olabilirler. Bu nedenle çalışmalarda oosit ve embriyo kalitesini

geliştirilmesinin en iyi yolunun, temel biyomarkerlarından biri olan sitoplazmik maturasyonunu arttırmak olduğunu tavsiye edilir (Park ve diğ., 2014; Eini ve diğ., 2019).

Eini ve diğ.'nin timokinonun oositin nükleer olgunlaşması üzerine üç kritik maternal mRNA transkripti olan Cdk1, Cyclin B ve Mapk seviyesinin analizlerine baktıklarında, kültür ortamının 10 μ M timokinon ile muamelesinin Cyclin B ekspresyonunu değiştirmediğini, ancak Mapk ve Cdk1 genlerinin transkripsiyon seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını ve bunun da oositlerde polar cisim ekstrüzyonunun artmasına neden olduğunu göstermişlerdir (Eini ve diğ., 2019). Artmış intrasitoplazmik oksidatif stres ve ROT üretiminin MPF ve Mapk aktivitelerini inhibe ettiği, bunun da PCOS hastalarında oosit kalitesi ve olgunluğunda azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (Patel ve Carr, 2008). Cdk1 ve Mapk birikimi oositin GV yıkımlanmasının başlatılmasında gereklidir. Aynı çalışmada, yüksek konsantrasyonda (100 μ M), timokinonun GSH tükenmesine neden olduğu ve 10 μ M timokinonun ile karşılaştırıldığında Bax/Bcl2 oranında bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu orandaki artışın dış mitokondriyal membranda Bax'ın oligomerizasyonunu teşvik ederek mitokondri permeabilizasyonu ve sitokrom C salınımına yol açtığı da gösterilmiştir (Zhao ve diğ., 2003). Bu bağlamda, giderek artan miktarda kanıt, yüksek dozda timokinonun olumsuz etkilerinin oositte proapoptotik yolu mekanik olarak aktive edebileceği hipotezini desteklemektedir. Bu nedenle, timokinon 10 μ M konsantrasyonda potansiyel olarak ek faydalar sağlayabilir, ancak yüksek dozlar toksisiteye neden olabilir (**Tablo 4.16, Şekil 4.6**).

Timokinonun ROT aktivitesi halen tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak bazı yazarlar hücre sinyalizasyonunda ve homeostazda önemli rolleri olduğunu bildirmiştir (Devasagayam ve diğ., 2004; Barakat ve diğ., 2015). Bu tez çalışmasında 22-24 saat süre ile *in vitro* olgunlaştırılan oositlerin hücre içi oksidasyon seviyeleri analiz edilmiştir. Analiz sonucunda gruplar arasında istatistiki bir fark saptanmamasına rağmen yüzdesel olarak en iyi sonucun 10 μ M timokinon içeren T10 grubuna ait olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 4.5**). Bu sonuçlar Eini ve diğ.'nin (2019) fare embriyosu üzerine yaptığı çalışmasında 10 μ M timokinonun ROT aktivitesinin en düşük olduğu sonucuyla paralellik göstermektedir (Eini ve diğ., 2019).

Hücre içi oksidasyon analizimizde istatistiki önemi olmasa da T10 grubunda tespit edilen miktarının kontrole oranla neredeyse yarı yarıya düşük çıkması, oositin gelişim döneminde oksidan ve antioksidan dengesizliğini diğer gruplara (Kont, K5, K10 ve T20) göre minimize edebileceğini düşündürmektedir. Kurkuminin 5 ve 10 μ M kullanıldığı gruplarda oositin olgunlaşmasında timokinon gruplarına göre daha az antioksidatif etkiye sahip olduğunu

ve ROT'un yükselmesini daha az oranda engellediğini ya da arttırdığı düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Kamarzaman ve diğ., 2014) (**Şekil 4.5**). Ghanem ve diğ. (2020) manda granüloza hücrelerinde yaptıkları çalışmada 5 μ M kurkumin kullandıklarında ROT seviyesini istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olarak saptamışlardır. Yine aynı araştırmacılar 2,5 ve 5 μ M kurkumin içeren gruplarda mitokondriyel aktiviteyi yüksek düzeyde saptamışlardır. Bu veriler bizim sonuçlarımızı desteklemektedir (**Şekil 4.5**) (Ghanem ve diğ., 2020).

Chen ve diğ. (2010), fare embriyolarında yapmış oldukları çalışmada, kurkuminin direkt olarak hücre içi oksidatif stresi uyandırdığını, bunun da fare blastosist hücrelerinde ROT kaynaklı apoptozise neden olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca araştırmacılar bu etkilerin mitokondriye bağımlı apoptotik yollarla ilgili olduğunu, bunun da kurkuminin intraselüler düzeyde Bax ve Bcl2 gibi hücre içi oksidatif parametreleri indüklediği ve mitokondriyel membran potansiyelin kaybına sebep olduğunu bildirmişlerdir (Chen ve diğ., 2010).

Uygun olmayan kültür koşulları şüphesiz ki embriyonik apoptozise katkıda bulunur. Fakat oosit ve embriyonun maternal kalitesi önemli bir faktördür. Erken embriyogenezde, bölünmede maternal RNA da protein sentezlenmesinde ve oositlerin gelişim aşamasında depolanmasında oositin kontrol mekanizması önemlidir (Fair, 1995; Vandaele ve diğ., 2007). Vandaele ve diğ. (2007), apoptozun kaspaz kaskadında önemli bir rol oynayan kaspaz-3 ve -7'nin maternal transkriptlerinin de sırasıyla sığır oositlerinin %40 ve %30'unda ifade edildiğini gösterirken, taze oositlerde aktif kaspazların varlığını gösteremediklerini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında 10 μ M kurkumin ve 20 μ M timokinon ilave edilen gruplarda aktif kaspaz-3 seviyesinin en düşük seviyelerde tespit edilmesi, kurkuminin ve timokinonun hücre içi antiapoptotik etki gösterdiğini düşündürmektedir (**Tablo 4.16, Şekil 4.6**). Chen ve diğ., 24 μ M kurkumin ile kültüre ettikleri fare embriyolarında kaspaz-3 seviyesini inhibitör etki gösterdiğini ve kullanılan antioksidan maddelerden kurkuminin hem baskılayıcı hem de indükleyici etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu da kullanılan antioksidanın farklı şartlarda farklı dozlarda kullanımının önemini desteklemektedir (Chen ve diğ., 2010). Bu tez çalışmasında oosit-kumulus kompleksine ait apoptozis belirteçlerinden biri olan aktif kaspaz-3'ün apoptotik indeks değerlerine bakıldığında, tüm deney gruplarında apoptotik indeksin kontrol grubuna göre anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Timokinonun kumulus hücrelerinde aktif kaspaz-3 immünreaksiyonunu doza bağlı baskıladığı belirlenmiştir. T10 ve T20 uygulamasına ait aktif kaspaz-3 değerleri sırasıyla; $43,86\pm1,039$ ve $29,81\pm0,26$ 'dır ($p<0,001$). Kurkumin de timokinon gibi oositlerin kumulus hücrelerinde aktif kaspaz-3

immunreaksiyonunu doza bağılı belirgin olarak baskıladığı tespit edilmiştir. K5 ve K10 uygulamasına ait aktif kaspaz-3 değerleri sırasıyla; $38,83 \pm 1,002$ ve $25,71 \pm 1,09$ 'dur ($p < 0,001$). T20 grubu T10 a göre ve K10 grubu K5'e göre daha yüksek oranda antiapoptatik etki gösterdiği saptanmış ve istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,001$). Bu durum timokinon ve kurkuminin yüksek dozlarının antiapoptatik olarak daha iyi sonuç verdiğini gösterse de T20 ve K10 grubundaki apoptotik hücre miktarındaki azalmada yüzdesel olarak benzerlik saptanmıştır ($29,81 \pm 1,26$ ve $25,71 \pm 1,09$). Oosit çevresinde bulunan kumulus hücrelerinde kurkuminin timokinona kıyasla daha etkili bir şekilde aktif kaspaz-3 indeksini yani apoptozu baskıladığı görülmüştür. (**Tablo 4.16, Şekil 4.6**).

Foliküler gelişimde oosit ve kumulus hücreleri arasındaki ilişki oositin olgunlaşmasını ve gelişimini desteklemektedir. Kumulus hücreleri ve oositin simbiyotik ilişkileri oositin gelişimsel yeterliliğinde ve granüloza hücrelerinin hücre fonksiyonlarında kritik rol oynamaktadır. Oositin çevresindeki kumulusla birleşmesinin mayoz bölünmeyi etkili bir şekilde durdurduğu ve konneksin 43'teki düşüşün mayotik ilerlemeyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Calder ve diğ., 2003; Edry ve diğ., 2006). Ancak konneksin 43'ün oositin sağlığı ile ilgili hücresel bağlantı hakkında sınırlı bilgi vardır. Son bulgularda, bağlantı kavşağı (gap junctional) proteinleri doğurganlığın birçok yönüyle ilişkilendirilmiş ve kadın infertilitesinde rol oynadığı rapor edilmiştir (Winterhager ve Kidder, 2015). Sığırlarda 8 mm çapından büyük ovule olacak foliküllerde eksprese olan konneksin 43, 5 mm'den küçük foliküllerden daha yüksek seviyededir. Bu da büyük foliküllerdeki oositin küçük foliküllerdekine göre daha iyi gelişimsel yeterliliğinin olduğunun göstergesidir. Fakat kumulus hücrelerindeki konneksin 43 ekspresyon seviyeleri ile oosit kalitesi arasındaki ilişki tartışmalıdır. İnsanlarda dominant foliküllerde aspire edilen oositlerde konneksin 43 ekspresyonunun ve hücresel bağlantısının artması *in vitro* fertilizasyon ve gebelik için pozitif yönlü etki göstermektedir (Wang ve diğ., 2009). Son zamanlarda, konneksin 43 ekspresyon seviyesini sığır oositlerinde *in vitro* gelişimsel yeterlilikle ilişkilendirilmiş ve gelişimsel yeterliliğe sahip oositlerin daha yüksek konneksin 43 eksprese eden kumulus hücrelerine sahip olduğu bildirilmiştir (Read ve diğ., 2018). Read ve Dyce (2019) sığır oositlerinin *in vitro* embriyo gelişimlerinde antioksidan bir madde olan alltrans retinoik asit kullandıklarında, kumulus hücrelerinde genlerin ekspresyonlarında değişikliklere sebep olduğu, ifadedeki bu değişikliğin de kumulus hücrelerinin erken apoptozunu ve farklılaşmasını önleyerek oositin erken ve anormal olgunlaşmasını engellediğini bildirmişlerdir. Eklenen antioksidanlar, bağlantı

kavşaklarının etkinliğinde önemli rol oynayan konneksin 43 ün artmasını sağlamıştır (Read ve Dyce, 2019). Mevcut bilgilere göre kurkumin ve timokinonun sığır oositlerinin *in vitro* olgunlaşmasında gelişimsel kapasitelerine etkisini araştıran ve blastosist aşamasına ulaşımını tahlil eden çalışma görülmemektedir. Bu tez çalışmasında sığır oositlerinin farklı dozlarda antioksidan ilave edilen *in vitro* olgunlaşma medyumunda geliştirilen oosit-kumulus kompleks örneklerinde konneksin 43 protein analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda 10 μ M kurkumin ve 20 μ M timokinon içeren gruplarda, konneksin 43 seviyesi sırasıyla $276,5 \pm 4,54$ ve $245,6 \pm 4,84$ saptanırken kontrol ve T10 grubuna göre $p < 0,001$ düzeyinde önemli bulunmuştur (**Tablo 4.17, Şekil 4.7**). Yine 5 μ M kurkumin içeren grup da kontrol ve T10'a göre $p < 0,05$ düzeyinde önem saptanmıştır. Bu sonuçlar bize antioksidan maddelerin farklı dozajlarda oositin *in vitro* olgunlaştırılmasında konneksin 43 miktarını arttırarak oositin gelişimsel yeterliliğine destek olduğu düşündürmüştür. Yalnız 8. gün sonunda blastosist, expanded, hatching ve hatched blastosist aşamasına ulaşmada gruplar arasında istatistiki olarak bir fark saptanmaması, bizlere antioksidan maddelerin oositin olgunlaşmasında kısa süreli kullanımının, kaspaz-3 ve konneksin 43 analizlerinde pozitif yönlü etkilediğini düşündürmektedir (**Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.16, Tablo 4.17, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7**). Ancak bu maddeler *in vitro* kültür boyunca kullanılmadığında etkinliklerini kaybettiği ve bu sebeple oositlerin foliküler gelişim döneminde potansiyel mRNA kapasitelerine bağlı olarak blastosiste ve daha sonraki aşamalara ulaştıklarını göstermektedir.

Çalışmada TCM-199 medyumuna eklenen farklı dozlardaki kurkumin (K5 ve K10) ve timokinonun (T10 ve T20) embriyo dondurulmasına etki edebileceği düşüncesiyle gruplara ait embriyolar vitrifikasyon yöntemiyle dondurulmuşlardır. Dondurma ve eritme sonucunda, embriyoların 24 ve 48. saatte değerlendirildiğinde, SOF kültür medyumunda gelişen embriyolarda en yüksek oran T20 grubuna aitken (%38,9), en düşük %5,6 ile K5 grubunda tespit edilmiştir. 24. saat canlılık kontrollerinde K5 grubu Kontrol, T10 ve T20 grupları ile bireysel olarak karşılaştırıldığında canlılık oranları aleyhine olmak üzere $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. 48. saatte ise kontrol, K10 ve T10 grubunda canlı embriyo saptanmıştır. Kontrol, K10 ve T10 grubu için sonuçlar sırasıyla %8,3, %4,8 %9,5 olarak kaydedilmiştir (**Tablo 4.9**). Eritme sonrası embriyolar aynı inkübatör koşullarında fakat CR1aa kültür medyumunda değerlendirildiğinde gruplar arasında (Kontrol, K5, K10, T10 ve T20) istatistiki olarak fark görülmemiştir (**Tablo 4.10, Şekil 3.12**). Canlılık oranı en iyi grup %36,4 ile T20 grubu bulunurken, en düşük %19 ile kontrol grubunda bulunmuş ve ilginç olarak SOF grubunda

eritme sonrası 24. saatte K5 %5,6 bulunurken, farklı medyum olan CR1aa'da %30,4 olarak kaydedilmiştir. Fakat istatistiki olarak önemli gözükmemiştir (**Tablo 4.12**). SOF ve CR1aa medyumunu 24. saat canlılık oranı karşılaştırıldığında, istatistiki bir fark olmasa da CR1aa medyumunun lehine sonuçlar elde edilmiştir.

İn vitro embriyo üretim sırasında farklı zamanlarda hücre içi (sistein ve β -merkaptoetanol) ve hücre dışı (katalaz) antioksidan takviyesinin sıgır embriyo gelişimi, hücre içi reaktif oksijen türleri seviyeleri, apoptoz ve vitrifikasyon-çözdürme işleminden sonra yeniden gelişme ve canlılık oranları üzerindeki etkileri incelendiği bir çalışmada, IVM ve/veya IVK sırasında antioksidan takviyesinin hücre içi ROT'u ve apoptoz oranını azaltabileceği; ancak, takviyenin vitrifikasyon sonrası embriyonik gelişimi ve sağkalım oranlarını arttırmadığı yönündeki görüşleri, yaptığımız çalışmada eritme sonrası elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik göstermektedir (Rocha-Frigoni ve diğ., 2014).

Sandal ve Özdaş (2015), antioksidan maddelerden sisteamini olgunlaşma medyumuna ilave etmişler, SOF ve CR1aa medyumlarında kültüre ettikleri embriyoları dondurmuşlardır. Araştırmacılar eritme sonrası 48. saat canlılık kontrollerinde, en yüksek sonucu %23,6 ile sisteamin ilave ettikleri ve CR1aa medyumunda geliştirdikleri embriyo grubunda bulurlarken, SOF grubunda ise %5,5 sonucuna ulaşmışlardır. Canlılık oranlarında CR1aa grubunun lehine olmak üzere $p < 0,05$ düzeyinde istatistiki önem saptamışlardır (Sandal ve Özdaş, 2015). Bu tez çalışmasında istatistiki önem bulunmasa da yüzdesel verilere bakıldığında, SOF medyumunda farklı antioksidan madde olan timokinon ilave edilen T10 grubunda daha iyi sonuçlar verirken (%9,5), CR1aa medyumunda ise kurkumin ilave edilen K10 grubunda (%5,6) daha yüksek sonuçlar alınmıştır (**Tablo 4.13, Tablo 4.14**). Bu sonuçlar, farklı antioksidan maddeler, farklı dozlarda ve farklı medyumlarda özellikle eritme sonrası 24. saatte benzer etkiler gösterirken, 48. saatte canlılık oranlarına negatif etki gösterebileceği düşüncesini akla getirmektedir. Ayrıca antioksidan maddelerin sadece olgunlaşmaya değil kültür medyumlarına da ilavelerinin, embriyoların donma ve eritme sonrası gelişimlerine olan etkilerinin araştırılması gerekliliğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doktora tez projesi süresince yapılan deneyler ve analizler sonunda, medyuma eklenen kurkumin ve timokinonun özellikle sığır oositlerinin *in vitro* olgunlaşma sonrası yapılan kaspaz-3 testleri sonucunda hücrenin antiapoptotik özelliklerini pozitif yönde arttırdıkları saptanmıştır. Aynı zamanda konneksin 43 proteininin tayini ile 5 ve 10 μ M kurkumin ve 10 μ M timokinonun dozlarının *in vitro* maturasyonda oositin gelişimsel yeterliliğe ulaşmasına destek olabileceği yönünde sonuçlar elde edilmiştir. Kurkumin ve timokinon için özellikle hatched blastosiste ulaşma oranlarında CR1aa medyumunun SOF medyumuna göre daha pozitif yönde etkilediği saptanmıştır. Hücre içi oksidasyon testlerinde ve embriyoların hatched blastosist aşamasına kadar olan gelişim sürecinde gruplar arasında herhangi istatistiki bir fark saptanmamış olması, oositlerin antioksidan maddeler olan timokinon ve kurkumin ile 24 saat gibi kısa süreli maruz bırakılmasına bağlanmış, *in vitro* kültür süresince uzun süreli kullanımlarında bu antioksidan maddelerin, antiapoptatik ve embriyo gelişim kapasitelerini pozitif yönde daha da arttırabileceklerini düşündürmüştür. Ayrıca yapılan çalışmada vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan embriyoların eritme sonrasında diğer gruplar arasında fark çıkmazken, SOF medyumunda geliştirilen gruplar değerlendirildiğinde K5'in aleyhine olmak üzere istatistiksel olarak önemli çıkması, vitrifikasyon sonrası eritmede de kurkuminin etkinliğinin azalmasının yanı sıra negatif etki gösterebileceğini sonucunu düşündürmüştür. Bu tez projesinde ve farklı antioksidan maddelerle ilgili daha önce yaptığımız deneysel çalışmalarda her ne kadar hücre olgunlaşmasında, canlılığın devamlılığında, embriyo gelişim aşamalarının farklı dönemlerinde pozitif yönde etkileri olsa dahi hiçbir zaman yeterince kurtarıcı maddeler olmadıkları ve oositlerin fötal dönemde oluşurken, kalıtsal aktarım ile oluşan DNA, mRNA, ATPaz kapasitelerinin, olgunlaşmada, embriyo gelişiminde ve implantasyonunda en büyük etkenlerden biri olduğunu düşündürmektedir. Doktora tez süreci boyunca kurkumin ve timokinonun sığır *in vitro* embriyo üretimindeki etkinlikleri farklı açılardan değerlendirilmiş olsa da adı geçen maddeler hakkında kesin kanaat getirilebilmesi için sığırlarda ve farklı türlerde *in vitro* embriyo kültür medyumlarına da ilave edilerek embriyo gelişimlerinin farklı aşamalarının incelenmesi, embriyoların dondurma ve eritme sonrası canlılıklarının tespiti ve çeşitli immunohistokimyasal, biyokimyasal ve moleküler analizler

yapılarak deneysel çalışmaların devam edilmesi ve en sonunda embriyo transferi yapılarak implantasyon ve gebelik oranlarının saptanması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., and Hoshi, H., 2002, Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media, *Molecular reproduction and development*, 61, 57–66.

Adona, P.R., Pires, P.R.L., Quetglas, M.D., Schwarz, K., Leal, C.L.V., 2008, Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development, *Animal reproduction science*, 108(1), 49–65.

Agarwal, A., Gupta, S., and Sharma, R.K., 2005, Role of oxidative stress in female reproduction, *Reproductive biology and endocrinology*, 3(28), 1–21.

Agarwal, A., Gupta, S., Sekhon, L., Shah, R., 2008. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: From molecular mechanisms to health implications, *Antioxidants and redox signaling*, 10(8), 1375–1404.

Aguila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., Smith L.C., 2020, Oocyte selection for *in vitro* embryo production in bovine species: noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence, *Animals*, 10, 2196.

Aksoy M. ve Uçan U., 2023, *Erken embriyonik gelişim*, Hayvanlarda Reprodüksiyon, Androloji ve Yardımcı Üreme Teknikleri, 1. Baskı, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. ISBN: 978–625–7564.

Aksoy M., 2023, *Fertilizasyon*, Hayvanlarda Reprodüksiyon, Androloji ve Yardımcı Üreme Teknikleri 1. Baskı, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. ISBN: 978–625–7564.

Alahmar, AT., 2019, Role of oxidative stress in male infertility: An updated review, *Journal of human reproductive sciences*, 12(1), 4-18.

Amin, B., ve Hosseinzadeh, H., 2016, Black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone: An overview on the analgesic and anti-inflammatory effects, *Planta medica*, 82(01/02), 8–16.

Arif, M., Thakur, S. C., and Datta, K., 2016, Implication of thymoquinone as a remedy for polycystic ovary in rat. *Pharmaceutical biology*, 54(4), 674–685.

Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., and Savardashtaki, A., 2022, Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects, *Biotechnology and applied biochemistry*, 69(4), 1633-1645.

Ashibe, S., Miyamoto, R., Kato, Y., and Nagao, Y., 2019, Detrimental effects of oxidative stress in bovine oocytes during intracytoplasmic sperm injection (ICSI), *Theriogenology*, 133, 71-78.

Awad, A., Kamel, R., and Sherief, M., 2011, Effect of thymoquinone on hepatorenal dysfunction and alteration of cyp3a1 and spermidine/spermine n-1-acetyl-transferase gene expression induced by renal ischaemia-reperfusion in rats, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 63(8), 1037-1042

Badary, O.A., Taha, R.A., El-Din, A.M.G., Abdel-Wahab, M.H., 2003, Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger, *Drug and chemical toxicology*, 26, 2, 87–98.

Barakat, I.A., Al-Shammari, J.O., Khandael, S.A., and Al-Eisa, N.A., 2015, Influence of Media Supplementation with Zinc and/or Thymoquinone on *in vitro* Fertilization and Mouse Oocytes Development, *Pakistan journal of zoology*, 47(4).

Bari, Y. N., Babapour, V., Ahmadi, A., Kheybari, M. Z., and Akbari, G., 2021, The effect of curcumin on embryonic *in vitro* development in experimental polycystic ovary syndrome: An experimental study, *International journal of reproductive biomedicine*, 19(11), 997.

Becit, M., Aydın, S., Başaran, N., 2017, Kurkuminin terapötik ve toksik etkilerinin değerlendirilmesi, *Journal of literature pharmacy sciences*, 6(2), 126-142.

Betteridge, K.J., 2003, A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques, *Animal reproduction science*, 79:203-244.

Birbal, S., Mal, G., Gautam, S.K., Mukesh, M., 2019, *Advances in animal biotechnology*. Switzerland: Springer Nature AG. 83. Syf.

Bó, G.A. ve Mapletoft, R.J., 2013, Evaluation and classification of bovine embryos, *Animal reproduction*, 10(3), 344-348.

Bogliotti, Y.S., Chung, N., Paulson, E.E., Chitwood, J., Halstead, M., Kern, C., Schultz, R.M., Ross P.J., 2020, Transcript profiling of bovine embryos implicates specific transcription factors in the maternal-to-embryo transition, *Biology of reproduction*, 102(3), 671–679.

Brackett B.G., Bousquet D., Boice M.L., Donawick W.J., Evans J.F., Dressel M.A., 1982, Normal development following *in vitro* fertilization in the cow, *Biology of reproduction* 27,147–158

Brewis, I.A., Wong, C.H., 1999, Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida, *Reviews of reproduction*, 4, 135–142.

Bulca, S., 2014, Çörek otunun bileşenleri ve bu yağın ve diğer bazı uçucu yağların antioksidan olarak gıda teknolojisinde kullanımı, *Adnan Menderes üniversitesi ziraat fakültesi dergisi*, 11(2), 29-36

Cajas, Y. N., Cañón-Beltrán, K., Ladrón de Guevara, M., Millán de La Blanca, M. G., Ramos-Ibeas, P., Gutiérrez-Adán, A., ... and González, E. M., 2020, Antioxidant nobiletin

enhances oocyte maturation and subsequent embryo development and quality, *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5340.

Calder, M.D., Caveney, A.N., Smith, L.C., Watson, A.J., 2003, Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*, *Reproductive biology and endocrinology*, 1, 14.

Camargo, L.S.A., Viana, J.H.M., Sá, W.F., Ferreira, A.M., Ramos, A.A., Filho, V.R.V., 2006, Factors Influencing In vitro Embryo Production, *Animal reproduction*, 3(1), 19-28.

Carambula, S. F., Matikainen, T., Lynch, M. P., Flavell, R. A., Dias Gonçalves, P. B., Tilly, J. L., and Rueda, B. R., 2002, Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum, *Endocrinology*, 143(4), 1495-1501.

Chang MC., 1968, In vitro fertilization of mammalian eggs, *Journal of animal science*, 2(1), 15–22.

Chaube, S.K., Shrivastav, T.G., Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., Pandey, A.K., 2014, Neem (*Azadirachta indica* L.) leaf extract deteriorates oocyte quality by inducing ROS-mediated apoptosis in mammals, *Springe*, 26 (3), 464.

Chen, C.C., Hsieh, M.S., Hsuuw, Y.D., Huang, F.J., Chan, W.H., 2010, Hazardous effects of curcumin on mouse embryonic development through a mitochondria-dependent apoptotic signaling pathway, *International journal of molecular sciences*, 11(8), 2839-2855.

Chen, C.C., ve Chan, W.H., 2012, Injurious effects of curcumin on maturation of mouse oocytes, fertilization and fetal development via apoptosis, *International journal of molecular sciences*, 13(4), 4655-4672.

Chen, X., Xuan, B., Xu, D., Wang, Q., Cheng, M., and Jin, Y., 2019, Crocin supplementation during oocyte maturation enhances antioxidant defence and subsequent cleavage rate, *Reproduction in domestic animals*, 54(2), 300-308.

Cheng, D., Li, W., Wang, L., Lin, T., Poiani, G., Wassef, A., and Kong, A., 2019, Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pkpd modeling of curcumin in regulating antioxidant and epigenetic gene expression in healthy human volunteers, *Molecular pharmaceutics*, 16(5), 1881-1889.

Cheuquemán, C., Arias, M. E., Risopatrón, J., Felmer, R., Álvarez, J., Mogas, T., Sánchez, R., 2015, Supplementation of IVF medium with melatonin: Effect on sperm functionality and *in vitro* produced bovine embryos, *Andrologia*, 47(6), 604-615.

Clarke, G.N., 2006, A.R.T. and history, 1678–1978. *Human reproduction*, 21(7), 1645–1650.

Critser E.S., Liebfried-Rutledge M.L., Eyestone W.H., Northey D.L., First N.L., 1986, Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*, *Theriogenology*, 25, 150.

Cuthbert, J.M., Russell, S.J., White, K.L. Benninghoff A.D., 2019, The maternal-to-zygotic transition in bovine *in vitro*-fertilized embryos is associated with marked changes in small non-coding RNAs, *Biology of reproduction*, 100(2), 331–350.

D'amelio, M., Cavallucci, V., Cecconi, F., 2010, Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death, *Cell death differ*, 17(7),1104.

Delilbaşı, L., 2008, İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi.

Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D., 2004, Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects, *Journal of the association of physicians of India*, 52(794804), 4.

Diogenes, M.N., Guimaraes, A.L.G., Leme, L.O., Mauricio, M.F., Dode, M.A.N., 2017, effect of prematuration and maturation with fibroblast growth factor 10 (FGF10) on *in vitro* development of bovine oocytes, *Theriogenology*, 102, 190-198.

Dos Santos, E.C., Varchetta, R., De Lima, C.B., Ispada, J., Martinho H.S., Fontes P.K., Nogueira, M.F.G., Gasparrini, B., Milazzotto, M.P., 2019, The effects of crocetin supplementation on the blastocyst outcome, transcriptomic and metabolic profile of *in vitro* produced bovine embryos, *Theriogenology*, 123, 30-36.

Dujíčková, L., Makarevich, A.V., Olexiková, L., Kubovičová, E., and Strejček, F., 2021, Methodological approaches for vitrification of bovine oocytes, *Zygote*, 29(1), 1-11.

Duque, P., Gomez, E., Diaz, E., Facal, N., Hidalgo, C., and Diez, C., 2003, Use of two replacements of serum during bovine embryo culture *in vitro*, *Theriogenology*, 59, 889–899.

Durum ve Tahmin Kırmızı Et, 2023. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge> ,[Ziyaret tarihi: 12.05.2024]

Ealy, A.D., Wooldridge, L.K., McCoski, S.R., 2019, Board Invited Review: Post-transfer Consequences of İn vitro-Produced Embryos in Cattle, *Journal of animal science*, 97 (6), 2555-2568.

Edry, I., Sela-Abramovich, S., Dekel, N., 2006, Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle, *Molecular and cellular endocrinology*, 252(1-2), 102–106.

Eini, F., Bidadkosh, A., Nazarian, H., Piryaee, A., Novin, M.G., Joharchi, K., 2019, Thymoquinone reduces intracytoplasmic oxidative stress and improves epigenetic modification in polycystic ovary syndrome mice oocytes, during in-vitro maturation, *Molecular reproduction development*, 1–14.

Emanuelli, I.P., Costa, C.B., Marinho, L.S.R., Seneda, M.M., Meirelles, F.V., 2019, Cumulus-oocyte interactions and programmed cell death in bovine embryos produced *in vitro*, *Theriogenology*, 126, 81-87.

Enginler, S.Ö., Özdaş, Ö.B., Sandal, A.İ., Arıcı, R., Ertürk, E., Baran, A., Toydemir, T.F.S., Tek, Ç., Kılıçarslan, R., Ak, K., 2016, The effect of cysteamine and oviductal cells in different culture media on the development of sheep embryos, *Kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 22(1), 138-145.

Esener, O., Balkan, B.M., Armutak E.I., Uvez, A., Yildiz, G., Hafizoglu, M., Yilmazer, N., Gurel-Gurevin, E., 2018, Donkey milk kefir induces apoptosis and suppresses proliferation of Ehrlich ascites carcinoma by decreasing iNOS in mice, *Biotechnic histochemistry*, 93(6), 424-431.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H., 1991, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free radical biology and medicine*, 11(1), 81-128.

Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004, Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation research/reviews in mutation research*, 567(1), 1-61.

Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., Meryman, H. T., 1984, Vitricification as an approach to cryopreservation, *Cryobiology*, 21(4), 407-426.

Fair T., Hyttel P., Greve T., 1995, Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity, *Molecular reproduction and development* 42:437-442

Fair, T., 2013. Molecular and endocrine determinants of oocyte competence, *Animal reproduction*, 10, 277-282.

Ferré, L.B., Kjelland, M.E., Strøbech, L.B., Hyttel, P., Mermillod, P., Ross, P.J., 2020a, Review: recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods, *Animal*, 14(5), 991-1004.

Ferré, L.B., Kjelland, M.E., Taiyeb, A. M., Campos-Chillon, F., Ross, P. J., 2020b, Recent progress in bovine *in vitro*-derived embryo cryotolerance: Impact of *in vitro* culture systems, advances in cryopreservation and future considerations, *Reproduction in domestic animals*, 55(6), 659-676.

Ferreira, E.M., Vireque, A.A., Adona, P.R., Meirelles, F.V., Ferriani, R.A., Navarro, P.A.A.S., 2009, Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence, *Theriogenology*, 71, 836–848.

Földešiová M., Baláži A., Chrenek P., 2016, The effect of curcuma longa plant extract on the rabbit embryo development *in vitro*, *Slovak journal of animal science*, 49(3), 132–136.

Fujii, J., Iuchi, Y., Okada, F., 2005, Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system, *Reproductive biology and endocrinology*, 3 (43), 1-10.

Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K., Toyoda, Y., 1990, Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage, *Biology of reproduction*, 42,114–9.

Ganiger, S., Malleshappa, H.N., Krishnappa, H., Rajashekhar, G., Ramakrishna Rao, V.R., Sullivan, F., 2007, A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow in Wistar rats, *Food and chemical toxicology*, 45, 64–9.

Gardner, D.K., 2008, Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics, *Reproduction, fertility and development*, 20, 9–18.

Ghanem, N., Amin, A., Saeed, A. M., Abdelhamid, S. M., El-Sayed, A., Farid, O. A., ... and Faheem, M. S., 2020, Effects of curcumin supplementation on viability and antioxidant capacity of buffalo granulosa cells under *in vitro* culture conditions, *World's veterinary journal*, 10(2), 146-159.

Ghatebi, M., Zavareh, S., Lashkarbolouki, T., Elahdadi Salmani, M., 2019, implications from early life stress on the development of mouse ovarian follicles: focus on oxidative stress, *Journal of obstetrics gynaecology research*, 45,1506–1514.

Gilchrist, R.B., 2010, Recent insights into oocyte–follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation, *Reproduction, fertility and development*, 23(1), 23–31.

Gonçalves, F.D.S., Barretto, L.S.S., Arruda, R.P.D., Perri, S.H.V., Mingoti, G. Z., 2010, Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo development, *Reproduction in domestic animals*, 45(1), 129-135.

Goovaerts, I.G.F., Leroy, J.L.M.R., Van Soom, A., De Clercq, J.B.P., Andries, S., Bols, P.E.J., 2009, Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the *in vitro* developmental competence of bovine zygotes cultured singly, *Theriogenology*, 71, 729–738.

Gordon, I., 2003, *In vitro fertilization*. In Laboratory production of cattle embryos (ed. I Gordon), pp. 176–219, CABI Publishing, Oxon, UK. ISBN:0851996663

Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y., Ogawa, K., 1988, Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes, *Journal of reproduction and fertility*, 83, 753–758.

Goyal, S.N., Prajapati, C.P., Gore, P.R., Patil, C.R., Mahajan, U.B., Sharma, C., ... Ojha, S.K., 2017, Therapeutic potential and pharmaceutical development of thymoquinone: A multitargeted molecule of natural origin, *Frontiers in pharmacology*, 8, 656.

Granot, I. and Dekel, N., 1997, Developmental expression and regulation of the gap junction protein and transcription in rat ovaries, *Molecular Reproduction and development: incorporating gamete research*, 47(3), 231-239.

Granot, I., ve Dekel, N., 2002, The ovarian gap junction protein connexin43: regulation by gonadotropins, *Trends in endocrinology and metabolism*, 13(7), 310-313.

Grøndahl, C., 2008, Oocyte maturation, *Danish medical bulletin*, 55, 1-16.

Guerin, P., El Mouatassim, S., Menezo, Y., 2001, Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings, *Human reproduction update*, 7(2), 175–189.

Gurel, E., Caner, M., Bayraktar, L., Yilmazer, N., Doğruman, H., Demirci, C., 2007, Effects of artichoke extract supplementation on gonads of cadmium-treated rats. *Biological trace element research*, 119 (1), 51-59.

Güllü, E.B., Avcı, G., 2013, Timokinon: *Nigella Sativa*’nın biyoaktif komponenti, *Kocatepe veterinary journal*, 6(1), 51-61

Haida, Z., ve Hakimian, M., 2019, A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food science and nutrition*, 7(5), 1555-1563.

Hajian, M., Hosseini, S.M., Ostadhosseini, S., Nasr-Esfahani, M.H., 2017, Comparative stepwise pattern of reactive oxygen species production during *in vitro* development of fertilized and nuclear transferred goat embryos, *International journal of fertility and sterility*, 11(2), 93.

Halliwell, B., 2012, Free radicals and antioxidants: updating a personal view, *Nutrition reviews*, 70, 257–265.

Hanada A, Enya Y, Suzuki T., 1986, Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*, *Japan journal of animal reproduction*, 32,208.

Hansen P.J., 2002, Embryonic mortality in cattle from the embryo’s perspective, *Journal of animal science*, 80, 33-44.

Hasler J.F., 2014, Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences, *Theriogenology*, 81, 152–169.

Heape, W., 1891, Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proceedings of the royal society of London*, 48, 457–459.

Hidaka, T., Fukumoto, Y., Yamamoto, S., Ogata, Y., Horiuchi, T., 2018, Variations in bovine embryo production between individual donors for OPU-IVF are closely related to glutathione concentrations in oocytes during *in vitro* maturation, *Theriogenology*, 113, 176-182.

Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T., Callesen, H., 1999, High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins, *Theriogenology*, 52, 683–700.

Hsuuw Y.D., Chang C.K., Chan W.H., Yu J.S., 2005, Curcumin prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryonic stem cells and blastocysts, *Journal of cellular physiology*, 205, 379–386.

Huang, F.J., Lan, K.C., Kang, H.Y., Liu, Y.C., Hsuuw, Y.D., Chan, W.H., Huang, K.E., 2013, Effect of curcumin on *in vitro* early post-implantation stages of mouse embryo development, *European journal of obstetrics and gynecology and reproductive biology*, 166, 47–51.

Hunter R.H.F., 1996, Ovarium control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilization to avoid polyspermy, *Molecular reproduction and development, incorporating gamete research*, 44(3), 417-422

Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T., 1997, Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle, *Theriogenology*, 47(1), 23-32.

International Embryo Transfer Society (IETS). *Iets 2022 Data Retrieval Report*, [https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS Data Retrieval Report 2022.pdf](https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2022.pdf), [Ziyaret tarihi: 12.05.2024]

Iqbal, M., Sharma, S., Okazaki, Y., Fujisawa, M., and Okada, S., 2003, Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase ii metabolizing enzymes in ddy male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity, *Pharmacology and toxicology*, 92(1), 33-38.

Iritani, A, Niwa, K., 1977, Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture, *Journal of reproduction and fertility*, 50,119–21.

Ismail, M., Al-Naqeep, G., Chan, K.W., 2010, Nigella sativa thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats, *Free radical biology and medicine*, 48, 664–672.

Ivanoff, E. I., 1922, On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia, *The journal of agricultural science*, 12, 244–256.

İkitimur-Armutak, E.I., Ulukaya, E., Gurel-Gurevin, E., Yaylim, I., Isbilen-Basok, B., Sennazli, G., Yuzbasioglu-Ozturk, G., Sonmez, K., Celik, F., Kucukhuseyin, O., Korkmaz, G., Yilmaz, V.T., Zeybek, S.U., 2016, Apoptosis-inducing effect of a palladium (II) complex-[PdCl(terpy)](sac).2H₂O on Ehrlich ascites carcinoma (EAC) in mice, *In vivo*, 30 (4), 457-464.)

Jeeva, J.S., Sunitha, J., Ananthalakshmi. R., Rajkumari, S., Ramesh, M., Krishnan, R., 2015, Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases, *Journal of pharmacy and bioallied sciences*, 7(2), 331-333.

Jin, X., Xiao, L. J., Zhang, X. S., Liu, Y.X., 2011, Apoptosis in ovary, *Frontiers in bioscience*, 3, 680-697.

Johnson, L.A., 1995, Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review, *Reproduction, fertility and development*, 7, 893–903.

Jones, A.L., 2021, Cryopreservation of bovine embryos, *Bovine reproduction*, 1103-1109.

Jones, KT., 2004, Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization, *Molecular human reproduction*, 10,1-5.

Kamarzaman, S., Wahab, A.Y.A., Rahman, S.A., 2014, Effects of thymoquinone supplementation on cyclophosphamide toxicity of mouse embryo *in vitro*, *Global veterinaria*, 12(1), 80-90.

Kara, U., ve Bekyürek, T., 2020, Türkiye’de Süt Sığırcılığında Reprodüktif Biyoteknolojik Yöntemlerin Gelişimi, *International Journal of eastern mediterranean agricultural research*, 3(1), 63-82.

Kasap, S., ve Çelik, C., *Nesli tükenmeye yüz tutan "Zavot" sığırı "tüp bebek" yöntemiyle koruma altına alındı*, <https://www.aa.com.tr/tr/bilim-teknoloji/nesli-tukenmeye-yuz-tutan-zavot-sigiri-tup-bebek-yontemiyle-koruma-altina-alindi/2941302#>, [Ziyaret tarihi: 1 Aralık 2023].

Khan, M., Tania, M., Fu, S., and Fu, J., 2017, Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation, *Oncotarget*, 8(31), 51907-51919

Khazaei, M., ve 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.

Knitlova, D., Hulinska, P., Jeseta, M., Hanzalova, K., Kempisty, B., Machatkova, M., 2017, Supplementation of l-carnitine during *in vitro* maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes, *Theriogenology*, 102, 16-22.

Kuwayama, M., 2007, Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method, *Theriogenology*, 67(1), 73-80.

Lane, M. ve Gardner, D.K., 2007, Embryo culture medium: Which is the best?, *Best practice and research clinical obstetrics and gynecology*, 21 (1), 83-100

Lane, M., Gardner, D. K., Hasler, M. J., ve Hasler, J. F., 2003, Use of G1. 2/ G2. 2 media for commercial bovine embryo culture: Equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture, *Theriogenology*, 60, 407–419.

Leala, G.R., Monteiroa, C.A.N., Souza-Fabjana, J.M.G., Vasconcelosa, C.O.P., Nogueiraa, L.A.G., Ferreira, A.M.R., Serapião, R.V., 2018, Role of cAMP modulator supplementations during oocyte *in vitro* maturation in domestic animals, *Animal reproduction science*, 199,1–14.

Lee, J.Y., Jung, Y.G., and 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(1), 1.

Lenz, R.W., Ball, G.D., Leibfried, M.L., Ax, R.L., First NL., 1983, In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature–dependent processes, *Biology of reproduction*, 29,173–9.

Lim, J.M., Mei, Y., Chen, B., Godke, R.A., Hansel, W., 1999, Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with a nitric oxide scavenger or inhibitor in a co-culture system, *Theriogenology*, 51, 941–949.

Limit Aşım Günü. <https://www.wwf.org.tr/?12540/Limit-Asim-Gunu> Son erişim tarihi: 12.05.2024

Liu, Z. ve Foote, R.H., 1995, Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂, *Biology of reproduction*, 53, 786–790.

Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.C., Kandaswamy, E., Zhou, T., Zuo, L., 2018, Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases, *Frontiers in physiology*, 9, 360203

Loetchutinat, S., Kothan, S., Dechsupa, J., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, S.M., 2005, Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 20,70-dichlorofluorescein diacetate assay, *Radiation physics and chemistry*, 72(2-3), 323-331.

Lonergan, P. ve Fair T., 2016, Maturation of oocytes *in vitro*, *Annual reviews animal bioscience*, 4, 255–68

Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F. Boland, M.P., 2001, Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle, *Reproduction nutrition development*, 41, 427–437.

Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Fernandez-Fuertes, B., Maillo, V., Beltran-Brena, P., Calle, A., Rizos, D., 2016, Extracellular vesicles from BOEC in *in vitro* embryo development and quality, *Plos one*, 11(2), 1-23.

Luberda, Z., 2005, The role of glutathione in mammalian gametes, *Reproductive biology*, 5(1), 5–17.

Maarman, G.J., 2017, Natural antioxidants as potential therapy, and a promising role for melatonin against pulmonary hypertension, *Pulmonary vasculature redox signaling in health and disease*, 161-178.

Mao, L., Lou, H., Lou, Y., Wang, N., Jin, F., 2014, Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation, *Reproductive biomedicine online*, 28, 284– 299

Matos, D.D.G. De Herrera, C., Cortvrindt, R., Smits, J., Van Soom, A., Nogueira, D., Pasqualini, R.S., 2002, Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: A useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production, *Molecular reproduction development*, 62, 203–209

Mermillod, P., Tomanek, M., Marchal, R.J. ve Meijer, L., 2000, High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of mpf kinase activity, *Molecular reproduction and development*, 55, 89–95.

Merton, J.S., de Roos, A.P.W., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos P.L.A.M., Dieleman S.J., 2003, Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry, *Theriogenology*, 59, 651–674.

Miglio, L., Novaes, M.A.S., de Lima, L.F., Arantes, T.M., Alves, K.A., Dias, F. E. F., ... and de Figueiredo, J.R., 2023, Zinc oxide nanoparticles functionalized with curcumin supplementation during *in vitro* embryo culture impaired in a concentration-dependent-manner blastocyst production in cattle, *Reproduction in domestic animals*, 58(8), 1172-1175.

Mohammed A.A. ve Farghaly M.M., 2018, Effect of Nigella Sativa seeds dietary supplementation on oocyte maturation and embryo development in mice, *Egyptian journal of animal production*, 55(3), 195-201.

Monsefi, M., Nadi, A., Alinejad, Z., 2017, The effects of Salvia officinalis L. on granulosa cells and *in vitro* maturation of oocytes in mice, *International journal of reproductive Biomedicine*, 15(10), 649.

Moore, S.G. ve Hasler, J.F., 2017, A 100-year review: reproductive technologies in dairy science, *Journal of dairy science*, 100(12), 10314–10331

Morotti, F., Sanches, B.V., Pontes, J.H., Basso, A.C., Siqueira, E.R., Lisboa, L.A., Seneda, M.M., 2014, Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in Bos indicus, Bos indicus-taurus, and Bos taurus cattle, *Theriogenology*, 81, 696–701.

Nagai, T., 2001, The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes, *Theriogenology*, 55, 1291-1301.

Najafzadeh, V., Secher, J. B. M., Pihl, M., Aerenlund, A., Jørgensen, N., Jensen, K. K., and Hyttel, P., 2021, Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine *in vitro* produced blastocysts, *Theriogenology*, 171, 44-54.

Naspinska, R., Moreira da Silva, M. H., Moreira da Silva, F., 2023, Current advances in bovine *in vitro* maturation and embryo production using different antioxidants: a review, *Journal of developmental biology*, 11(3), 36.

Nedambale, T.L., Du, F., Yang, X., Tian, X.C., 2006, Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with -mercaptoethanol, *Animal reproduction science*, 93, 61-75.

Norris, R.P., Ratzan, W.J., Freudzon, M., Mehlmann, L.M., Krall, J, 2009, Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte, *Development*, 136,1869–78

Olson, S.E. ve Seidel, G.E., 2000, Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients, *Biology of reproduction*, 62, 248–252.

Ombelet, W., and Van Robays, J., 2015, Artificial insemination history: hurdles and milestones, *Facts, views and vision in ObGyn*, 7(2), 137.

Orozco-Lucero, E., ve Sirard, M.A., 2018, Molecular markers of fertility in cattle oocytes and embryos: progress and challenges, *Animal reproduction*, 11(3), 183-194.

Ortiz-Escribano, N., Smits, K., Piepers, S., Van den Abbeel, E., Woelders, H., Van Soom, A., 2016, Role of cumulus cells during vitrification and fertilization of mature bovine oocytes: Effects on survival, fertilization, and blastocyst development, *Theriogenology*, 86(2), 635-641.

Özdaş, Ö.B., Baran, A., 2015, Çiftlik hayvanlarında reaktif oksijen türleri ve antioksidanların gamet hücrelerinin in vitro gelişimlerine etkileri, *Türkiye klinikleri dölerme ve suni tohumlama - özel konular dergi kimliği*, 1(3), 35-38

Özdaş, Ö.B., Cirit, Ü., Baran, A., Kaşıkçı, G., 2012, The effects of oviductal cell co-culture and different gas mixtures on the development of bovine embryos *in vitro*. *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 36 (4), 362-366.

Öztürkler, Y., Aydın, E., Kaçar, C., Yıldız S., 2022a, Etçi Beefmaster Sığır Irkında Damızlık Sığır İthalatı Yerine Dondurulmuş Embriyo Kullanılarak Çekirdek Sürü Oluşturulması Üzerine Bir Ekonomik Analiz, *International congress on reproduction and artificial insemination*, Aralık, Konya, Türkiye, 65-66.

Öztürkler, Y., Yıldız, S., Gungor, O., Pancarcı, S.M., Kacar, C., Uc, A., 2010, The effects of L-ergothioneine and L-ascorbic acid on the *in vitro* maturation (IVM) and embryonic development (IVC) of sheep oocytes, *Kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 16(5).

Öztürkler, Y., ve Kaçar, C., 2023, Sığır endüstrisinde biyoteknoloji, *Ulusal lider Haydar Aliyev'in doğumu ve Türkiye Cumhuriyeti'nin 100. yıl dönümü anısına "I. uluslararası hayvancılık" kongresi*, Lenkeran, 20-21 Ekim 2023, 42-68

Öztürkler, Y., Yıldız, S., and Önder, N.T., 2022b, Effect of antioxidants *in vitro* maturation and *in vitro* embryo development in small ruminants, *The role of exogenous antioxidants in enhancing reproductive function and performance*, 91.

Palasz, A. T., and Maplettoft, R. J., 1996, Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances, *Biotechnology advances*, 14(2), 127-149.

Park, S.H., Cho, H. S., and Yu, I. J., 2014, Effect of bovine follicular fluid on reactive oxygen species and glutathione in oocytes, apoptosis and apoptosis-related gene expression of *in vitro*-produced blastocysts, *Reproduction in domestic animals*, 49(3), 370–377.

Park, S.Y., Yoon, S.J., Hakomori, S.İ., Kim, J.M., Kim, J.Y., Bernert, B., Ullman, T., Itzkowitz, S.H., Kim, J.H., 2010, Dimeric Lea (Lea-on-Lea) status of β -haptoglobin in sera of colon cancer, chronic inflammatory disease and normal subjects, *International journal of oncology*, 36(5), 1291-1297.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., First, N.L., 1985, Effect of heparin and chondroitin sulphate on the acrosome on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*, *Theriogenology*, 24,537–49.

Parrish, J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, W.H., First, N.L., 1986, Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen, *Theriogenology*, 25, 591-600.

Parrish, J.J., 2014, Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with Heparin, *Theriogenology*, 81(1), 67-73.

Parveen, A., Akash, M. S. H., Rehman, K., Kyunn, W. W., 2016, Recent investigations for discovery of natural antioxidants: a comprehensive review. *Critical reviews™ in eukaryotic gene expression*, 26(2).

Patel, S. S., and Carr, B. R., 2008, Oocyte quality in adult polycystic ovary syndrome, pp. 196–203. Dallas, TX: © Thieme Medical Publishers.

Perkel, K.J., Tscherner, A., Merrill, C., Lamarre, J., Madan, P., 2015, The ART of selecting the best embryo: a review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods, *Molecular reproduction and development*, 82, 822–838.

Perry, E. J., 1945, The Artificial Insemination of Farm Animals. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ.

Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruip, T.A.M., Taverne, M.A.M., 1988, Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of ovaries, *Theriogenology*, 30,751–62.

Pincus, G. and Enzmann, E.V., 1935, The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and *in vitro*: I. The activation of ovarian eggs, *Journal of experimental medicine*, 62 (5), 65–75.

Premkumar, K.V. and 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 and developmental biology –animal*, 52, 576–588.

Rall, W.F., and Fahy, GM., 1985, Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 C by vitrification, *Nature*, 313, 6003, 573e5.

Read, C.C. and Dyce, P.W., 2019, All-trans retinoic acid exposure increases connexin 43 expression in cumulus cells and improves embryo development in bovine oocytes, *Molecular reproduction and development*, 86(12), 1865-1873.

Read, C.C., Willhelm, G., Dyce, P.W., 2018, Connexin 43 coupling in bovine cumulus cells, during the follicular growth phase, and its relationship to *in vitro* embryo outcomes, *Molecular reproduction and development*, 85(7), 579-589.

Richter, C., 1987, Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes, *Chemistry and physics of lipids*, 44, 175–189.

Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., De la Fuente, J., Lonergan, P., Gutiérrez-Adán, A., 2008, Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality, *Reproduction in domestic animals*, 43, 44-50.

Robert, C., Hue, I., McGraw, S., Gagné, D., Sirard, M. A., 2002, Quantification of cyclin B1 and p34cdc2 in bovine cumulus-oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA macroarrays, *Biology of reproduction*, 67,1456–1464

Rocha-Frigoni, N.A., Leão, B.C., Nogueira, É., Accorsi, M.F., Mingoti, G.Z., 2014, Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro* in the presence of antioxidants, *Reproduction, fertility and development*, 26(6), 797-805.

Rosenkrans, C.F. and First, N.L., 1994, Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*, *Journal of animal science*, 72, 434-437.

Sá, N.A., Vieira, L.A., Ferreira, A.C.A., Cadenas, J., Bruno, J. B., Maside, C., Figueiredo J.R., 2020, Anethole supplementation during oocyte maturation improves *in vitro* production of bovine embryos, *Reproductive sciences*, 27, 1602-1608

Saifi, B., Haftcheshmeh, S. M., Feligioni, M., Izadpanah, E., Rahimi, K., Hassanzadeh, K., Sahebkar, A., 2022, An overview of the therapeutic effects of curcumin in reproductive disorders with a focus on the antiinflammatory and immunomodulatory activities, *Phytotherapy research*, 36(2), 808-823.

Saini, S., Selokar, N. L., Singh, M. K., 2024, Curcumin supplementation ameliorates heat stress and affects early embryonic development, *Animal reproduction update*, 4(1), 21-28.

Salahshoor, M.R., Haghjoo, M., Roshankhah, S., Makalani, F., Jalili, C., 2018, Effect of thymoquinone on reproductive parameter in morphine-treated male mice, *Advanced biomedical research*, 7, 18.

Sandal A.İ., Şenlikci, H., Elgün, T., Arıcı, R., Enginler, S.Ö. Baran A., Ak, K., İrez, T., Özdaş, Ö.B., 2021, Improvement of bovine *in vitro* embryo production by fetal calf serum and cysteamine supplementation and investigation of freezability, *Ankara üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 68, 33-38.

Sandal, A.İ. ve Özdaş, Ö.B., 2015, Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos matured in modified TCM-199 medium, *Turkish journal of veterinary and animal science*, 39, 688-692.

Sandal, A.İ., 2012, *Modifiye TCM-199 Medyumunda Olgunlaştırılarak İn Vitro Üretilen Sığır Embriyolarının Dondurulması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Sandal, A.İ., Özdaş, Ö.B., Baran, A., 2015, Çiftlik hayvanlarında transfer amaçlı dondurulan embriyoların üretiminde kullanılan antioksidanların gebelik oranları üzerine etkileri, *Türkiye klinikleri dölerme ve suni tohumlama - özel konular dergi kimliği*, 1(3), 55-58.

Saragusty, J. and Arav, A., 2011, Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification, *Reproduction*, 141, 1-19.

Seidel, G.E., 2006, Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation, *Theriogenology*, 65, 228-235.

Senturk, L.M., Seli, E., Gutierrez, L.S., Mor, G., Zeyneloglu, H.B., Arici, A., 1999, Monocyte chemotactic protein-1 expression in human corpus luteum, *Molecular human reproduction*, 5(8), 697-702.

Shalini, S, Dorstyn, L., Dawar, S.K.S., 2015, Old, new and emerging functions of caspases, *Cell death differ*, 22(4),526.

Shang, J., Yang, C., Zheng, H., Wang, J., Huang, F., Yang, B., Liang, X., 2013, Effects of curcumin on buffalo embryonic development *in vitro*, *Buffalo bulletin*, 32(Special Issue 2), 456-459.

Silva, B.R. and Silva, J.R.V., 2023, Mechanisms of action of non-enzymatic antioxidants to control oxidative stress during *in vitro* follicle growth, oocyte maturation, and embryo development, *Animal reproduction science*, 249,107186, 1-15.

Sirard, M.A., 2018, 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context, *Reproduction*, 156, R1–R7.

Sirard, M.A., Richard F., Blondin P., Robert C., 2006, Contribution of the oocyte to embryo quality, *Theriogenology*, 65, 126–136.

Soto-Heras, S. and Paramio, M.T., 2020, Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo T production programs, *Research in veterinary science*, 132, 342–350.

Sovernigo, T.C., Adona, P.R., Monzani, P.S., Guemra, S., Barros, F.D.A., Lopes, F.G., Leal C.L.V., 2017, effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production, *Reproduction domestic animal*, 52, 561–569.

Sprícigo, J.F., Morató, R., Arcarons, N., Yeste, M., Dode, M.A., López-Bejar, M., Mogas, T., 2017, Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on *in vitro*-matured calf oocytes, *Theriogenology*, 89, 47-57.

Sudano, M.J., Paschoal, D.M., Da Silva Rascado, T., Crocomo, L.F., Magalhaes, L.C., Junior, A.M., Da Cruz Landim-Alvarenga, F., 2014, Crucial surviving aspects for vitrified *in vitro*-produced bovine embryos, *Zygote*, 22, 124–131.

Sugimura, S., Yamanouchi, T., Palmerini, M. G., Hashiyada, Y., Imai, K., Gilchrist, R. B., 2018, Effect of pre-*in vitro* maturation with cAMP modulators on the acquisition of oocyte developmental competence in cattle, *Journal of reproduction and development*, 64(3), 233-241.

Taşkın, E. İ., Akgün-Dar, K., Kapucu, A., Osanç, E., Doğruman, H., Eraltan, H., Ulukaya, E., 2009, Apoptosis-inducing effects of *Morinda citrifolia* L. and doxorubicin on the Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 27(8), 542-546.

Taşkın, K., Kapucu, A., Akgun-Dar, K., Yagci, A., Caner, M., Firat, U., Dogruman, H., 2008, Effects of an oral treatment with concentrated grape juice (ENT) on cell NOS (eNOS and iNOS) expression and proliferation in experimentally induced carcinoma in mice, *Revue de médecine vétérinaire*, 159.

Tatsukawa, Y., Bowolaksono, A., Nishimura, R., Komiyama, J., Acosta, T. J., Okuda, K., 2006, Possible roles of intracellular cyclic AMP, protein kinase C and calcium ion in the apoptotic

signaling pathway in bovine luteal cells, *Journal of reproduction and development*, 52(4), 517-522.

Tervit, H.R., Whittingham, D.G. and Rowson, L.E., 1972, Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova, *Journal of reproduction and fertility*, 30, 493–497.

The Lab World Group, <https://www.thelabworldgroup.com/product/biotek-flx800-microplate-reader/> [Ziyaret tarihi: 12.05.2024].

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.

Tribulo, P., Rivera, R.M., Obando, M.S.O., Jannaman, E.A., Hansen, P.J., 2019, *Production and culture of the bovine embryo*, Comparative Embryo Culture. Editör: Herrick, J.R., Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press.

Truong, T., ve Gardner, D. K., 2017, Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse, *Human reproduction*, 32(12), 2404-2413.

Tuzcu, M., Gençoğlu, H., Sahin, K., 2010, Konneksinlerin hücreler arası iletişimdeki rolü (derleme), *Medical sciences*, 5(2), 18-33.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). “Çiğ Süt Üretim İstatistikleri, 2023”. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Cig-Sut-Uretim-Istatistikleri-2023-53542>, [Ziyaret tarihi: 12.05.2024]

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). “Hayvansal Üretim İstatistikleri, Haziran 2023”. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Haziran-2023-49680>, [Ziyaret tarihi: 12.05.2024]

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). “Kırmızı Et Üretim İstatistikleri, 2023”. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Kirmizi-Et-Uretim-Istatistikleri-2023-53540>, [Ziyaret tarihi: 12.05.2024]

Vaccari, S., Weeks, J.L., Hsieh, M., Menniti F.S., Conti M., 2009, Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes, *Biology of reproduction*, 81(3), 595-604

Vajta, G., 2000, Vitriification of the oocytes and embryos of domestic animals, *Animal reproduction science*, 60, 357-364.

Van Soom, A., Yuan, Y.Q., Peelman, L.J., De Matos, D.G., Dewulf, J., Laevens, H., De Kruif, A., 2002, Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition, *Theriogenology*, 57, 1453-1465.

Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D. G., de Kruif, A., Van Soom, A., 2007, Temporal detection of caspase-3 and-7 in bovine *in vitro* produced embryos of different developmental capacity, *Reproduction*, 133(4), 709-718.

- Viana J., 2017, Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 2018, 2017;36:8e25.
- Vozzi, C., Formenton, A., Chanson, A., Senn, A., Sahli, R., Shaw, P., Haefliger, J. A., 2001, Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. *Reproduction-Cambridge*, 122(4), 619-628
- Wagner, H., Cheng, J. W., Ko, E. Y., 2018, Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature, *Arab journal of urology*, 16(1), 35-43.
- Wang, D. H., Ren, J., Zhou, C. J., Han, Z., Wang, L., Liang, C. G., 2018, Supplementation with CTGF, SDF1, NGF, and HGF promotes ovine in vitro oocyte maturation and early embryo development, *Domestic animal endocrinology*, 65, 38-48.
- Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y., Liu, G., 2014, Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization, *Fertility and sterility*, 101(2), 577–586.
- Wang, H. X., Tong, D., El-Gehani, F., Tekpetey, F. R., Kidder, G. M., 2009, Connexin expression and gap junctional coupling in human cumulus cells: Contribution to embryo quality, *Journal of cellular and molecular medicine*, 13, 972–984
- Ward, F., Enright, B., Rizos, D., Boland, M., Lonergan, P., 2002, Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire, *Theriogenology*, 57, 2105–2117.
- Welch G.R. ve Johnson L.A., 1999, Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA, *Theriogenology*, 52, 1343–1352.
- Whittingham, D.G., 1968, Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature*, 220,592–3.
- Wiesen, J.E.F. and Midgley, A.R., 1993, Changes in expression of connexin43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during ovarian follicular growth, *Endocrinology*, 133, 741–746
- Willett, E.L., Black, W.G., Casida, L.E., Stone, W.H., Buckner, P.J., 1951, Successful transplantation of a fertilized bovine ovum, *Science*, 113:247.
- Winterhager, E., ve Kidder, G. M., 2015, Gap junction connexins in female reproductive organs: Implications for women's reproductive health, *Human reproduction update*, 21, 340–352.
- Wrenzycki, C. and Stinshoff, H., 2013, Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes, *Reproduction in domestic animal*, 48 (1), 38–43.
- Wu, Y., Wang, F., Reece, E.A., Yang, P., 2015, Curcumin ameliorates high glucose-induced neural tube defects by suppressing cellular stress and apoptosis, *American journal of obstetrics and gynecology*, 212, 802, 1-8.

- Xu, D.P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Li, H. B., 2017, Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources, *International journal of molecular sciences*, 18(1), 96.
- Xu, H.Y., Yang, X.G., Lu, S.S., Liang, X.W., Lu, Y.Q., Zhang, M., Lu, K. H., 2018, Treatment with acetyl-L-carnitine during *in vitro* maturation of buffalo oocytes improves oocyte quality and subsequent embryonic development, *Theriogenology*, 118, 80-89.
- Yalçın A.S., Yılmaz A.M., Altundağ E.M., Koçtürk S., 2017, Kurkumin, kuersetin ve çay kateşinlerinin anti-kanser etkileri, *Marmara pharmaceutical journal*, 21, 19-29.
- Yılmaz, S., Becit, M., and Dilsiz, S., 2023, The effects of thymoquinone, a bioactive compound of *nigella sativa*, in combination with cisplatin on the viability of hela cervical cancer cells, *Academic journal of homeopathy and integrative medicine*, 1(1), 1-10.
- Youngs, C.R., Leibo, S.P., and Godke, R.A., 2010, Embryo cryopreservation in domestic mammalian livestock species, *CABI reviews*, 1-11.
- Yu, S., Long, H., Lyu, Q.-F., Zhang, Q.-H., Yan, Z.-G., Liang, H.-X., Qi, C., 2014, Protective effect of quercetin on the development of preimplantation mouse embryos against hydrogen peroxide-induced oxidative injury, *PLoS one*, 9(2), e89520.
- Yuan, Y.Q., Van Soom, A., Leroy, J.L.M.R., Dewulf, J., Van Zeveren, A., de Kruif, A., Peelman, L.J., 2005, Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence, *Theriogenology*, 63(8), 2147-2163.
- Zarbakhsh S., 2021, Effect of antioxidants on preimplantation embryo development in vitro: a review. *Zygote*, 29, 179–193.
- Zhao, S.J., Pang, Y.W., Zhao, X.M., Du, W.H., Hao, H.S., Zhu, H.B., 2017, Effects of lipopolysaccharide on maturation of bovine oocyte in vitro and its possible mechanisms, *Oncotarget*, 8(3), 4656.
- Zhao, Y., Ding, W.X., Qian, T., Watkins, S., Lemasters, J.J., and Yin, X.M., 2003, Bid activates multiple mitochondrial apoptotic mechanisms in primary hepatocytes after death receptor engagement, *Gastroenterology*, 125(3), 854–867.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO ÜRETİMİNDE KURKUMİN ve TİMOKİNON ETKİNLİĞİ

ORJİNALLIK RAPORU

% **11**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **10**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **4**

YAYINLAR

% **2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

% **4**

2

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

% **2**

3

Submitted to The Scientific & Technological
Research Council of Turkey (TUBİTAK)

Öğrenci Ödevi

% **1**

4

openaccess.bezmialem.edu.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

5

www.yenisafak.com

İnternet Kaynağı

<% **1**

6

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

7

www.researchgate.net

İnternet Kaynağı

<% **1**

8

iksadyayinevi.com

İnternet Kaynağı

<% **1**

Submitted to Uludag University



