

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİTRO EMBRİYO KÜLTÜR MEDYUMLARINA VE SPERMA  
DİLÜSYON SOLÜSYONLARINA İLAVE EDİLEN  
ERİTROPOİETİNİN SPERMATOLOJİK PARAMETRELER,  
OKSİDATİF STRES VE EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Muharrem SATILMIŞ

FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr. Ali BİLGİLİ

Bu araştırma Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Hayvancılık ve Su Ürünleri Araştırmaları Daire Başkanlığı'nın TAGEM/HAYSUD/13/A-02/P-01/0 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2016

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum ‘‘ *in vitro* embriyo kültür medyumlarına ve sperma dilüsyon solüsyonlarına ilave edilen eritropoietinin spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve embriyo gelişimi üzerine etkisi’’ başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Muharrem SATILMIŞ

Tarih: 02.06.2016

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında  
Muharrem SATILMIŞ tarafından hazırlanan

“*in vitro* embriyo kültür medyumlarına ve sperma dilüsyon solüsyonlarına ilave edilen eritropoietinin spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve embriyo gelişimi üzerine etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02.06.2016



Prof. Dr. Ali BİLGİLİ

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Farmakoloji ve Toksikoloji ABD  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı  
Üye



Prof. Dr. Ender YARSAN

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı  
Üye



Prof. Dr. Dinç EŞSİZ

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı  
Raportör



Prof. Dr. Murat KANBUR

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza  
Prof.Dr. K. Zafer KARAER  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

# İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Resimler	xi
Çizelgeler	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Serbest Oksijen Radikalleri	5
1.1.1. Önemli Serbest Oksijen Radikal Türleri	5
1.1.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri (oksidatif stres)	5
1.1.2.1. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri	6
1.1.2.2. Proteinlere Etkileri	6
1.1.2.3. Karbonhidratlara Etkileri	6
1.1.2.4. Lipitlere Etkileri	6
1.1.3. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Sistemleri	7
1.1.3.1. Antioksidan Kaynaklarının Sınıflandırılması	7
1.1.3.1.1. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar	7
1.1.3.1.2. Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar	7
1.1.3.2. Bazı Önemli Antioksidanlar ve Etkileri	8
1.1.3.2.1. Süperoksit Dismutaz	8
1.1.3.2.2. Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon Redüktaz	8
1.1.3.2.3. Glutasyon S-Transferaz	8
1.1.3.2.4. Katalaz	8
1.1.3.2.5. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	9
1.1.3.2.6. Glutasyon	9
1.1.3.2.7. Vitamin E	9
1.1.3.2.8. Vitamin C	9
1.2. Eritropoietin	9

1.2.1. Eritropoietinin Biyolojisi	10
1.2.2. Eritropoietinin Antioksidatif Etkileri	12
1.2.3. Eritropoietinin Dolaylı Antioksidatif Etkileri	13
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>16</b>
2.1. Gereç	16
2.1.1. Hayvan Materyali	16
2.1.2. Oosist Kaynağı	16
2.1.3. Kimyasal Maddeler	16
2.2. Yöntem	17
2.2.1. Spermanın Alınması, Dondurulması ve Çözüm Sonrası Muayeneleri	17
2.2.1.1. Sperma Dilüsyon Solüsyonunun Hazırlanması	17
2.2.1.2. Spermaların Alınması, Dilüsyonu ve Dondurulması	18
2.2.1.3. Çözüm Sonrası Spermatolojik Muayeneler	21
2.2.1.3.1. Subjektif Motilite Muayenesi	21
2.2.1.3.2. Bilgisayarlı Sperma Analiz Cihazı (CASA) ile Motilite Muayenesi	21
2.2.1.3.3. Spermatozoa Canlılığı	21
2.2.1.3.4. Spermatozoa Akrozom Bütünlüğü	22
2.2.1.3.5. Spermatozoa Mitokondriyal Aktivitesi	23
2.2.1.4. Çözüm Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri	23
2.2.1.4.1. Sperma Numunelerinin Hazırlanması	23
2.2.1.4.2. Lipit peroksidasyonu Düzeyi Analizi	24
2.2.1.4.3. Glutasyon Düzeyi Analizi	24
2.2.1.4.4. Total Antioksidan Kapasite Analizi	24
2.2.2. <i>in vitro</i> Embriyoların Elde Edilmesi ve Değerlendirilmesi	25
2.2.2.1. <i>in vitro</i> Maturasyon Solüsyonunun Hazırlanması	25
2.2.2.2. <i>in vitro</i> Fertilizasyon Solüsyonunun Hazırlanması	25
2.2.2.3. Charles Rosencrans 1 Aminoasit Kültür Medyumunun Hazırlanması	27
2.2.2.4. Oositlerin Aspirasyonu	28
2.2.2.5. Oositlerin Maturasyonu	30
2.2.2.6. Oositlerin Fertilizasyonu	30
2.2.2.7. Oositlerin Kültür Periyoduna Alınması ve Değerlendirilmesi	32
2.2.2.8. Total Oksidan Düzeyi (TOS) Analizi	34
2.2.3. İstatistiksel Analiz	35
<b>3. BULGULAR</b>	<b>36</b>

<b>4. TARTIŞMA</b>	44
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	49
<b>ÖZET</b>	50
<b>SUMMARY</b>	51
<b>KAYNAKLAR</b>	52
<b>ETİK KURUL KARARI</b>	60
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	61



## ÖNSÖZ

Oksijen tüm canlılar için hayati öneme sahip bir element olup, organik molekülleri oluşturan temel yapı taşlarındandır. Ancak oksijen, canlıların yaşamı için önemli bir element olmakla birlikte, hücrelerin solunum, fagositoz, araşidonik asit metabolizması ve diğer normal fonksiyonlarını gerçekleştirmesi esnasında reaktif moleküllere dönüşmesi aynı zamanda organizma için bir okadar zararlı ve önemli olabilmektedir. Bu reaktif moleküllerin etkilerinin bertaraf edilebilmesi son yıllarda üzerinde durulan ve araştırmacıların üzerine yoğunlaştığı bir konu haline gelmiştir. Reaktif moleküllerin oluşumunu engelleyen veya zararlı etkilerini önleyen antioksidan etkili maddelerin, bu amaçla gıda ve ilaç sanayinde yaygın olarak kullanılmasıyla birlikte, etkileri ve etki mekanizmaları ile ilgili çalışmaların da yapılması önem arz etmektedir. Bu çalışmada kullanılan eritropoietinin, birincil görevi eritrosit üretiminin kontrolünü sağlamak olmakla birlikte, son yıllarda birincil etkilerinin yanı sıra antioksidan etkinliğine yönelik çalışmaların da arttığı gözlenmektedir. Eritropoietinin *in vitro* embriyo kültür medyumu ve sperma dilüsyon solüsyonlarında antioksidan etkinliğine yönelik bir çalışmanın yapılmamış olması bu çalışmanın yapılma gerekliliğini oluşturmuştur. Yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen bulguların ve sonuçların yapılacak diğer bilimsel çalışmalara katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Doktora eğitimi imkânını sağlayan Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü, Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanlığı ve tezimi destekleyen Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Hayvancılık ve Su Ürünleri Araştırmaları Daire Başkanlığı'na, desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ali BİLGİLİ, tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Ender YARSAN, Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, tezimde spermatolojik muayenelerinin değerlendirilmesinde yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK ve biyokimyasal analizlerin yapılmasında yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR'a, istatistiksel hesaplama kısmında yardımcı

olan Kayseri Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü Personeli Dr. Halil İbrahim AKÇADAĞ'a, spermaların alınması ve dondurulmasında yardımcı olan Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü Suni Tohumlama Laboratuvarı personeli Dr. Hüseyin KİNET, Laborantlar Barış YAHŞİ, Süleyman SİPAHİ ve diğer laboratuvar personeline, embriyolarda total oksidan düzeyi ölçümünde yardımcı olan Yemler ve Hayvan Besleme Bölüm Başkanı Dr. Engin ÜNAYA'a, Enstitü Teknik Koordinatörü ve en yakın mesai arkadaşım Dr. Sedat Hamdi KIZIL'a *in vitro* embriyo üretim aşamalarındaki yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Doktoramın devamı süresince bana en büyük motivasyon ve manevi destek veren, fedakârlığını esirgemeyen hayat arkadaşım biricik eşim Meral, çocuklarım Halit, Betül ve Fatih'e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
BHT	Bütihidroksitoluen
BO	Brackett Oliphant
BSA	Bovine serum albümin
CASA	Bilgisayarlı sperma analiz cihazı
CAT	Katalaz
CR1aa	Charles Rosencrans 1 aminoasit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
EPO	Eritropoietin
EPO-R	Eritropoietin reseptörü
FCS	Fetal calf serum
FSH	Folikül sitümüle edici hormon
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutatyandisülfid
GSHPx	Glutasyon peroksidaz
GSH-R	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon S-transferaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HCOI	Hipoklorous asit
HO-1	Hem oksijenaz -1
IgG	İmmünoglobülin G
Jak2	Janus Kinaz 2
kb	Kilobaz çifti
kDA	Kilodalton
LIN	Linearity (doğrusallık)
LOOH	Lipithidroperoksit
LPO	Lipit peroksidasyon
MDA	Malondialdehit

MLT	Melatonin
ml	Mililitre
mM	Milimolar
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
nm	Nanometre
$\text{NO}^\bullet$	Nitrik oksit
$\text{O}_2$	Oksijen
$\text{O}_2^\bullet$	Süperoksit radikali
$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen
$^\bullet\text{OH}$	Hidroksil radikali
$\Omega$	Ohm
OPU	Ovum Pick Up
OYS	Oosit yıkama solüsyonu
PBS	Fosfat bufer solüsyonu
PI	Propidium iyodür (flow sitometride kırmızı floresan boyasıdır)
RNA	Ribo Nükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sperm dilüsyon solüsyonu
SnPP	Tin protoporfirin
SOD	Süperoksit dismutaz
SOF	Sentetik ovidukt sıvısı
TOS	Total oksidan düzeyi
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
SYBR	Green boyası, canlı hücrelerde yeşil renk verir
SYS	Sperm yıkama solüsyonu
TCM 199	Tissue culture medium 199
IU	International Ünite
VAP	Velocity average path (spermanın ortalama yol hızı)
VCL	Velocity curvilinear (spermanın eğrisel hızı)
VSL	Velocity speed linear (spermanın doğrusal hızı)

## RESİMLER

<b>Resim 2.1.</b> Spermanın alınması ve dilüsyon solüsyonun ilavesi	19
<b>Resim 2.2.</b> Spermaların payetlere çekilmesi	19
<b>Resim 2.3.</b> Spermaların 4 °C ekilibrasyon işlemi	20
<b>Resim 2.4.</b> Spermaların sıvı azot içerisine nakli ve saklanması	20
<b>Resim 2.5.</b> Ovaryumdan follikül aspirasyonu	29
<b>Resim 2.6.</b> Aspire edilen oosit	29
<b>Resim 2.7.</b> Oositlerin maturasyonu	30
<b>Resim 2.8.</b> Oositlerin fertilizasyon görüntüsü	31
<b>Resim 2.9.</b> Kültür ortamının 2. günü bölünen oosit	33
<b>Resim 2.10.</b> Kültür ortamının 2. günü bölünme gerçekleşmeyen oosit	33
<b>Resim 3.1.</b> Spermalarda ölü-canlı spermatozoa oranının SYBR/PI boyama tekniğiyle değerlendirilmesi	39
<b>Resim 3.2.</b> Spermalarda mitokondriyal aktivite ve membran bütünlüğünün JC-1/PI boyama tekniği ile değerlendirilmesi	40
<b>Resim 3.3.</b> Spermalarda akrozom ve membran bütünlüğü Lectin/PI boyama tekniğiyle değerlendirilmesi	40
<b>Resim 3.4.</b> Kültür ortamının 7. günü ekspanded blastosist	43
<b>Resim 3.5.</b> Kültür ortamının 7. günü ekspanded blastosist	43
<b>Resim 3.6.</b> Kültür ortamının 8. günü zondan çıkma anı	44
<b>Resim 3.7.</b> Kültür ortamının 7. günü blastosist	44

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 2.1.</b> Sperma dilüsyon solüsyonu içeriği	17
<b>Çizelge 2.2.</b> TCM-199 solüsyonu içeriği	25
<b>Çizelge 2.3.</b> BO Stok A solüsyonu hazırlanması	26
<b>Çizelge 2.4.</b> BO Stok B solüsyonu hazırlanması	26
<b>Çizelge 2.5.</b> BO Solüsyonu hazırlanması	26
<b>Çizelge 2.6.</b> Oosit yıkama solüsyonunun hazırlanması	26
<b>Çizelge 2.7.</b> Sperm dilüsyon solüsyonu hazırlanması	26
<b>Çizelge 2.8.</b> Sperm yıkama solüsyonu hazırlanması	27
<b>Çizelge 2.9.</b> CR1aa Stok A solüsyonunun hazırlanması	27
<b>Çizelge 2.10.</b> CR1aa Stok B solüsyonunun hazırlanması	27
<b>Çizelge 2.11.</b> CR1aa solüsyonunun hazırlanması	28
<b>Çizelge 3.1.</b> Boğa sperması çözüm sonu spermatolojik parametreler	37
<b>Çizelge 3.2.</b> Boğa sperması çözüm sonu numunelerinde sperma hareketlerinin ortalamaları	38
<b>Çizelge 3.3.</b> Boğa sperması çözüm sonu numunelerinde biyokimyasal parametreler	38
<b>Çizelge 3.4.</b> Kültür sürecine alınan fertilizeoositlerin 48. saat ve 7-8. gün gelişim süreçlerine ait istatistiksel tablosu	42
<b>Çizelge 3.5.</b> Kültür sürecine alınan fertilizeoositlerin 7. gün total oksidan düzeyi analizi	42

# 1. GİRİŞ

Tüm memeli hayvanların neslinin devamı dişi eşey hücresi olan oosit ile erkek eşey hücresi olan spermatozoonun dişi genital kanalında birleşmesi (füzyon) sonucu fertilizasyon olarak adlandırılan fizyolojik bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizma dişinin ovaryumlarında olgunlaşan (mature olan) oositin ovulasyonla birlikte ovidukta gelerek erkek ile çiftleşmesi sonucu dişi genital organlarında *in vivo* (canlı ortamda) gerçekleşmektedir. Ancak *in vivo* gerçekleşen fertilizasyon ile hayvanların gamet (oosit ve spermatozoon) hücrelerinden minimum düzeyde döl (yavru) verimi alınabilmektedir. Bunun için geçmişten günümüze kadar çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde yapılan çalışmalarda, hayvansal üretimin geliştirilmesi ve döl verimi oranının artırılması için genetik özelliği yüksek erkek ve dişi hayvanların gamet hücrelerinden maksimum düzeyde yararlanılması amaçlanmıştır (Knobil ve Neil, 1994).

Bu amaç doğrultusunda, erkek hayvandan bir seferde alınan ejakülat ile binlerce dişi hayvanın fertilizasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Başlangıçta taze sperma ile yapılabilen bu tohumlamalar daha sonraki yıllarda dondurarak saklama teknolojisinin geliştirilmesiyle birlikte dondurularak yapılmaya başlanmıştır. Bu teknolojiler sayesinde, bir boğadan alınan spermaların dondurulmasıyla binlerce hayvan tohumlanabildiği gibi ticari olarak da pazarlanabilme olanağı sağlanmıştır. Ancak dondurma teknolojisini geliştirilmesi ile birlikte spermanın dondurulma ve çözünme esnasında gelişen birtakım reaksiyonlar, bu hücrelerde hasarlara neden olmakta ve fertilitiyi olumsuz yönde etkilemektedir (Trincherro ve ark., 1990; Meister, 1994; Bilodeau ve ark., 2000).

Bununla birlikte, dişi hayvanların genital kanalında *in vivo* ortamda gerçekleşmekte olan fertilizasyon işlevi ise canlı hayvanların ovaryumlarındaki graff follikülünden Ovum Pick Up (OPU) tekniği ile aspire edilen veya kesilen hayvanların ovaryumlarından doğrudan aspire edilerek elde edilen oosit ve spermatozoonun kültür ortamında inkübasyona bırakılması yöntemi ile tamamen

canlı hayvanlardan bağımsız olarak dişi genital kanalı dışında *in vitro* (laboratuvar) ortamlarda gerçekleştirilebilmektedir (Knobil ve Neil, 1994).

Bu üretim teknikleri sayesinde damızlık değerini yitirmiş veya çeşitli nedenlerden dolayı damızlıktan zorunlu olarak çıkarılmış ineklerden kesim sonrasında hatta hayvanların gebe olduğu dönemde bile ovaryumlarından aspire edilen oosit ile yavru alınabilme olanağı sağlanabilmektedir. Böylece değerli damızlıkların ömürleri boyunca verebilecekleri maksimum 6-7 adet yavru sayısını sadece bir yılda birkaç katı elde etme imkânı olabilmektedir. Hem dondurulmuş sperma ile uygulanan suni tohumlama hem de *in vitro* üretilen embriyo ile yavru elde edilmesi dünyada hayvan ıslahında genetik ilerlemede kullanılan en önemli biyoteknolojik yöntemlerden biridir (Kanagawa ve ark.,1995).

Ancak, gerek spermatozoanın dondurulması gerekse oositin *in vitro* ortamlarda fertilizasyonu (IVF- *in vitro* fertilizasyon) teknolojisi aşamalarındaki manipulasyonlar, beraberinde diğer başka olumsuzlukları gündeme getirmiştir. Özellikle oositinlerin *in vitro* ortamlarda manipulasyonları (aspirasyon, maturasyon ve fertilizasyon) esnasında yüksek oksijene maruz kalması ve spermatozoanın donma çözünme esnasında meydana gelen memberan lipt faz değişimleri, ozmatik ve mekanik stres gibi nedenler ortamda serbest oksijen radikallerinin (ROS) artışına yol açmaktadır. Boğa spermalarının dondurularak suni tohumlamada kullanılması yaklaşık son 50 yılı aşkın zamandan beri uygulanan bir teknoloji olmakla birlikte spermanın dondurulması esnasında uygulanan işlemler spermatozoanın motilite ve canlılık oranlarında düşümlere yol açmaktadır. Meydana gelen bu düşüş ise fertilizasyon kapasitesini olumsuz yönde etkilemekte ve dolayısıyla gebe kalma oranlarında azalmalara neden olmaktadır (Budworth ve ark., 1987; Shannon ve Vishwanath, 1995).

Taze spermanın dondurulmasından önce ve dondurulduktan sonra ortamda gelişen serbest oksijen radikalleri (ROS) dondurulmuş spermatozoada çok daha kolay reaksiyona girerek oksidatif strese neden olmaktadır (Trincherro ve ark., 1990). Oluşan bu lipit peroksidasyonu (LPO), donmuş spermanın çözdürüldükten

sonra defektif spermatozoon fonksiyonunun gelişmesinin nedeni olarak gösterilmektedir. Buradaki ROS'un oluşumunun temel nedeni; spermatozoon hücre membranlarının yapısının doymamış yağ asitlerince zenginliği ve yüksek oksijen varlığı oksidatif stresin en önemli hazırlayıcı nedenleri olduğu bildirilmektedir (Salamon ve Maxwell, 1995; Grgveau ve Le Lanneu, 1997).

Spermanın dondurulmadan önce ve dondurulduktan sonra ortamda şekillenen başlıca ROS ürünleri; süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidroksi radikali ( $OH^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi serbest radikal ürünleridir. Spermada oluşan bu reaktif ürünlerin detoksifikasyonunda görevli glutatyon ve süperoksit dismutaz gibi endojen kaynaklı antioksidan maddeler bulunmaktadır. Ancak, endojen kaynaklı bu antioksidan maddelerin spermanın dondurulması ve çözündürülmesi işlemleri esnasında miktarı azalmakta, dolayısıyla spermatozoanın serbest radikallere karşı korunmasında yetersiz kalmaktadır. Bu endojen antioksidan maddelerin yetersizliği ve ROS'un ortamda artışı sonucu spermatozoanın morfolojik yapısında (membran, akrozom ve mitokondri) meydana gelen bozukluklara bağlı olarak spermatolojik parametreler etkilenmekte ve spermatozoonların fertilite kabiliyetleri azalmaktadır (Trincherro ve ark., 1990; Meister, 1994; Bilodeau ve ark., 2000).

Bununla birlikte, dondurulmuş spermanın fertilite oranının azalmasında diğer bir etken ise dondurulma esnasında kryoprotektan olarak kullanılan maddelerdir. Bu kryoprotektan maddeler kontraseptif etkileri olmaları nedeniyle spermatozoanların fertilite gücünde azalmalara neden olmaktadır. Bu nedenle sperma dilüsyon solüsyonlarına daha düşük miktarlarda katılması gerekmektedir. Bu durum ise antioksidan maddelerin bu solüsyonlara ilave edilmesiyle telafi edilebilmektedir (Hammerstedt ve Graham, 1992; Taylor, 2001).

Yapılan çalışmalarda, boğa spermasının dondurulmasında kullanılan dilüsyon solüsyonlarına ilave edilen sistein, karnitin, metiyonin, glutatyon (GSH), glutatyan disulfid (GSSG) gibi bazı antioksidan etkili maddelerin etkisi araştırılmış olup, çözüm sonrası spermatozoonların spermatolojik parametre oranları üzerine iyileştici bir etki yaptıkları bildirilmiştir (Bilodeau ve ark., 2001; Bucak ve ark., 2010).

Bununla birlikte, embriyonun da hücre membran yapısı spermada olduğu gibi büyük oranda doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu durumda gerek *in vitro* kültür ortamlarında gerekse kültür öncesi manipulasyonları esnasında oosit ve embriyolar lipid peroksidasyonuna maruz kalmaktadırlar (Gasparrini ve ark., 2000).

Bazı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda embriyoların *in vitro* kültür sürecinde oluşan serbest radikal oranlar ile embriyo gelişiminin olumsuz etkilenmesi arasındaki ilişkinin önemli olduğunu bildirmektedirler (Nasr-Esfahani ve Johnson, 1992; Umaoka ve ark., 1992).

Oositlerin gerek maturasyonu gerekse fertilizasyonunun *in vitro* kültür ortamında gerçekleştirilmesi esnasında oluşan serbest radikaller (süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksi radikali) hücrede oksidatif hasara neden olarak hücrenin normal fonksiyonlarını etkilemektedir. Bu oksijen radikalleri özellikle hücre zarlarını aşarak nükleik asit, protein, lipid gibi yapıları etkileyerek mitokondride bozukluklara neden olurlar. Oluşan bu bozukluklar ise embriyonun normal gelişimini engelleyerek fertilizasyondan sonra embriyonik gelişimde bloklanmaya ve apoptozise neden olmaktadır (Johnson ve Nasr-Esfahani, 1994; Kehrer ve Lund, 1994).

*In vivo* şartlarda, embriyonun kendi yapısında ve yaşadığı dişi kanalında thiol bileşikleri (glutatyon, sistein, hipotaurine) ve enzimler (katalaz, süperoksit dismutaz) gibi ROS'un oluşturduğu hasara karşı koruyucu endojen kaynaklı antioksidan etkili maddeler bulunmaktadır. Bu antioksidan maddeler ortamda gelişen ROS'un zararlı etkilerini önleyerek embriyoyu korumaktadır. Fakat bu endojen kaynaklı antioksidanlar *in vitro* kültür esnasında yetersiz kalmakta ve endojen antioksidanlar dışında başka ekzojen antioksidan maddelerin ilave edilmesine gereksinim duyulmaktadır (Del Corso ve ark., 1994).

Yapılan bazı çalışmalarda, embriyo için glutatyon ve sisteinin önemli antioksidan etkili maddeler olduğu, özellikle hücre içi fonksiyonların devamının sağlanmasında ve ROS'un oluşturduğu zararlı etkilere karşı en önemli koruyucu

maddeler olduğu bildirilmektedir (Gardiner ve Reed, 1994; Lafleur ve ark., 1994; de Matos ve ark., 1997).

## **1.1. Serbest Oksijen Radikalleri**

Fotosentetik canlıların metabolizma faaliyetleri esnasında meydana gelen ve organik moleküllerin yapısındaki atomların şekillenmesinde görevli olan oksijen, tüm canlıların yaşam fonksiyonları için hayati öneme sahip bir elementtir (Yurdakul, 2007). Oksijen canlıların yaşam fonksiyonları için vazgeçilmez olmakla birlikte aerobik hücrelerin yaşam fonksiyonları sırasında diğer moleküller ile reaksiyona girebilen ve reaksiyona girdikleri moleküllerin yapılarını değiştiren ROS olarak adlandırılan moleküller oluştururlar. Bu moleküller hücrelerde oluşturdukları hasar sonucu doku ve organlarda fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Kehrer, 1993).

### **1.1.1. Önemli Serbest Oksijen Radikal Türleri**

Tüm aerobik hücrelerin solunum, fagositoz, arşidonik asit metabolizması ve diğer yaşam fonksiyonları esnasında oluşan bu moleküllerin başlıcaları; Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ), Hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ), Singlet Oksijen ( $^1O_2$ ) ve Nitrik Oksit ( $NO^{\cdot}$ )'dir (Altınışık, 2006).

### **1.1.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri (Oksidatif Stres)**

Vücutta savunma mekanizması olarak gelişen endojen antioksidanlar ile ROS ürünleri arasında bir denge vardır. Ancak endojen antioksidanların yetersiz kalması halinde dengenin serbest radikaller lehine kayması hali ise oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Oluşan bu oksidatif stres ise hücrelerde birçok yapısal bozukluklara neden olmaktadır (Kopani ve ark., 2006; Bilazer, 2006).

### **1.1.2.1. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri**

Serbest oksijen radikalleri DNA'da meydana getirdiği hasar ile mutasyona neden olmaktadır. Özellikle DNA bazlarında meydana gelen geri dönüşümsüz hasar sonucu hücrelerde bozukluk ve apoptozis görülebilmektedir (Holley, 1993; Rich, 2000; Moldovan ve Moldovan, 2004).

### **1.1.2.2. Proteinlere Etkileri**

Proteinler, yağ asitlerine göre serbest radikallerden daha düşük oranda etkilenirler. Yapılarında disülfit bağı içeren albümin ve immünoglobülin G (IgG) gibi proteinler daha fazla etkilenen proteinlerdir (Khan ve Ali, 2006).

### **1.1.2.3. Karbonhidratlara Etkileri**

Serbest radikaller peroksit, hidrojen peroksit ve okzoaldehit gibi ürünler ile karbonhidratlar üzerinde meydana getirdikleri etkiler ile bozukluk oluşmasına neden olurlar (Halliwell ve Gutteridge, 1996). Diyabet, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, romatoit artrit, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (Altınışık, 2006).

### **1.1.2.4. Lipitlere Etkileri**

Hücre zarlarının yapısının lipit ve proteinlerden oluşması sebebiyle, ROS ürünlerinin lipit ve proteinlerde meydana getirdikleri hasara bağlı olarak zar geçirgenliği geri dönüşümsüz olarak bozulur. Zarlarda meydana gelen bu bozukluklar ise normal hücresel fonksiyonların gerçekleşmesini engelleyerek doku ve organlarda işlevsel bozukluklara neden olur (Gutteridge, 1995).

### **1.1.3. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Sistemleri**

Canlıda oluşan serbest radikallerin oluşumunu engelleyen veya protein, DNA, lipit, karbonhidrat, enzim ve diğer moleküllere bağlanarak ROS'un oluşturacağı zararlı etkileri önleyen veya geciktirebilen maddeler antioksidan olarak adlandırılmaktadır. Antioksidan etkili olan bu maddeler etkilerini toplayıcı, bastırıcı, zincir kırıcı ve onarıcı etki olmak üzere 4 ayrı mekanizma ile gösterirler (Burton ve ark., 1985; Garrett ve ark., 1990; Karihtala ve Soini, 2007; Cherubini, 2008).

#### **1.1.3.1. Antioksidan Kaynakların Sınıflandırılması**

Hücrelerde serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engelleyen veya oluşturduğu zararlı etkileri ortadan kaldıran antioksidan maddeler kaynaklarına göre endojen ve ekzojen olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır.

##### **1.1.3.1.1. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar**

Endojen antioksidanlar yapılarından dolayı enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere 2 grupta değerlendirilmektedir. Enzim olan antioksidanlar Glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve redüktaz (GSH-R), glutatyon S-transferaz (GST), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), hidroperoksidaz ve mitokondriyal sitokrom oksidaz gibi maddelerdir. Enzim olmayanlar ise seruloplazmin, melatonin, transferrin, ferritin, miyoglobin, hemoglobin, bilirubin, glutatyon, metiyonin, sistein, laktoferrin, albümin ve urat gibi antioksidan etkili maddelerdir (Valko ve ark., 2007).

##### **1.1.3.1.2. Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar**

Ekzojen kaynaklı olan antioksidan etkili maddeler; ilaçlar (lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar, vitamin E analogu,

barbitüratlar), vitaminler (vitamin E,  $\beta$ -karoten, vitamin C) ve gıdaların içeriğinde bulunanlar olmak üzere 3 grupta sınıflandırılmaktadır (Altınışik, 2006; Cemeli ve ark., 2009).

### **1.1.3.2. Bazı Önemli Antioksidanlar ve Etkileri**

#### **1.1.3.2.1. Süperoksit Dismutaz**

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayan antioksidan etkili bir enzimdir (Rodriguez ve ark., 2004).

#### **1.1.3.2.2. Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon Redüktaz**

Lipit hidroperoksit (LOOH) ile hidrojen peroksitleri metabolize etmekle etkili olan bir antioksidan enzimdir. Eritrositlerde serbest radikaller üzerine en etkili antioksidanlardan birisidir (Reiter ve ark., 1995).

#### **1.1.3.2.3. Glutasyon S-Transferaz**

Sitozolde bulunarak yabancı maddelerin biyotransformasyonunda görev yapmakla birlikte çeşitli maddelerin glutasyon ile konjugasyonunda katalizör olarak etkili olmaktadır (Reiter ve ark.,1995).

#### **1.1.3.2.4. Katalaz**

Katalaz hidrojen peroksiti parçalayarak su ve oksijene dönüştürerek hidrojen peroksitin zararlı etkisini önleyerek etkili olmaktadır (Rodriguez ve ark., 2004).

#### **1.1.3.2.5. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz**

Solunum zincirinin son enzimi olup, bu reaksiyon esnasında oluşan süperoksitin etkisini ortadan kaldırarak etkinliğini gösterir. Yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanarak enerji üretimi sağlanan bu reaksiyon normal fizyolojik bir olaydır (Altınışık, 2006).

#### **1.1.3.2.6. Glutatyon**

Hücrelerde oksidatif hasarın korunmasında en güçlü oksidan etkili maddedir. Birincil olarak karaciğer olmakla birlikte birçok organda sistein, glutamat, ve glisinden sentezlenmektedir (Ross, 1988; Reiter ve ark.,1995).

#### **1.1.3.2.7. Vitamin E**

Vitamin E, lipit peroksidasyonunda zincir kırıcı etki mekanizması ile lipit peroksidasyonu önleyerek etkili olmaktadır (González-Pérez ve ark., 2008).

#### **1.1.3.2.8. Vitamin C**

Vitamin C (askorbik asit) HO, O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve singlet oksijen ile reaksiyona girerek bu maddeleri etkisiz duruma getirir. Suda çözünebilen en etkili antioksidan maddedir. Bununla birlikte düşük konsantrasyonlarda oksidan özellik de gösterebilmektedir (Silalahi, 2002).

### **1.2. Eritropoietin**

Eritropoietin (EPO), eritroit progenitör (olgunlaşmamış hücreler) hücrelerin spesifik hücre yüzeyi reseptörü ile bağlanarak eritrosit üretimini düzenleyen

glikoprotein yapısında yerel bir hormondur. Hematopoietin olarak da adlandırılır. Birincil olarak böbrekler tarafından salgılanan EPO'nun karaciğer, makrofajlar ve salgı bezleri ile birçok doku ve hücrede varlığı tespit edilmiştir. Ancak fizyolojik etkinlik bakımından en önemli üretim kaynakları böbrekler ve karaciğerdir. Eritropoietin böbreklerde kortikal peritubular hücreler tarafından üretilir ve eritrosit üretiminin kontrolünden sorumludur (Krantz, 1991; Maxwell ve ark., 1997).

### **1.2.1. Eritropoietinin Biyolojisi**

Eritropoietin 30.4 kDa ağırlığında bir glikoprotein ve insanlarda genomik DNA da 7. kromozomda bulunan 5.4 kb'lik bölgeden 193 amino asit içeren polipeptit zinciri şeklinde ifade edilir (Sasaki ve ark., 2000; Maiese ve ark., 2005). Öncül protein 27 N-terminal bölgesinde bölünen ve posttranslasyonel modifikasyonlar (protein biyosentezinin ilk aşamasından sonra oluşan kimyasal değişiklikler) sırasında C- terminal bölgeden arginin kaybıyla dolaşımında seyredilebilen 165 amino asitten oluşur ve olgun protein halini alır (Lappin, 2003).

Eritropoietin molekülü 7-161 ve 29-33. amino asitleri arasında disülfid bağları içerir, böylece molekülün yapısı korunarak biyoaktivite kaybının önüne geçilir. Sistein pozisyon 7 ve 161 arasında bulunan di-sülfid bağı işlevsel olarak daha önemlidir. Çünkü EPO reseptörüne (EPO-R) bağlanmayı sağlayan moleküler yapılanmayı içerir (Lappin, 2003).

Eritropoietinin %39' u karbonhidrat gruplarından oluşmakta olup, bunların 3'ü pozisyon 24, 38 ve 53'te N-bağlantılı şekerlerdir ve 1'i pozisyon 126 da bulunan O-bağlantılı şekerdir (Sasaki ve ark., 2000). Deglikolize EPO, biyolojik olarak aktif ancak çok kısa ömürlüdür (Dordal ve ark., 1985). Sializasyon (sialik asit gruplarının moleküle terminal monosakkarit olarak eklenmesi) EPO' in hepatik temizlenmesini yavaşlatır. Böylece kemik iliğindeki eritrosit progenitör hücreleri uyarması için dolaşımında kaldığı süre uzatılmış olur (Lappin, 2003).

Eritropoietin tersiyer yapısı 4 antiparalel  $\alpha$ -heliks yapısı tarafından oluşturulur. Tek bir EPO molekülü hedef hücre membranında bulunan 2 komşu EPO-R'ye bağlanır ve intrasellüler sinyali başlatır. Hücre yüzeyine sabitlenmesi ile eritrosit prekürsör (öncü madde)'lerinin hayatta kalma, proliferasyon ve differensiyasyonu içeren nükleer mesajlaşma sağlanır (Lappin, 2003). Aynı zamanda p66 olarak da bilinen EPO-R, sitokin reseptörü süper ailesine aittir ve bir ekstrasellüler domain, bir transmembran domain (üst âlem, biyolojik bilimsel sınıflandırmadaki en üst seviye canlı gruplandırması) ile bir intrasellüler domainden oluşur (Lacombe ve Mayeux, 1998; Mulcahy, 2001; Lappin, 2003).

Büyüme hormonu, prolaktin, trombopoetin, oncostatin M ve çeşitli interlökinleri (sitokinlerin bir grubu olan sinyal molekülleri) de içeren diğer hemopoietik büyüme faktörü reseptörleri gibi EPO-R reseptör sinyallerini etkinleştirmek üzere herhangi bir tirozin kinaz aktivitesine sahip değildir. Daha önce de belirtildiği gibi tek bir EPO molekülü hücre yüzeyinde bulunan 2 komşu reseptöre bağlanır. EPO-R dimerizasyonu (aynı polinükleotit iplikçik üzerinde yan yana bulunan pirimidin bazları arasında özel bağların kurulması) transfosforilasyon yoluyla bir reseptör ilişkili tirozin kinazı veya Jak2 (Janus Kinaz 2)'yi aktive eder. EPO-R'nin intrasellüler kısmındaki özel tirozinler fosforile edilmiştir ve çeşitli kaskadlar (reaksiyonlardan birinin ürünlerinin gelecek reaksiyonlarda yakıldığı kimyasal reaksiyonlar dizisi)'da sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü olarak görev yapan STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) proteinini de içeren çeşitli proteinler için bağlanma bölgeleri olarak görev yapar. STAT5 bir kere aktive olduktan sonra, hedef genin promotor bölgesindeki belirli bir baz dizisini tanıyacağı nükleusa transloke edilir ve eritrosit genlerin transkripsiyonunu başlatır. Daha sonra fosfatazlar Jak2'yi defosforile eder ve reseptör down regülasyonu (hücre yüzeyi reseptörlerinin azalması) gerçekleşir (Yoshimura ve Arai 1996; Lacombe ve Mayeux, 1999; Mulcahy, 2001; Rossert ve Eckardt, 2005).

### 1.2.2. Eritropoietinin Antioksidatif Etkileri

Çeşitli klinik raporlar EPO tedavisinin diyaliz hastalarında plazma oksidatif stresini azaltabileceğini bildirmektedir. Bu bulgular EPO'nun hücre hasarının en önemli nedenlerinden olan oksidatif stresi azaltarak hücreleri koruyabildiğini ortaya koymaktadır (Inal ve ark., 1999; Usberti ve ark., 2002; Mimic-Oka ve ark., 2002; Calo ve ark., 2003).

Eritropoietinin intrasellüler oksidatif durum üzerine doğrudan etkisi böbrek endotelial hücre kültüründe incelenmiştir. Bu çalışmada EPO oksidatif stresi indirgemiş ve oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünü ise azaltmıştır. Bu bulgular EPO'nun oksidatif stres üzerine doğrudan anlamlı etkisi olduğunu göstermektedir. İlginç olarak, EPO'nun hem oksijenaz-1 (HO-1) ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı ve HO-1 inhibitörü ile Tin protoporfirin (SnPP)'in ise neredeyse tamamen EPO'nun antioksidatif etkisini bloke ettiği görülmüştür (Katavetin ve ark., 2007).

Bu bilgiler ışığında EPO'nun antioksidatif etkilerini ortaya çıkartmak için HO-1 upregulasyon (artırarak düzenleme) mekanizmasını kullandığı ortaya konmuştur. HO-1' in EPO tarafından upregülasyonu aynı zamanda *in vivo* olarak ratlarda da gösterdiği bildirilmektedir (Katavetin ve ark., 2007). Yapılan bazı çalışmalarda, EPO'nun doğrudan HO-1 ekspresyonunu teşvik ettiği ortaya konulmuştur. Eritropoietinin insan kemik iliği progenitor hücre kültüründe hem oksijenaz aktiviteyi indüklediği (Abraham ve ark., 1989) aynı zamanda astrositlerde HO-1 ekspresyonu indükleyerek sitoprotektif etki sağladığı ortaya konulmuştur (Diaz ve ark., 2005) Ayrıca, hemodiyaliz hastalarında EPO tedavisi plazma antioksidan etkisine ek olarak monosit HO-1 mRNA ekspresyonunu arttırmıştır (Calo ve ark., 2003).

Hem oksijenaz-1'in güçlü antioksidatif ve antiapoptotik etkileri olduğu kanıtlanmıştır. HO-1 biliverdin redüktazın biliverdini bilirubine metabolize etmeleri ve hem yıkılmasında esnasında karbon monoksit ve serbest demir üretiminin artışında hız kısıtlayıcı olarak görev yaparlar. HO-1'in antioksidatif etkilerini hem

proteinlerinin yıkımlanması sonucu oluşan ve hemin metabolitleri olan biliverdin ve bilirubinden kaynaklanmaktadır (Platt ve Nath, 1998; Abraham ve Kappas, 2005; Deshane ve ark., 2005).

Son çalışmalarda, HO-1'in kısmen fosfatidilinositol 3-kinaz/akt yoluyla regüle edildiği gösterilmiştir. Fosfatidilinositol 3-kinaz/akt yolu ise EPO tarafından stimüle edilen çeşitli hücre içi sinyallerden biridir (Salinas ve ark., 2004; Lee ve ark., 2004). Bu bulgu EPO' in fosfatidilinositol 3-kinaz/akt yolu ile HO-1 ekspresyonunu doğrudan indükleyebildiğini göstermektedir. EPO ve HO-1 arasındaki doğrudan bağlantıların açığa çıkarılması için ileri çalışmaların yapılması gerektiği bildirilmektedir (Calo ve ark., 2006).

Hem oksijenaz-1 indüksiyonunun yanı sıra, EPO SOD, CAT ve GSHP<sub>x</sub> gibi antioksidatif enzimlerin indüksiyonu ile antioksidatif etkiler gösterebilir. Fare astroglial hücre kültürü ve deney hayvanları beyin dokusunda EPO'nun GSHP<sub>x</sub> aktivitesini attırdığı belirlenmiştir. EPO'nun doğrudan antioksidatif etkilerini açığa çıkartmak için ek çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (Genç ve ark., 2002; Kumral ve ark., 2005).

### **1.2.3. Eritropoietinin Dolaylı Antioksidatif Etkileri**

Yapılan çalışmalar EPO'nun en az 2 dolaylı antioksidatif etkisi olduğunu belirtmektedir (Bailey ve ark., 2006). Bu etkiler EPO'in eritroid progenitör hücreler üzerindeki etkileri vasıtasıyla oluşturmaktadırlar.

Bunların ilki, EPO'nun vücuttaki serbest demiri tüketerek dolaylı olarak antioksidatif etki sağlayabilmesidir. Demir, özellikle son derece reaktif hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olan Fanton Reaksiyonu için önemli bir katalizördür. Bu nedenle, serbest vücut demirinin tüketilmesi yüksek ölçüde reaktif radikallerin üretimini sınırlayabilmektedir. EPO tedavisi ile demir miktarının azaltılması kırmızı kan hücresi üretimini arttırmaktadır. Bu durumda daha sonra demir bağımlı oksidatif

hasarın iyileştirilmesine yardımcı olmaktadır. Prematüre tavşanlarla yapılan deneysel bir çalışma, EPO tedavisinin plazma demir oranının azalmasına ve plazma ile bronko alveolar lavaj sıvısının antioksidatif kapasitesinde artışa neden olduğu bildirilmektedir (Bany-Mohammed ve ark., 1996).

EPO tedavisi uygulanan yeni doğmuş bebeklerde serum ferritin düzeyinin azalmasına, serum lipit peroksidasyonu azalması eşlik etmektedir. Bu çalışmada EPO tedavisinin eritrosit faaliyetlerini ve eritrosit antioksidatif enzim aktivitesini (süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz) değiştirmediği belirtilmektedir. EPO'nun görülen bu antioksidatif etkileri, demir tüketilmesine aracılık etmesiyle açıklanabilmektedir (Akisu ve ark., 2001).

İkinci olarak; EPO, dolaşımdaki genç kırmızı kan hücrelerinin sayısını artırarak hücrel oksidatif stresi azaltabilmektedir. Genç kırmızı kan hücrelerinin antioksidan enzim miktarları önemli ölçüde yüksektir (Mimic-Oka ve ark., 2002). Olgun kırmızı kan hücrelerinin protein sentezinin düşük olması, buna karşın EPO tarafından üretilen genç kırmızı kan hücrelerinin antioksidan enzimlerinin salınımı daha yüksektir. Bu enzimleri yüksek seviyede içeren genç eritrositlerin dolaşımda artmasında dolaylı olarak dolaşımdaki antioksidan etkinliğin artışına neden olabilmektedir (Canestrari ve ark., 1995; Inal ve ark.,1999; Mimic-Oka ve ark., 2002).

*In vitro* fare böbrek tubul epitel hücre kültürlerinde yüksek glikoza maruz bırakılarak oluşturulmuş oksidatif stres ve apoptozise karşı koruyucu amaçla katılan eritropoietinin deneysel oksidatif stresi ve apoptozisi engellediği bildirilmektedir (Dang ve ark., 2010). Wistar ratlarda deneysel amaçlı olarak streptozotosin (55 mg/kg) verilerek oluşturulmuş diyabet hastalığında, organlarda ve retinada oksidatif strese bağlı olarak gelişen damarlardaki bozuklukların EPO ile iyileştiği görülmüştür (Wang ve ark., 2010). Farelerde yapılan başka bir deneysel çalışmada ise beyinde oluşan oksidatif stres seviyesinin EPO tarafından azaltıldığı tespit edilmiştir (Kumar ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada da köpek kalp kasında oluşan

hasarın neden olduğu etkinin EPO tarafından azaltıldığı ve iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir (Yada ve ark., 2010).

EPO'nun doğrudan ve dolaylı olarak antioksidatif etkilerine yönelik yapılan çalışmalarda bu etkilerin ortaya konulması ile ilgili destekleyici çalışmaların yapılması belirtilmekte (Calo ve ark., 2006). Ayrıca yapılan bilimsel kaynak taramalarında eritropoietinin sperma dilüsyon solüsyonları ile *in vitro* embriyo kültür medyumlarına ilave edilmesiyle ilgili bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda kullanılan antioksidan maddelerin bir kısmı pahalı veya az bulunabilmektedir. Bu ise alternatif maddeler için yeni çalışmaları gerektirmektedir.

Bu çalışmada *in vitro* embriyo kültür medyumuna (CR1aa) ve sperma dilüsyon solüsyonlarına eritropoietinin farklı dozları ilave edilerek çözüm sonu sperma fonksiyonları ile embriyo gelişiminde ROS'un etkilerini elimine ve detoksifiye etkisi ve kullanılacak en uygun dozlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışma ile sperma dilüsyon solüsyonlarına ve Charles rosenkrans 1 aminoasit *in vitro* embriyo kültür medyumuna eritropoietinin farklı dozları ilave edilerek çözüm sonu sperma fonksiyonları ile embriyo gelişiminde ROS'un etkilerini elimine ve detoksifiye etkisi ve kullanılacak en uygun dozları belirlenmeye çalışıldı. Elde edilen veriler daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Hayvan Materyali

Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü Boğa Test Merkezi ve Suni Tohumlama Laboratuvarı'nda bulunan, yaşları 2-3 arasında değişen ve 2 yıl süredir rutin sperma üretiminde kullanılan 3 baş simental ırkı boğa kullanıldı. Boğaların beslenmesi, aynı Enstitünün Yemler ve Hayvan Besleme Laboratuvarı'nın hazırladığı rasyon (suni tohumlama boğaların beslenmesi) ile yapıldı.

#### 2.1.2. Oosit Kaynağı

Ankara İli Çubuk İlçesi'nde ve Kırıkkale İli'de bulunan çevre mezbahalarda kesilen dişi hayvanlardan toplanan ovaryumlar oosit kaynağını oluşturdu.

#### 2.1.3. Kimyasal Maddeler

- Tris; sperma dilüsyon solüsyonu
- TCM-199 (Tissue Culture Medyum ); maturasyon medyum
- BO (Brackett Oliphant ); sperm yıkama ve dilüsyon solüsyonu
- CR1aa (Charles Rosencrans ); kültür medyum
- Rat Recombinat Erythropoietin; SIGMA E 8905 USA
- EPREX (Epotin alfa); Eritropoietin
- OxisResearch<sup>TM</sup>, Bioxytech; LPO analiz kiti
- OxisResearch<sup>R</sup>, Bioxytech; glutasyon analiz kiti
- SIGMA Antioxidant Assay Kit; AOP analiz kiti

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Spermanın Alınması, Dondurulması ve Çözüm Sonrası Muayeneleri

#### 2.2.1.1. Sperma Dilüsyon Solüsyonunun Hazırlanması

Çalışmanın ilk aşamasında dondurulacak spermaların elde edilmesi amacıyla Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Suni Tohumlama Laboratuvarı'nda rutin sperma üretiminde kullanılan 2 yaşlı 3 baş simental ırkı boğalar kullanıldı. Her bir boğadan suni vajen ile haftada iki kez olmak üzere iki hafta boyunca, toplamda 12 ejakülat (3 baş boğadan) alınarak çalışma gerçekleştirildi. Alınan ejakülatların yapılan natif muayenelerinde dondurulması için uygun özelliklere (spermatozoon yoğunluğu  $\geq 600 \times 10^6$  spermatozoa/ml; motilite  $\geq 80$ ) sahip olanları kullanıldı. Uygun motilite ve yoğunluktaki spermalar Tris bazlı dilüsyon solüsyonu ile sulandırıldı. Kullanılan solüsyon aşağıda Çizelge 2.1.'de verilen formülasyona göre hazırlandı.

Çizelge 2.1. Sperma dilüsyon solüsyonu içeriği

Kimyasal	Miktarı
Tris (Hidroksimetilaminometan)	297,58 mM
Sitrik asit	96,32 mM
Fruktoz	82,66 mM
Gentamisin	0,1ml/100 ml

Çizelge 2.1.'deki formüle göre tartılan dilüsyon solüsyonu bileşenleri çalışmanın tümünde yetecek miktarda deiyonize (18.2  $\Omega$ ) suda çözündürülerek +4 °C'de saklandı (Tris stok sıvısı). Sperma alınacağı gün Tris stok sıvısına % 20 oranında taze yumurta sarısı ve % 5 oranında gliserol ilave edilerek kullanıldı (Evans ve Maxwell, 1987).

### 2.2.1.2. Spermaların Alınması, Dilüsyonu ve Dondurulması

Her bir boğadan alınan ejakülat 7 eşit hacme bölünerek aşağıda eritropoietin (Epotin alfa EPREX® janssen)'in farklı dozları ilave edilerek oluşturulmuş 6 deneme (Dang ve ark., 2010) ve eritropoietin ilave edilmemiş (antioksidansız) kontrol gruplarıyla sulandırılarak çalışma gerçekleştirildi.

- 1- Kontrol: Tris dilüsyon solüsyonu
- 2- Deneme I: Tris dilüsyon solüsyonu + 6.25 IU eritropoietin /ml.
- 3- Deneme II: Tris dilüsyon solüsyonu + 12.5 IU eritropoietin /ml.
- 4- Deneme III: Tris dilüsyon solüsyonu + 25 IU eritropoietin /ml.
- 5- Deneme IV: Tris dilüsyon solüsyonu + 50 IU eritropoietin /ml.
- 6- Deneme V: Tris dilüsyon solüsyonu + 100 IU eritropoietin / ml.
- 7- Deneme VI: Tris dilüsyon solüsyonu + 200 IU eritropoietin /ml.

Her bir boğadan alınan spermaların natif muayenelerinden sonra uygun olanların yoğunlukları hesaplanarak payetlerin her birinde  $17,5 \times 10^5$  spermatozoon olacak şekilde yapıldı. Dilüsyon işlemi tek aşamalı yöntemle göre  $37^\circ\text{C}$ 'deki su banyosunda gerçekleştirildi. Dilüsyon işleminin ardından spermalar oda ısısında ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) 0.25 ml'lik payetlere çekildi.  $+5^\circ\text{C}$ 'deki dijital göstergeli soğuk kabine yerleştirildi. Isının 45 - 60 dk içerisinde  $+5^\circ\text{C}$ 'ye düşürülmesinden sonra numuneler yaklaşık 2 saat  $+5^\circ\text{C}$ 'de ekilibrasyon işlemine tabi tutuldu. Ekilibrasyon işleminin ardından 0,25 ml'lik suni tohumlama payetlerine otomatik olarak çekilerek 7 dk'da rutin üretimde kullanılan kontrollü sperma dondurma cihazında donduruldu. Ardından daha sonraki bir zamanda muayeneleri yapılmak üzere sıvı azot ( $-196^\circ\text{C}$ ) tankına nakledildi. Çalışma için gerekli olan bütün sperma alma ve dondurma işlemleri tamamlandıktan sonraki günlerde sıvı azotta saklanmış numuneler çözündürülerek spermatolojik muayeneleri ve biyokimyasal analizleri yapılarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.



**Resim 2.1.** Spermanın alınması ve dilüsyon solüsyonunun ilavesi.



**Resim 2.2.** Spermaların payetlere çekilmesi.



**Resim 2.3.** Spermaların 4 °C ekilibrasyon işlemi.



**Resim 2.4.** Spermaların sıvı azot içerisine nakli ve saklanması

### **2.2.1.3.Çözüm Sonrası Spermatolojik Muayeneler**

#### **2.2.1.3.1. Subjektif Motilite Muayenesi**

Subjektif (gözle yapılan) sperma motilite muayeneleri için ısıtma tablalı 20x büyütmesinde faz-kontras mikroskop sahasındaki en az 3 alan incelenerek muayeneleri gerçekleştirdi. Mikroskopik muayene bulguları % motilite oranı olarak belirlendi.

#### **2.2.1.3.2. Bilgisayarlı Sperma Analiz Cihazı (CASA) ile Motilite Muayenesi**

Çözüm sonu motilitelerinin ve hareket özelliklerinin değerlendirilmesinde bilgisayarlı sperma analiz cihazı (CASA), Sperm Class Analyzer (SCA® v.4.2, Barcelona, Spain)'ından yararlanıldı. Hareket özellik değerlerinin tespit edilmesinde hız ayarları statik, yavaş > 20 µm/s, orta > 50 µm/s, hızlı > 80 µm/s şeklinde ayarlandı. Her bir payetten 5 µl alınan örnek lam üzerine damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatıldı. x100'lük büyütmede faz-kontrast mikroskopunda ve sisteme adapte edilmiş 60 framelik kamera (Basler®) ile her bir sperma örneği için en az 200 en fazla 350 adet spermatozoonun 7 farklı alanda analizleri yapıldı. Gerçekleştirilen bu analiz ile spermatozoa progresif motilitesi %, total motilitesi %, VSL (velocity speed linear) µm/s, VCL (velocity curvilinear) µm/s, LIN (linearity) % ve VAP (velocity average path) µm/s parametre değerleri elde edildi.

#### **2.2.1.3.3. Spermatozoa Canlılığı**

Spermatozoa canlılığının tespiti için SYBR-14/PI (SYBR-14/PI Molecular Probe: L 7011 Invitrogen, Carlsbad, CA) floresan boyaması uygulandı. SYBR-14 stok sıvısı için SYBR-14 1/10 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek, 10'ar µl'lik hacimler halinde 1 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve -20°C'ta saklandı. Propidyum iyot (PI) stok sıvısı ise şu şekilde hazırlandı: 1 mg

propidyum iyot, 1 ml fosfat bufer solüsyonu (PBS) içerisinde çözündürülerek 10'ar µl'lik hacimler halinde endorf tüplerine aktarıldı ve -20°C'de saklandı. Analiz için +37 °C'de çözündürülen 0,25 ml payet içerisindeki sulandırılmış sperma endorf tüpü içerisine alındı ve üzerine 300 µl PBS (SIGMA P4417) eklendi. Sulandırılmış spermanın 30 µl'si üzerine 6 µl'lik SYBR-14 stok sıvısı ve 2,5 µl PI stok sıvısı eklenerek +37 °C'deki su banyosunda 15 dk inkube edildi. İnkubasyonun ardından üzerine 10 µl Hancock sıvısı eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Ardından boyanmış sperma numunesinden 5 µl lam üzerine alınarak üzeri lamel ile kapatılarak değerlendirildi. İşlem floresan mikroskopta (Leica DM 3000 Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße, Wetzlar, Germany) x40 gerçekleştirildi. Spermatozoon membranı sağlam (canlı) olanların baş kısmı açık yeşil boya, membranı hasarlı (ölü) olanların baş kısmı ise kırmızı boya alan spermatozoonları gösterdi. Bu amaçla yapılan sınıflandırma Resim 3.1'de görülmektedir.

#### **2.2.1.3.4. Spermatozoa Akrozom Bütünlüğü**

Akrozom değerlendirmesi için, Floresin izosiyanat (FITC-PNA)/PI floresan boyaması uygulandı. Bunun için, FITC-PNA stok sıvısı hazırlandı: 120 µg FITC-PNA (Invitrogen S7580) boyası 1 ml PBS içerisinde çözündürüldü ve sonrasında 100 µl'lik hacimlerde endorf tüplere kullanılmak üzere aktarıldı ve -20°C'de saklandı. Analiz için +37 °C'de çözündürülen 0,25 ml payet içerisindeki sulandırılmış sperma endorf içerisine alındı ve üzerine 300 µl PBS eklendi Sulandırılmış spermanın 60 µl'si üzerine 10 µl'lik FITC-PNA stok sıvısı ve 2,5 µl PI stok sıvısı eklenerek +37 °C'deki su banyosunda 15 dk inkube edildi. İnkubasyonun ardından 10 µl Hancock sıvısı eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Ardından boyanmış sperma numunesinden 5 µl lam üzerine alınarak üzeri lamel ile kapatılarak değerlendirildi. Spermatozoonların akrozomal yapıları floresan mikroskopta 450-490 nm dalga boyunda en az 200 spermatozoon sayılarak değerlendirildi. Bu amaçla yapılan sınıflandırma Resim 3.3'de görülmektedir. Hasarlı akrozoma sahip olanlar yeşil, sağlam akrozoma sahip olanlar boya almayan spermatozoonları gösterdi (Başpınar ve ark., 2011).

### **2.2.1.3.5. Spermatozoa Mitokondriyal Aktivitesi**

Mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla, JC-1/PI floresan boyaması uygulandı. Boya çözeltisinin hazırlanması amacıyla 0.01 mg JC-1 [Mitochondrial Membrane Potential Probe (Invitrogen T3168)] 10 ml DMSO içerisinde çözdürülerek 50 µl'lik hacimler halinde ependorflara kullanılmak üzere aktarıldı ve -20°C'de saklandı. Analiz için +37 °C'de çözdürülen 0,25 ml payet içerisindeki sulandırılmış sperma ependorf içerisine alındı ve üzerine 300 µl PBS eklendi Sulandırılmış spermanın 300 µl'si üzerine 2,5 µl'lik JC-1/PI stok sıvısı ve 2,5 µl PI stok sıvısı eklenerek +37 °C'deki su banyosunda 15 dk inkube edildi. İnkubasyonun ardından süspansiyon üzerine 10 µl Hancock sıvısı eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Ardından boyanmış sperma numunesinden 5 µl lam üzerine damlatıldı. Üzeri lamel ile kapatılarak değerlendirildi. Bu amaçla yapılan sınıflandırma Resim 3.2'de görülmektedir. Gövdenin turuncu ve yeşil olması mitokondriyal aktivitenin varlığını, gövdenin mat olması ise mitokondriyal aktivitenin olmadığını belirtmektedir (Başpınar ve ark., 2011).

### **2.2.1.4. Çözüm Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri**

#### **2.2.1.4.1. Sperma Numunelerinin Hazırlanması**

Sulandırılmış spermatozoon hücreleri +4 °C'de 800 devirde 15 dk süre ile santrifüj edilerek ayrıldı, dibe çöken hücrelere PBS ilave edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırmak suretiyle işlem 3 kez tekrarlandı. Santrifüj işleminin ardından PBS ilave edilerek 0,5 ml'ye tamamlandı ve hücrelerin parçalanması amacıyla 10 sn süreli sonikasyon işlemine tabi tutuldu (Bandelin Sonopuls, Bandelin Electronic Heinrichstra Be, D-12207, Geräte-Typ:UW 2070, Pro-Nr. 51900037369.004, Berlin) Bu işlemler 30 saniye buz içerisinde bekletilerek beş tekrar şeklinde uygulandı. Lipit peroksidasyon analizi için gerekli olan 120 µl homojenat üzerine 10 µl 0,5 mM bütül hidroksi toluen (BHT) eklendi, 50 µL ise tGSH analizi yapılmasında kullanıldı.

Homojenatın geri kalanı ise 1200 devirde +4°C'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatantlar ayrıldı. Tüm örnekler analizler yapılma kadar -86°C'de muhafaza edildi (Başpınar ve ark., 2011).

#### **2.2.1.4.2. Lipit peroksidasyon Düzeyi Analizi**

Bu analiz için LPO-586™ Oxis Research (OxisResearch™, Bioxytech, USA) ticari kiti kullanıldı. Ölçümler bu kit ile spektrofotometrik olarak (UV 2100 UV-VIS Recording Spectrophotometer Shimadzu, Japonya) yapıldı. Bu analiz yönteminde 45°C'de N-methyl-2-phenylindole isimli maddenin MDA ve 4-hydroxyalkenals ile reaksiyon esasına dayanılarak yapıldı. Elde edilen sonuçlar µmol (10<sup>9</sup> hücre/ml) olarak değerlendirildi (Başpınar ve ark., 2011).

#### **2.2.1.4.3. Glutasyon Düzeyi Analizi**

Redükte glutasyon düzeyleri ölçümü için GSH-420<sup>R</sup> Oxis Research kitinden (OxisResearch<sup>R</sup>, Bioxytech, USA) yararlanıldı. Metot, kromoforik thion oluşumu temeline dayanmaktadır. Homojenat tamponlandı ve okside glutasyonu redükte duruma getirmek için tris (2-karboksietil) fosfin eklendi. Baz ilavesiyle pH'nın 13'ü geçmesine dayanılarak; GSH-tioetere spesifik β-eliminasyon, kromoforik tion bileşiği ortaya çıkartıldı. Toplam GSH düzeyi, spektrofotometri ile 420 nm' de ölçüldü ve bulgular 10<sup>9</sup> spermatozoa/ml için µmol olarak belirlendi (Başpınar ve ark., 2011).

#### **2.2.1.4.4. Total Antioksidan Kapasite Analizi**

Total Antioksidan Kapasite (AOP) ölçümü için SIGMA Antioxidant Assay Kit kullanıldı. Metot, numunede bulunan tüm antioksidanların kombine etkisiyle Cu<sup>+2</sup>'nin Cu<sup>+</sup>'ya redüksiyonu temeline dayanmaktadır. Kromojenik reagent olan Bathocuproine (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolin) 490 nm'de maksimum

absorbansa sahip olan  $\text{Cu}^+$  ile 2:1 oranında selektif kompleks oluşturmaktadır. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için ürik asit konsantrasyonunun standardı kullanıldı. Total antioksidan potansiyeli, spektrofotometri ile 490 nm’de ölçüldü ve bulgular  $10^9$  spermatozoa/ml için mmol olarak elde edildi (Başpınar ve ark., 2011).

## 2.2.2. *In vitro* Embriyoların Elde Edilmesi ve Değerlendirilmesi

### 2.2.2.1. *In vitro* Maturasyon Solüsyonunun Hazırlanması

Oositlerin maturasyonu amacıyla kullanılan TCM-199 medyumunu, içeriği Çizelge 2.2’de verildiği miktarlara göre hazırlandı. Daha sonra filtre (0.22 mikron, MILLIPORE, Carrigtwohill, Co. Cork, İreland) edildikten sonra 35 mm petrilere 100 mikrolitrelik damlalar hazırlanarak, üzerleri mineral yağ ile kapatıldı. Oositlerin maturasyona alınmasından 2 saat önce inkübatörde  $\text{CO}_2$  ile muamele edildi.

Çizelge 2.2. TCM-199 medyumunun içeriği

Kimyasal	Miktarı	Oranı
TCM-199 (Gibco/12340-030 BRL)	45 ml	
FCS (Fetal Calf Serum- SİGMA F9665)	5 ml	
FSH (SİGMA F8174)	5 $\mu\text{l}$	(2 $\mu\text{g}$ /ml)
Penisilin-streptomisin	50 $\mu\text{l}$	(100 IU) + (100 $\mu\text{g}$ /0.1 ml)

### 2.2.2.2. *In vitro* Fertilizasyon Solüsyonlarının Hazırlanması

Oositlerin fertilizasyonu amacıyla dondurulmuş/çözündürülmüş boğa spermatozoonlarının kriyoprotektan ve seminal plazmadan ayrılması, sulandırılması ve kapasitasyonu için modifiye Brackett Oliphant (BO) solüsyonu kullanıldı. BO solüsyonu uzun süre muhafaza edilemediği için öncelikle stok A Çizelge 2.3 ve stok B olarak Çizelge 2.4’de verilen miktarlara göre hazırlandı. Stok A ve stok B buzdolabında  $+4^\circ\text{C}$ ’de 1 ay boyunca muhafaza edilerek her çalışma için bu

stoklardan Çizelge 2.5’deki miktarlarda BO stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyondan da Çizelge 2.6’deki miktarlarda oosit yıkama solüsyonu (OYS), Çizelge 2.7’deki gibi sperm dilüsyon solüsyonu (SDS) ve Çizelge 2.8’deki gibi sperm yıkama solüsyonu (SYS) taze olarak hazırlanıp kullanıldı.

**Çizelge 2.3.** BO Stok A solüsyonun hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı	Oranı
NaCl	4,3092 gr	
KCl	0,1974 gr	
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,2171 gr	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,0840 gr	Yazılı miktarların 10 katı tartılarak 10 ml’ye tamamlanıp bundan 1 ml kullanıldı
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,0697 gr	
Fenol Kırmızısı	100 µl	%0,5 solüsyon

**Çizelge 2.4.** BO Stok B solüsyonun hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı	Oranı
NaHCO <sub>3</sub>	2,5873 gr	
Fenol kırmızısı	40 µl	%0,5 solüsyon

**Çizelge 2.5.** BO solüsyonunun hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı	Oranı
STOK-A	76 ml	
Na Pirüvat	0,01375 gr	
Antibiyotik	100 µl	100 IU/ml Penisilin. + 100 µg/ml Streptomisin
STOK-B	24 ml	

**Çizelge 2.6.** Oosit yıkama solüsyonunun hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
BO solüsyonu	40 ml
BSA (Bovine Serum Albümin)	0,40 gr

**Çizelge 2.7.** Sperm dilüsyon solüsyonunun hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
BO solüsyonu	10 ml
BSA (Bovine Serum Albümin)	0,20 gr

**Çizelge 2.8.** Sperm yıkama solüsyonu hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı	Oranı
BO solüsyonu	50 ml	
Kafein	0.1942 gr	
Heparin	50 µl	5000 U/ml

### 2.2.2.3. Charles Rosencrans 1 Aminoasit Kültür Medyumunun Hazırlanması

Fertilizasyon işlemine tabi tutulan oositlerin kültürü için Charles Rosencrans 1 aminoasit (CR1aa) kültür medyumunu kullanıldı. Kültür medyumunu yine Çizelge 2.9 stok A ve Çizelge 2.10'de verilen miktarlara göre stok B solüsyonları hazırlandı. Stok A stok ve B buzdolabında +4 °C de 1 ay boyunca muhafaza edilerek her çalışma için bu stoklardan Çizelge 2.11'deki gibi CR1aa kültür medyumunu hazırlanarak fertilizasyondan sonra oositlerin kültüre edilmesinde kullanıldı.

**Çizelge 2.9.** CR1aa Stok A solüsyonunun hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı	Oranı
Sonyum Klorür	3,3515 g	
Potasyum Klorür	0,1155 g	
Sodyum Piruvat	0,0220 g	
NaHCO <sub>3</sub>	1,1005 g	
Fenol Red	1 ml	%0,5 solüsyon
380 ml'ye tamamlandı		

**Çizelge 2.10.** CR1aa Stok B solüsyonunun hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
Hemikalsiyum laktat	0,2998 g
100 ml'ye tamamlandı	

**Çizelge 2.11.** CR1aa medyumunun hazırlanması.

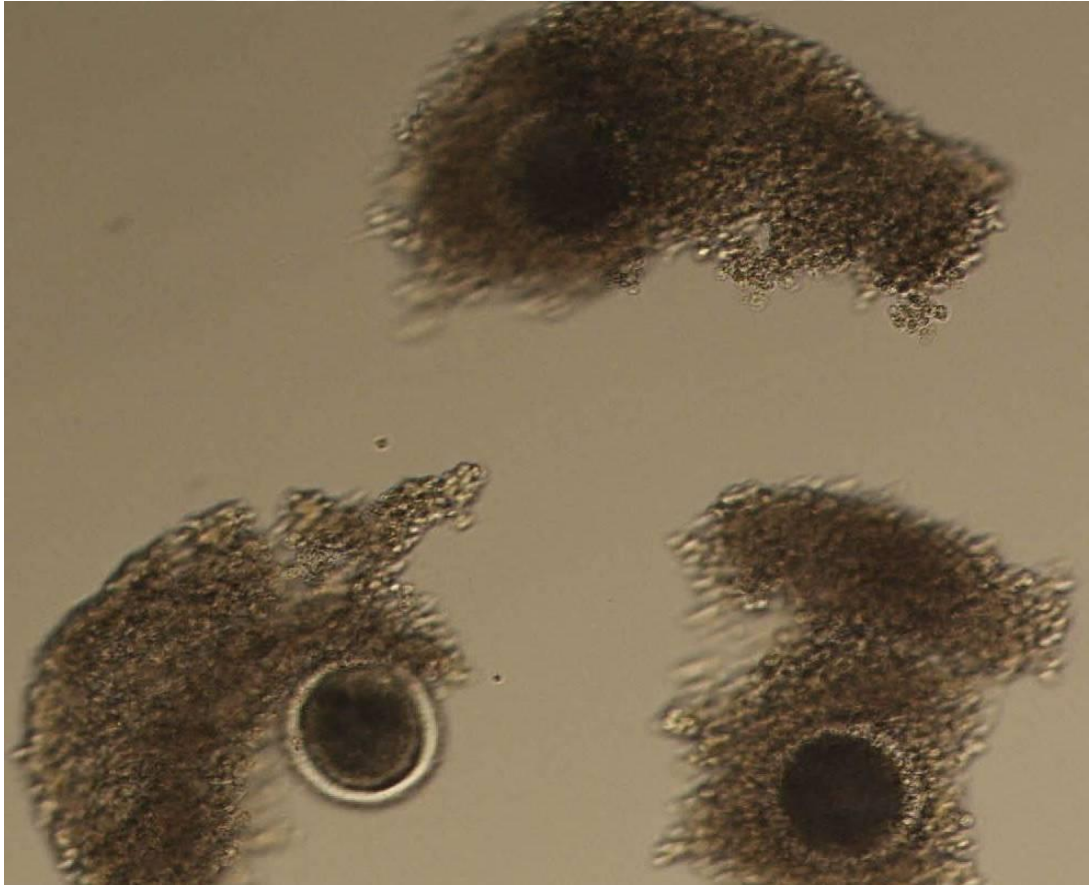
Kimyasal	Miktarı	Oranı
Stok A	57 ml	
Stok B	15 ml	
BME (Bete merkaptö etanol)	1,5 ml	
MEM (Non ecential amino acid)	0,75 ml	
L-Glutamin (SİGMA G8540)	0,75 ml	L-Glutamin 0,01 g tartılıp 5 ml'ye tamamlandı.
BSA (Bovine serum albümin)	0,225 g	
Antibiyotik		75 µl 100 IU/ml Penisilin + 100 µg/ml Strep.
Filtrasyondan sonra buzdolabında bir hafta muhafaza edildi.		
FCS (%5)	3,75 ml	
<b>Ozmolarite:</b> 270-280 mOsm, <b>pH:</b> 7,2-7,4		

#### 2.2.2.4. Oositlerin Aspirasyonu

*In vitro* embriyo elde edilmesi amacıyla bölgedeki mezbahalarda kesilen kültür ırkı ve melezlerine ait ineklerin ovaryumları kesimini takip eden 15-20 dk'lık süre içerisinde uygun taşıyıcı sıvı içerisinde ve termosta (30°C) 3 saat içerisinde laboratuvara getirildi (Hamano ve ark. 1992). Çapı 2-8 mm'lik büyüklüğe sahip folliküller normal enjektör ile Resim 2.6'daki gibi aspire edilen oositler (Resim 2.7) 90 mm petrilere toplandı (Schellander ve ark. 1990). Ardından çalışma için kullanılacak olan oositler kalite yönünden değerlendirildi (Brackett ve Zuelka 1993). A ve B kaliteye sahip olan oositler (A kalite: etrafında 2 ve daha fazla kumulus hücre katmanı bulunan, B kalite: etrafında 2 sıralı kumulus hücre katmanı bulunan oosit) *in vitro* embriyo üretim sürecine alındı.



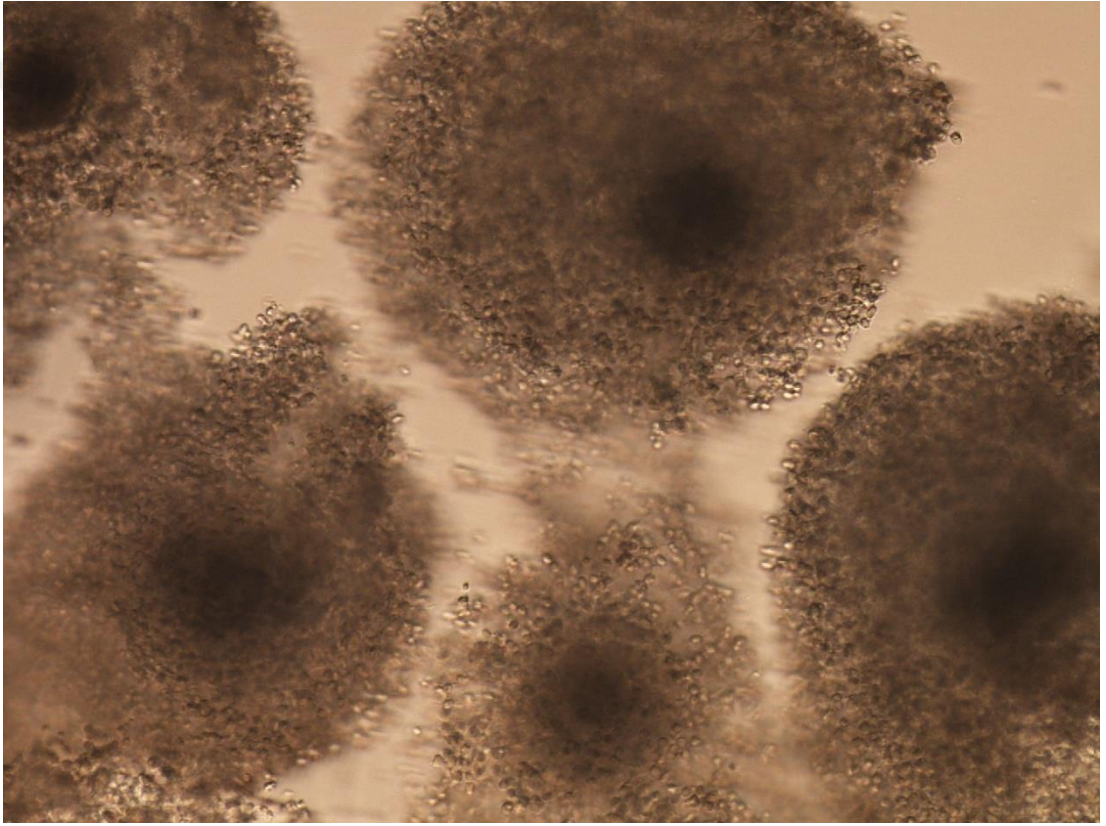
**Resim 2.6.** Ovaryumdan follikül aspirasyonu.



**Resim 2.7.** Aspire edilen oosit (20x büyütme).

### 2.2.2.5. Oositlerin Maturasyonu

Aspire edilen A ve B kalite oositlerin maturasyonunu gerçekleştirmek amacıyla 2 µg/ml FSH ve %10 FCS ilave edilmiş TCM-199 (12340-030/Gibco BRL) medyumunu kullanıldı. Maturasyon sürecine alınmış oositler 20-22 saat %95 bağlı nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 38,5 °C'deki karbondioksit inkubatorde inkübasyona bırakıldı (Takagi ve ark., 1992). % 90 ve üzeri kumulus ekspansiyonu gösteren oositler (Resim 2.8) mature olmuş olarak değerlendirilerek fertilizasyon sürecine alındı.



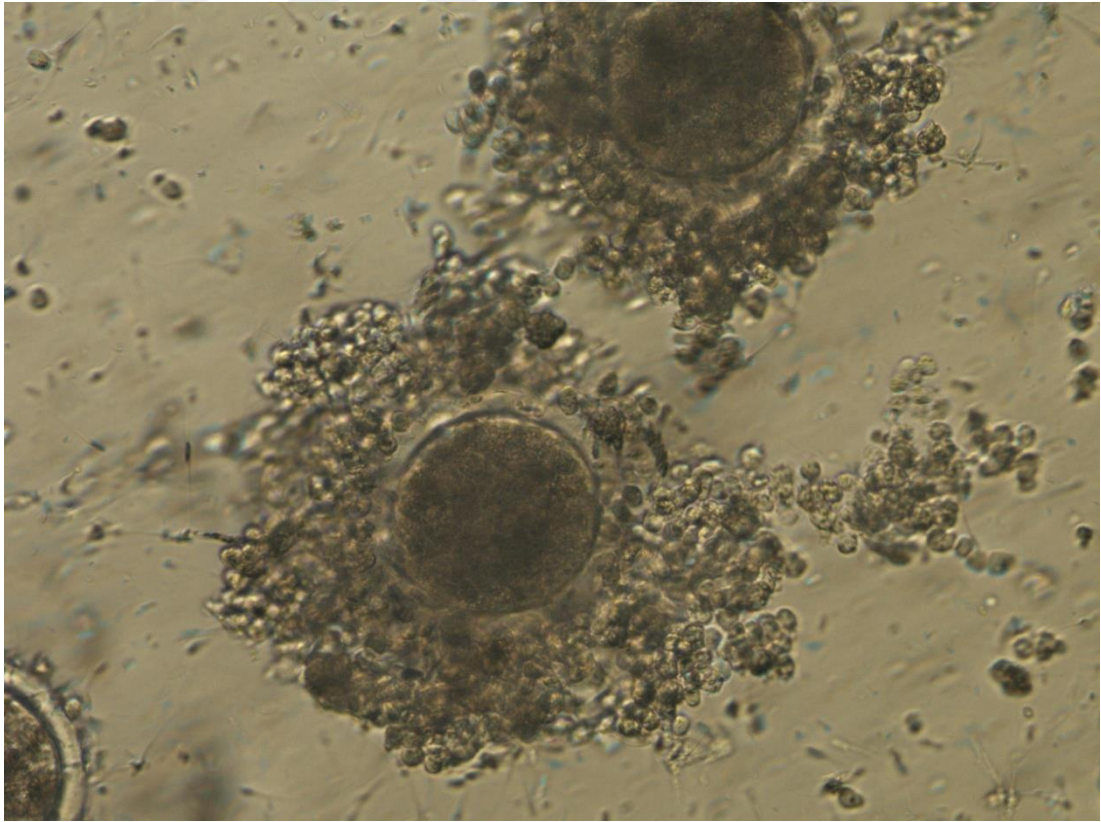
**Resim 2.8.** Oositlerin maturasyonu (20x büyütme).

### 2.2.2.6. Oositlerin Fertilizasyonu

Bu amaçla Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü Suni Tohumlama Laboratuvarı'nda üretilmiş olan, payet içerisinde  $17,5 \times 10^5$

spermatozoaya sahip 0,25 ml'lik suni tohumlama payetlerinde dondurulan boğa spermaları kullanıldı.

Spermatozoonların kriyoprotektanlar, seminal plazmadan ayrılması, sulandırılması ve kapasitasyonu için modifiye BO solüsyonlarından yararlanıldı. Kapasitasyon amacıyla 5 U/ml heparin ve 2 mM kafein kullanıldı. 37°C'deki su banyosunda çözdürülen spermalar (5 payet) üzerine SYS ilave edildikten sonra 1800 devirde ve 5 dk santrifüj edildi. Ardından supernatant kısmı uzaklaştırılarak işlem 2 kez tekrarlandı. Spermatozoonların mikroskoptaki sayımlarının kolay yapılabilmesi için üzerine 1.2 ml SYS ilave edildi. Ardından thoma lamında sayım işlemleri yapılarak sedimentin içerisinde olması gereken spermatozoa miktarı belirlendi. SDS ile  $6.25 \times 10^6$  spermatozoa/ml olacak şekilde yapılan son sulandırma ile oluşturulacak fertilizasyon solüsyonlarında oositlerin 5-6 saat süreyle fertilizasyon işlemleri gerçekleştirildi (Kanagawa ve ark., 1995).



**Resim 2.9.** Oositlerin fertilizasyon görüntüsü (20x büyütme).

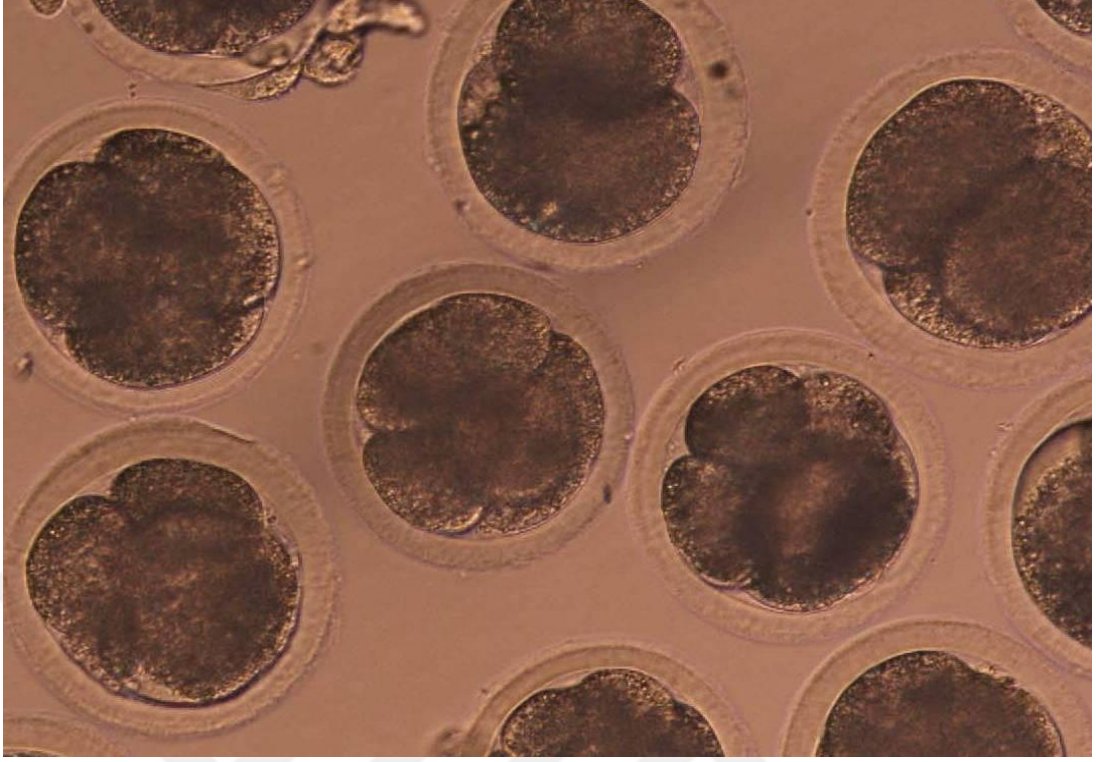
### 2.2.2.7. Oositlerin Kültür Periyoduna Alınması ve Değerlendirilmesi

5-6 saat fertilizasyon sürecinden sonra kumulus hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla dar pastör pipeti kullanıldı. Kumulusları uzaklaştırılan oositler eritropoietinin 3 farklı dozu ilave edilerek (0,125 µg, 0,25 µg, 0,5 µg /ml) oluşturulmuş çalışma grupları (Wang ve ark., 2004) ile bir de eritropoietin ilave edilmemiş (antioksidansız) kontrol olmak üzere aşağıdaki gibi 4 grup oluşturularak CR1aa kültür medyumuna alındı. Kültür ortamı olarak 38,5°C, %5 CO<sub>2</sub>, % 95 nem içeren inkubatörden yararlanıldı. Her bir 100 µl kültür drobunda en az 20 oosit kullanılarak çalışma gerçekleştirildi.

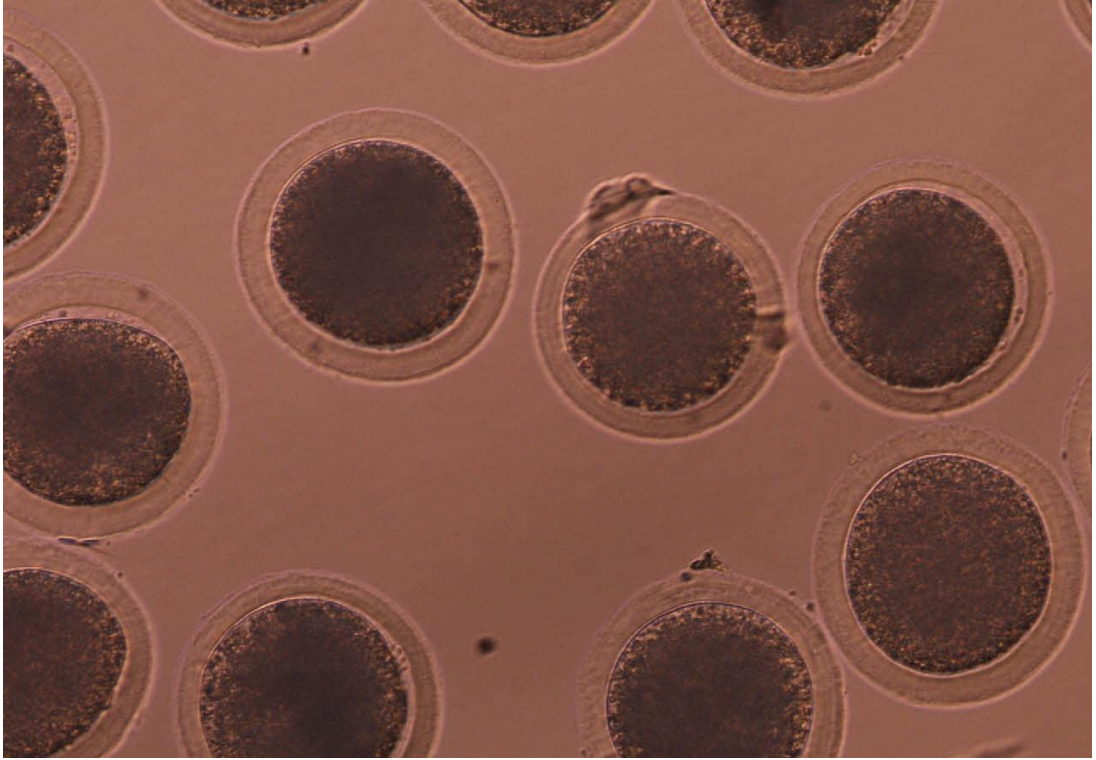
- 1- Kontrol: CR1aa
- 2- Deneme I: CR1aa + 0,125 µg eritropoietin /ml.
- 3- Deneme II: CR1aa + 0,25 µg eritropoietin /ml.
- 4- Deneme III: CR1aa + 0,5 µg eritropoietin /ml.

Kültüre alınan oositlerin 2. günü (48 saat) sonunda mikroskopta bölünme oranları (Resim 2.10 ve Resim 2.11) kontrol edildi. Elde edilen bulgular kayıt edilerek bölünen oosit sayılarına göre bölünme oranları tespit edildi.

İkinci gün bölünme kontrolü yapılan oositler tekrar inkübasyona alındı. Kültür sürecinin 7. gününde embriyo gelişimleri takip edilerek morula-blastosiste (Resim 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7) ulaşma oranları bakımından ve toplam embriyo sayıları stereo mikroskop (Olympus SZH10 Japonya) altında incelendi. Elde edilen embriyolar daha sonra total oksidan düzeyi ölçümleri yapılmak üzere -40°C'ye kaldırıldı.



**Resim 2.10.** Kültür ortamının 2. günü bölünen oosit (20x büyütme).



**Resim 2.11.** Kültür ortamının 2. günü bölünme gerçekleşmeyen oosit (20x büyütme).

### 2.2.2.8. Total Oksidan Düzeyi Analizi

Örneklerdeki mevcut oksidanlar, demir iyonları ile birleşerek demirli şelat bileşimler halinde bulunurlar. Bu demir iyonları asidik solüsyonlarda renkli yapılar oluştururlar. Bu renk oluşumları da spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Total oksidan düzeyi (TOS) analizi bu prensiple yapılmaktadır. Total oksidan düzeyi ölçümleri ticari spektrofotometrik kit (Total Oxidant Status Assay Kit, Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti. Gaziantep, Türkiye) kullanılarak Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü Hayvan Besleme Laboratuvarı'nda bulunan spektrofotometre cihazında (Perkin Elmer Lambda 25) belirlendi.

-40 °C'den çıkarılan embriyolar oda ısısında çözündürüldü. Embriyoların parçalanması işlemi dar pastör pipeti ile pipetleme yöntemiyle gerçekleştirildi. 1,2 mL'ye kadar distile su ilave edildi. 10 milimol Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren 0,2 molar 1,2 ml Fosfat tamponu ile karıştırıldı. Analiz için hazırlanan bu embriyo solüsyonundan 75 µl 1 ml'lik spektrofotometre küvetine konuldu. Üzerine kit içerisinde bulunan Reagent 1 (Assay Buffer) solüsyonundan 500 µL eklendi. Aynı şekilde kit içerisinde bulunan Standart 2 solüsyonunda 75 µL alınarak küvete konuldu ve üzerine 500 µl reagent 1 solüsyonu ilave edildi. Örnekler ve standart 530 nm'de okundu. Örneklerin ve standardın üzerine kit içerisinde bulunan 25 µl reagent 2 (Prochromogen solution) solüsyonundan ilave edilerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tekrar 530 nm'de okundu. Sonuçlar aşağıdaki formülle hesaplandı (Halliwell, Gutteridge 2000).

$$\text{Sonuç} = (\Delta \text{Absorbans Örnek} / \Delta \text{Absorbans Standart}) \times 20 \text{ Equiv/L}$$

$\Delta$  Absorbans Örnek: Örneğin, 530 nm de 2. absorbans değeri - 530 nm'de 1. absorbans değeri

$\Delta$  Absorbans Standart: Standardın, 530 nm de 2. absorbans değeri - 530 nm'de 1. absorbans değeri.

### 2.2.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizde, 7 farklı uygulamadan elde edilmiş spermatolojik parametrelerin veri ortalamaları kullanıldı. Farklı miktarlarda antioksidan dozu kullanılan deneme grubu ve antioksidan içermeyen dilüsyon solüsyonu grubu (kontrol) karşılaştırılmasında, aralarında anlamlı farklılık bulunan 2'den fazla grubu karşılaştırmak için çoklu karşılaştırma testlerinden One Way ANOVA ve Duncan Testi (SPSS 15.0) kullanıldı.

Embriyo gelişiminde ise, expanse oosit, 48. saat bölünen oosit, morula, blastosist ve toplam embriyo oranları bakımından gruplar arası karşılaştırmalarda Khi-kare; expanded blastosiste erişme oranları bakımından gruplar arası karşılaştırmalarda ise bazı gruplarda gözlem sayısının (frekasların) 5'ten az olması nedeniyle G (Likelihood Ratio Chi-Square) istatistiği uygulanmıştır (Düzgüneş ve ark., 1983) . Morula ve 48. saat bölünen oosit oranları bakımından gruplar arasındaki farklılık önemli ( $P < 0.05$ ) iken, diğer özellikler için gruplar arası farklılıklar istatistik olarak önemsiz bulunmuştur ( $P > 0,05$ ).

### 3. BULGULAR

Dondurma-çözdürme sonrası numunelerde spermatolojik parametreler üzerine eritropoietinin etkisi Çizelge 3.1'de verilmiştir. Progresif motilite oranı 6.25 IU eritropoietin /ml içeren dilüsyon solüsyonu grubunda ( $31.81 \pm 3.74$ ), 200 IU eritropoietin/ml içeren dilüsyon solüsyonu grubuna göre ( $22.26 \pm 2.01$ ) anlamlı ölçüde yüksek bulundu. Spermatozoon canlılığı üzerine, 6.25 IU eritropoietin/ml içeren dilüsyon solüsyonu grubu ( $63.33 \pm 2.58$ ), 12.5 IU eritropoietin /ml içeren dilüsyon solüsyonu grubuna ( $51.40 \pm 3.55$ ) göre anlamlı ölçüde yüksek sonuç verirken ( $P < 0.05$ ), kontrol grubuyla aralarındaki farklılıklar önemli bulunmadı. Bununla birlikte CASA motilite, subjektif motilite, akrozom bütünlüğü ve mitokondiyel aktivite oranları bakımından gruplar arası farklılıklar önemsiz bulundu ( $P > 0.05$ ).

Dondurma-çözdürme sonrası sperma numunelerinde spermatozoon hareket parametreleri (VCL, VSL, VAP, LIN) aşağıda Çizelge 3.2'de verildi. Eritropoietinin farklı dozlarını içeren (deneme grupları) ve eritropoietin içermeyen (kontrol) dilüsyon solüsyonu grupları arasındaki farklılıklar önemli bulunmadı ( $P > 0.05$ ).

Farklı dozlarda eritropoietin içeren ve içermeyen boğa spermalarında çözüm sonu biyokimyasal parametreleri (TGSH, AOP, LPO) Çizelge 3.3'te verildi. Buna göre gruplar arasında biyokimyasal parametreler açısından istatistiksel olarak farklılıklar önemsiz bulundu ( $P > 0.05$ ).

**Çizelge 3.1.** Boğa sperması çözüm sonu numunelerinde spermatolojik (CASA motilite, Subjektif motilite, Progresif motilite, SYBR/PI, FITCH/PI, JC-1/PI) parametreler

Gruplar	CASA Motilite (%)	Subjektif Motilite (%)	Progresif Motilit (%)	SYBR/PI (%)	FITCH (%)	JC-1 (%)
Kontrol	58,44±4,87	52,22±1,68	27,41±3,12 <sup>ab</sup>	59,95±3,49 <sup>ab</sup>	41,55±4,18	44,94±3,88
Deneme I 6,25 IU	64,35±5,33	50,71±1,70	31,81±3,74 <sup>b</sup>	63,33±2,58 <sup>b</sup>	36,49±1,75	38,01±1,78
Deneme II 12,5 IU	50,92±7,04	46,11±2,85	24,35±3,73 <sup>ab</sup>	51,40±3,55 <sup>a</sup>	39,51±1,69	41,30±0,43
Deneme III 25 IU	53,66±3,41	49,44±1,75	23,66±2,02 <sup>ab</sup>	56,68±2,84 <sup>ab</sup>	36,69±1,97	43,37±2,03
Deneme IV 50 IU	60,66±3,78	52,22±0,87	26,17±3,02 <sup>ab</sup>	58,50±2,67 <sup>ab</sup>	43,09±4,39	40,00±1,58
Deneme V 100 IU	58,50±3,72	50,00±1,44	30,66±2,56 <sup>ab</sup>	54,61±2,38 <sup>ab</sup>	44,60±4,38	47,02±3,34
Deneme VI 200 IU	49,34±4,79	46,11±2,46	22,26±2,01 <sup>a</sup>	54,17±3,60 <sup>ab</sup>	47,91±5,39	41,63±5,33
p	-	-	*	*	-	-

a, b: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir (\*P < 0.05)

-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

**Çizelge 3.2.** Boğa sperması çözüm sonu numunelerinde sperma hareketlerinin (VCL, VSL, VAP, LIN) ortalamaları

Gruplar	VCL (%)	VSL (%)	VAP (%)	LIN (%)
Kontrol	96,27±3,26	48,62±2,86	64,92±2,75	50,32±1,66
Deneme I 6,25 IU	95,28±2,62	53,61±2,88	67,75±2,04	56,50±3,45
Deneme II 12,5 IU	90,78±3,80	48,63±3,32	61,96±3,18	53,32±1,96
Deneme III 25 IU	94,93±1,99	47,77±2,56	63,75±2,30	50,14±1,93
Deneme IV 50 IU	94,05±1,70	46,62±2,41	62,23±2,05	49,38±1,91
Deneme V 100 IU	94,82±2,49	50,47±3,06	64,56±2,34	53,27±3,10
Deneme VI 200 IU	94,75±1,46	48,82±1,70	63,80±1,23	51,53±1,60
p	-	-	-	-

-: Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05).

**Çizelge 3.3.** Boğa sperması çözüm sonu numunelerinde biyokimyasal (TGSH, AOP, LPO) parametreler

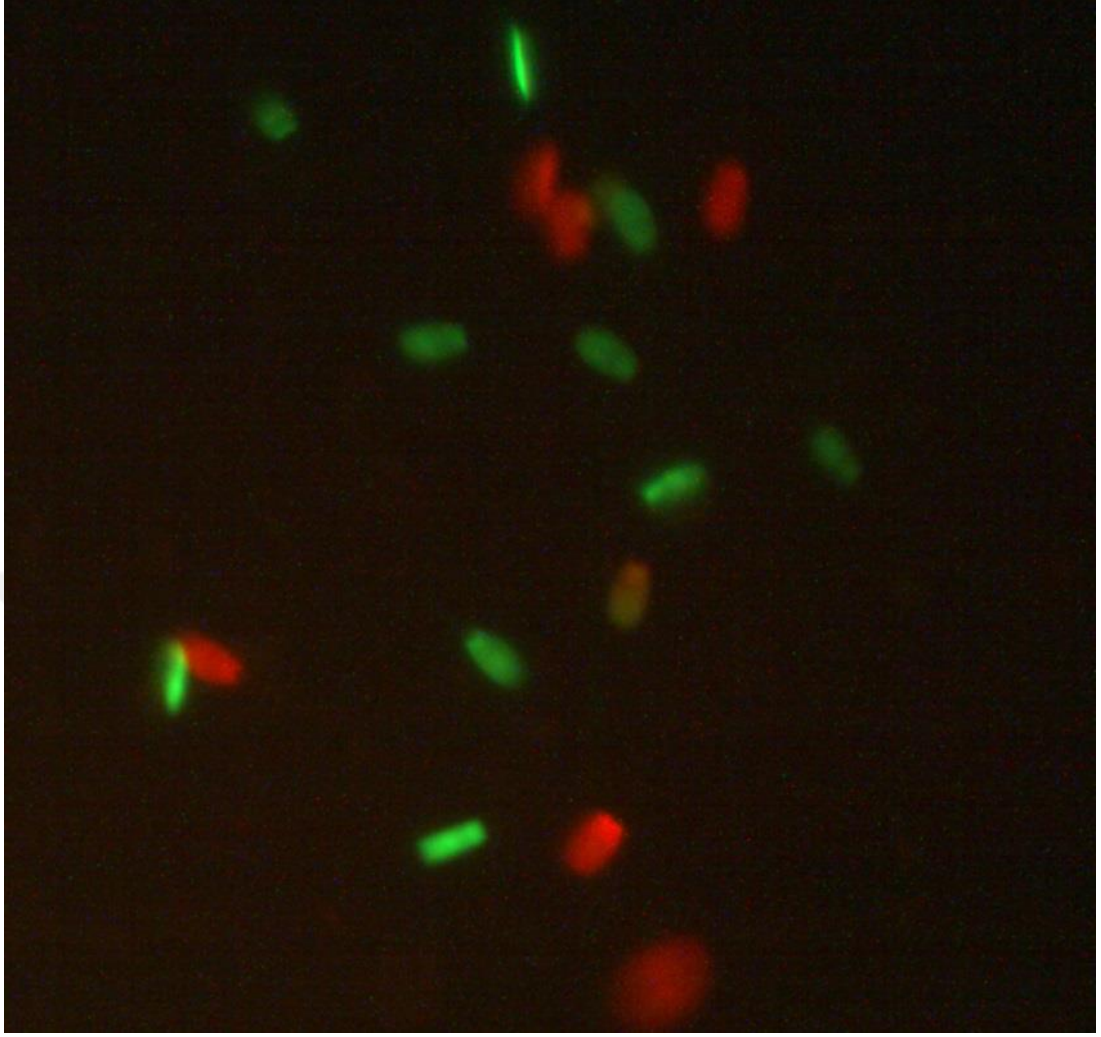
Gruplar	TGSH ( $\mu\text{m}/1 \times 10^9$ spz)	AOP (mM/ $1 \times 10^9$ spz)	LPO ( $\mu\text{m}/1 \times 10^9$ spz)
Kontrol	1781,6 $\pm$ 368	20,95 $\pm$ 1.50	116,26 $\pm$ 10.1
Deneme I 6,25 IU	2013,4 $\pm$ 604	18,51 $\pm$ 1.78	106,70 $\pm$ 6.9
Deneme II 12,5 IU	2266,2 $\pm$ 618	20,45 $\pm$ 1.45	102,93 $\pm$ 16.1
Deneme III 25 IU	1996,8 $\pm$ 676	19,97 $\pm$ 2.06	114,58 $\pm$ 11.8
Deneme IV 50 IU	1457,9 $\pm$ 345	21,75 $\pm$ 2.35	99,63 $\pm$ 12.7
Deneme V 100 IU	1948,3 $\pm$ 651	20,00 $\pm$ 1.69	116,95 $\pm$ 7.3
Deneme VI 200 IU	1991,0 $\pm$ 583	18,99 $\pm$ 2.33	97,37 $\pm$ 12.4
p	-	-	-

-. Gruplar arası farklılık önemli değildir ( $P > 0.05$ ).

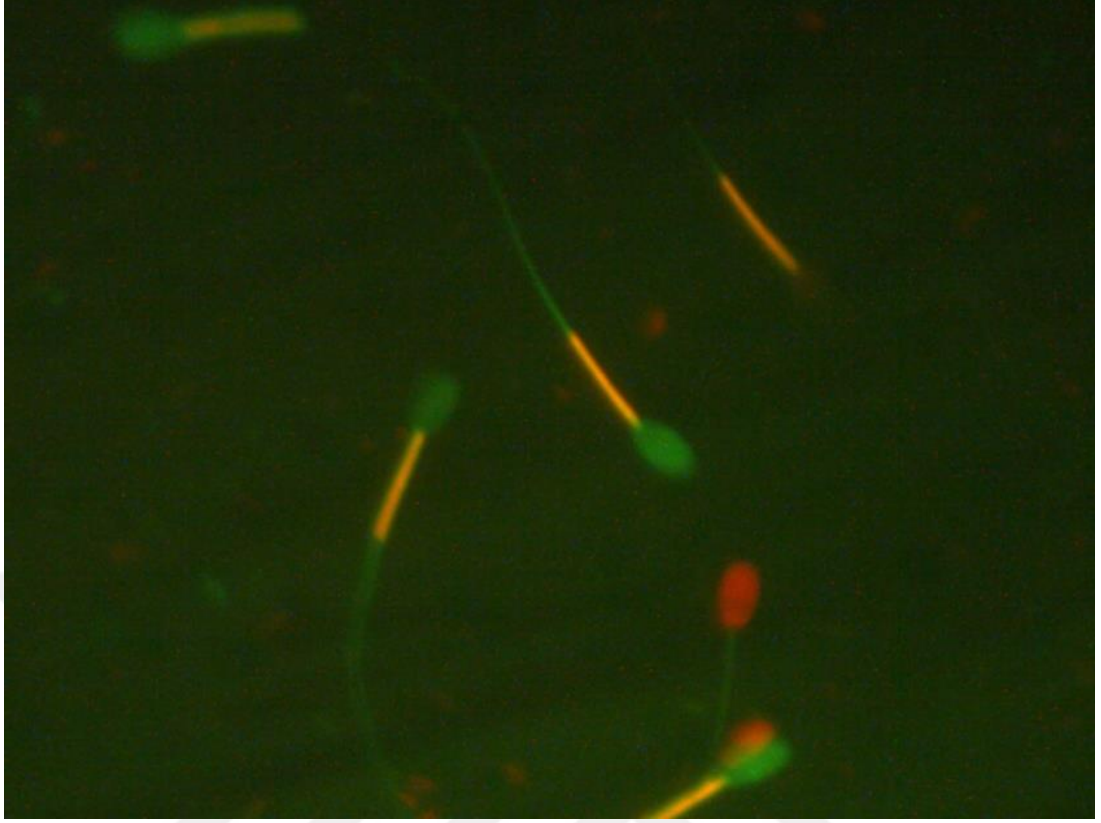
Resim 3.1’de gösterildiği şekilde SYBR/PI boyama tekniğiyle ölü canlı spermatozoa oranını belirlemek amacıyla yapılan boyamada, baş kısmı yeşil floresan veren hücreler canlı olan spermatozoayı, baş kısmı kırmızı veya kırmızı-yeşil floresan veren hücreler ölü olan spermatozoayı göstermektedir.

Resim 3.2’de gösterildiği şekilde mitokondriyal aktivite ve membran bütünlüğünün belirlenmesi amacıyla JC-1/PI boyama tekniği ile belirlemek amacıyla yapılan boyamada, gövde kısmı turuncu floresan veren hücreler yüksek mitokondriyal aktivite gösteren, gövde kısmı yeşil floresan veren hücreler düşük mitokondriyal aktivite gösteren ve gövde kısmı floresan vermeyen hücreler mitokondriyal aktivite göstermeyen spermatozoayı temsil etmektedir.

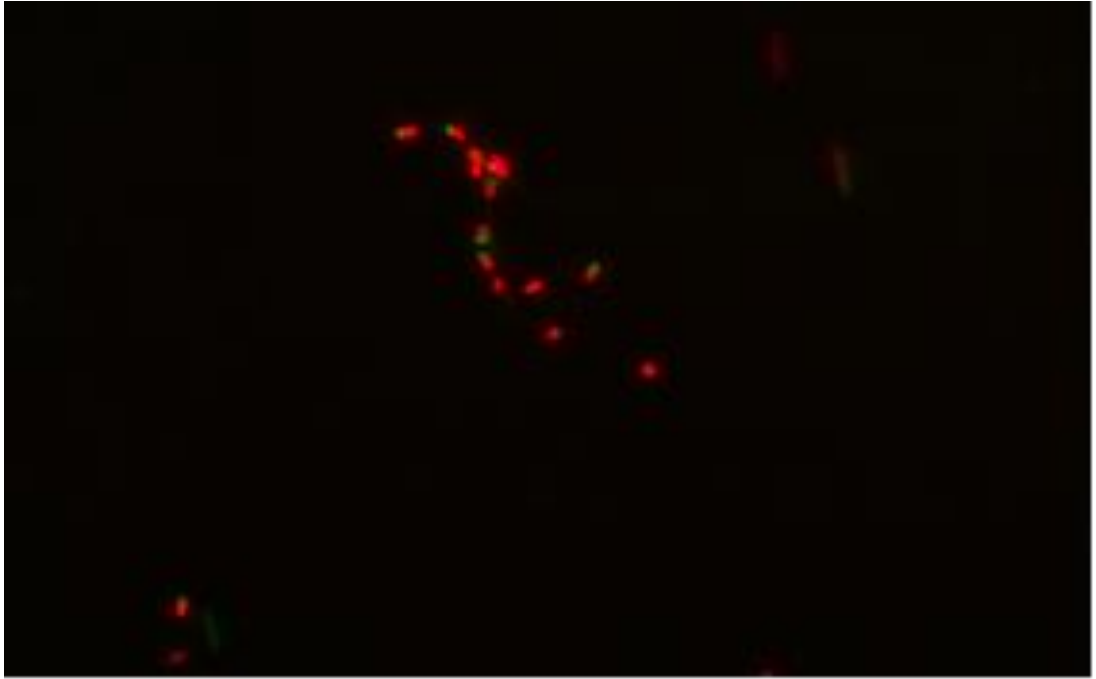
Resim 3.3’de ise akrozom ve membran bütünlüğünün belirlenmesi amacıyla JC-1/PI boyama tekniği ile belirlemek amacıyla yapılan boyamada, akrozom kısımları yeşil floresan veren hücreler hasarlı akrozoma sahip olan, akrozom kısımları yeşil floresan vermeyen ya da kırmızı veren floresan hücreler ie sağlam akrozomu olan spermatozoa olarak değerlendirildi.



**Resim 3.1.** Spermalarda ölü-canlı spermatozoa oranının SYBR/PI boyama tekniğiyle değerlendirilmesi (40x büyütme).



**Resim 3.2.** Spermalarda mitokondriyal aktivite ve membran bütünlüğünün JC-1/PI boyama tekniği ile değerlendirilmesi (40x büyütme)



**Resim 3.3.** Spermalarda akrozom ve membran bütünlüğü Lectin/PI boyama tekniğiyle değerlendirilmesi (20x büyütme)

Embriyo kültür sürecine alınan fertilize oositlerin bölünme oranları Çizelge 3.4'te verilmiştir. Fertilize oositlerin 48. saatteki bölünme oranları bakımından 0,25 µg (% 66.49) ve 0.125 µg (% 62.19) eritropoietin içeren kültür medyumlarında, kontrol grubuna (% 50.78) göre daha yüksek sonuçlar elde edildi (P<0.001). Morula aşamasına ulaşan embriyo oranları üzerinde ise, 0.5 µg (% 66.67) eritropoietin içeren kültür medyumunu, diğer gruplara göre daha yüksek sonuç verdi (P<0.05). Blastosist ve ekspanded blastosist oranları üzerinde, eritropoietinin önemli bir etkisi görülmedi (P>0.001).

Oksidatif stres parametreleri üzerinde de eritropoietinin herhangi bir etkinlik göstermediği görüldü.

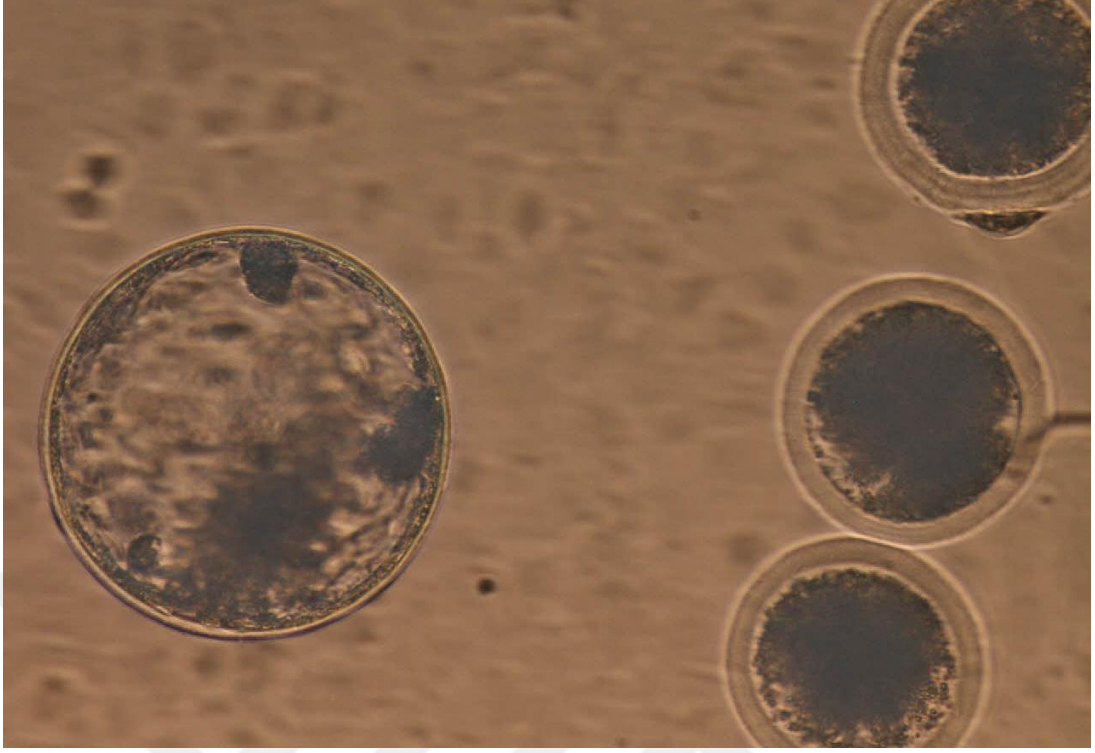
**Çizelge 3.4.** Kültür sürecine alınan fertilize oositlerin 48. saat ve 7-8. gün gelişim süreçlerine ait istatistiksel tablo.

Gruplar	Maturasyona alınan oosit sayısı	Expand oosit oranı (%)	Kültüre alınan oosit sayısı (CR1aa)	48. saat bölünen oosit oranları (%)	7. Gün Kültür Sonu Morula/Blastosist Oranları			
					Morula %	Blastosist %	Exp. Blast. %	Toplam embriyo %
Kontrol	200	86,50	193	50,78 (98/193) <sup>b</sup>	17,65 (3/17) <sup>b</sup>	64,71 (11/17)	17,65 (3/17)	17,35 (17/98)
Deneme I (0,125 µg erit.)	201	85,57	201	62,19 (125/201) <sup>a</sup>	38,24 (13/34) <sup>b</sup>	47,06 (16/34)	14,71 (5/34)	27,20 (34/125)
Deneme II (0,25 µg erit.)	200	88,50	194	66,49 (129/194) <sup>a</sup>	32,00 (8/25) <sup>b</sup>	60,00 (15/25)	8,00 (2/25)	19,38 (25/129)
Deneme III (0,5 µg erit.)	200	89,50	177	46,33 (82/177) <sup>b</sup>	66,67 (12/18) <sup>a</sup>	33,33 (6/18)	0 (0/18)	21,95 (18/82)
p		-		***	*	-	-	-

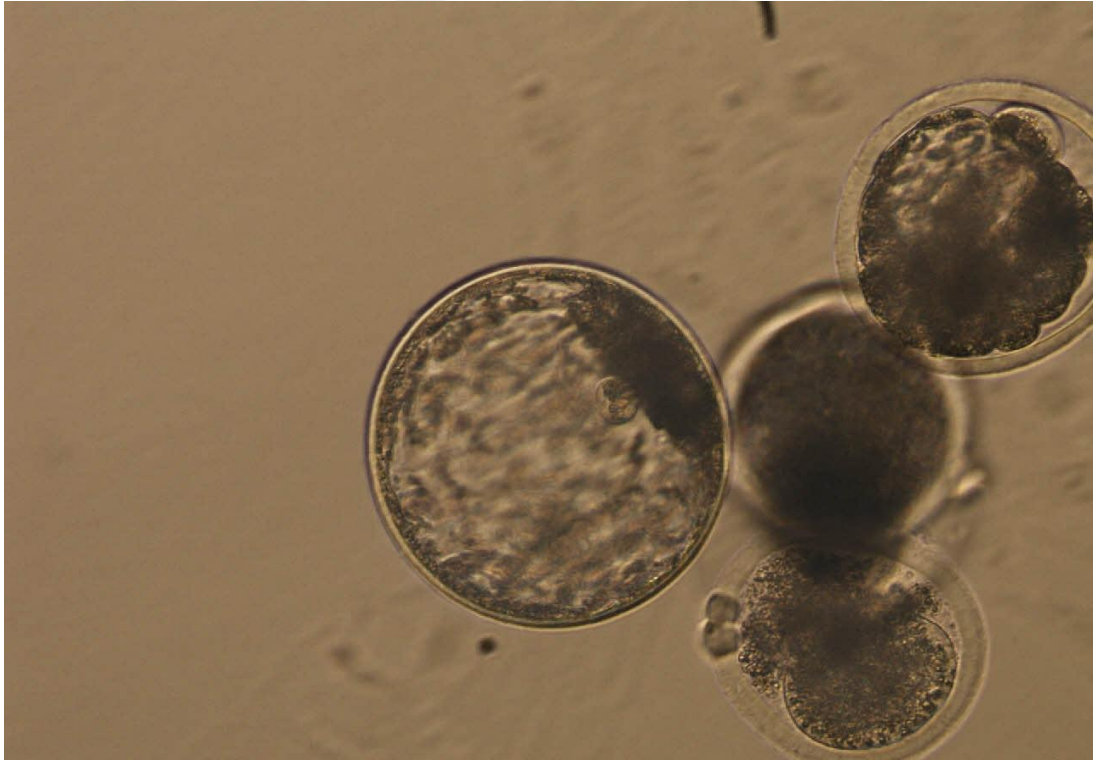
-:p>0,05 ; \*: p<0.05; \*\*\*:p<0.001

**Çizelge 3.5.** Kültür sürecine alınan fertilize oositlerin 7. gün total oksidan düzeyi analizi

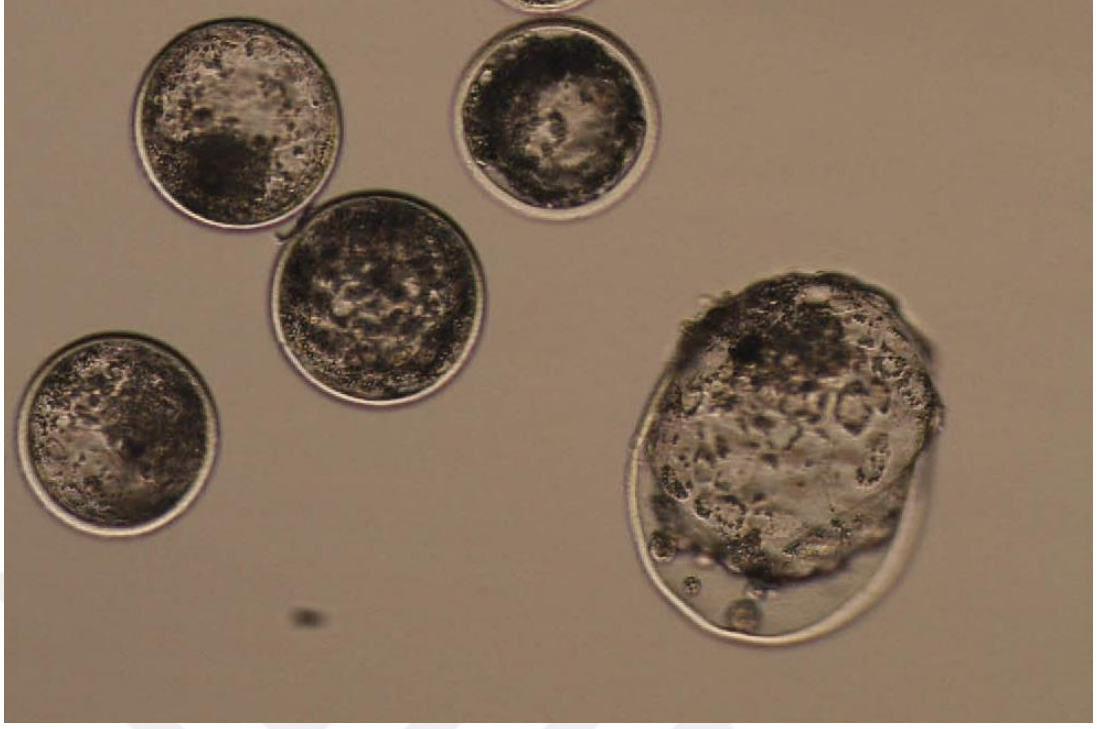
Gruplar	Okuma 1	Okuma 2	DS	Sonuç Equiv/L
Kontrol	0,148	0,199	0,051	53,68421053
Deneme I (0,125 µg eritropoietin)	0,185	0,228	0,48	50,9052632
Deneme II (0,25 µg eritropoietin)	0,182	0,231	0,049	51,57894737
Deneme III (0,5 µg eritropoietin)	0,201	0,244	0,043	45,26315789
p	-	-	-	-



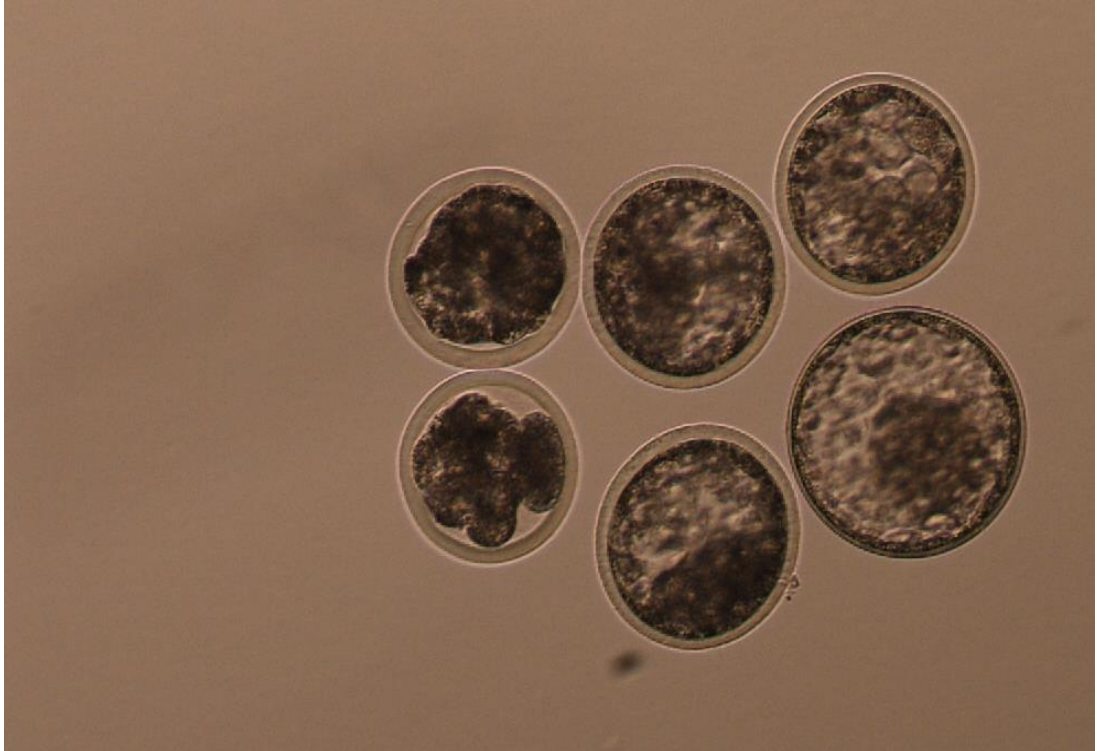
**Resim 3.4.** Kültür ortamının 7. günü ekspanded blastosist (40x büyütme).



**Resim 3.5.** Kültür ortamının 7. günü ekspanded blastosist (40x büyütme).



**Resim 3.6.** Kùltür ortamının 8. günü zondan çıkma anı (20x büyütme).



**Resim 3.7.** Kùltür ortamının 7. günü blastosist (20x büyütme).

## 4.TARTIŞMA

Bu çalışmada, eritropoietinin farklı dozlarının boğa spermasının dondurulma-çözdürme sonrası bazı spermatolojik (motilite, mitokondriyal aktivite, canlılık, akrozom bütünlüğü) ve oksidatif stres parametreleri (LPO, total antioksidan potansiyeli ve total glutatyon)'ne olan etkinlikleri ile embriyo kültür medyumuna ilave edilmesi sonrası embriyo gelişimleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bilimsel kaynaklardan yapılan taramalarda hem erkek hem de dişi genital kanal sıvı komponentlerinde bulunan eritropoietin ile ilgili araştırmaların olmadığı görüldü. Sunulan bu çalışmada eritropoietinin sperma ve in vitro embriyo üzerine antioksidan etkiniliğinin olup olmadığı araştırıldı.

Spermanın dondurulması ve dondurulma sonu çözdürülmesi sırasında meydana gelen membran lipid faz değişimleri, ozmotik, mekanik stres ve ortamda oluşan serbest oksijen kaynaklı gelişen lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikalleri hücre zarı proteinlerinde denaturasyona, hücre organellerinde yapısal bozukluklara, DNA'da kırılmalara ve hücrel lizise neden olmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünleri büyük oranda membran yapılarındaki doymamış yağ asitlerinden, kısmen de membran glikolipitleri, fosfolipitler ve kolesterolden köken almaktadır. Spermanın dondurulması ve çözdürülmesi sırasında oluşan bu ROS, endojen antioksidan savunma sistemini azaltarak fertilité kabiliyetini azaltmaktadır. Serbest radikallerin düşük dozları kapasitasyon, hiperaktivasyon, zona reaksiyonu ve akrozom gibi sperm fonksiyonlarında önemli etkilere sahiptir. Fakat yüksek oranlarda üretilmesinin spermatolojik parametreleri olumsuz yönde etkiledikleri belirtilmektedir (Aitken ve Baker, 2004). Tüm bu olumsuz etkiler, ortama antioksidan etkili maddelerin ilave edilmesiyle giderilebilmekte olup, spermatozoonun çözüm sonrası fonksiyonları iyileştirilebilmektedir (Aitken, 1995; Maxwell ve Watson, 1996; Oehninger ve ark., 2000; Bilodeau ve ark., 2002). Antioksidanlar bu etkilerini ortamda oluşan oksijen miktarını düşürerek, gelişecek veya başlamış olan zincir reaksiyonlarını önleyerek, kırarak veya ortamda gelişen peroksitleri parçalayarak etkinliklerini gösterirler (Cheeseman ve Slater, 1993; Marxwell, 1995; Sardesai, 1995; Thomas, 1995).

Serbest radikallerinin bu zararlı etkilerine karşı spermatozoa ve seminal plazmada lipit peroksidasyonlara karşı önleyici bir takım antioksidanlar bulunmaktadır (Alvarez ve Storey, 1983; Nissen ve Kreysel, 1983; Jeulin ve ark., 1989). Bu antioksidanların bazıları ortamda gelişen ROS ürünleri temizleyicisi (albumin, taurin, hipotaurin, vitamin E), diğer bir kısmı enzimsel (CAT, SOD, GPx), bir grup ise zincir reaksiyonların kırıncısı (ürat, askorbik asit, vitamin E, thiol bileşikleri) olarak etkimektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1989; Sikka, 1996). Fakat bu endojen kaynaklı antioksidan sistemler ROS ürünlerinin zararlı etkilerine ve oksidatif hasarı önlemede yetersiz kalmaktadır (Taylor, 2001). Bu amaçla sperma dilüsyon solüsyonlarına katılan bazı antioksidanların spermanın uzun süreli saklanması ortamda oluşan lipit peroksidasyonundan kaynaklanan oksidatif hasarı minimize ettiği ve hücre canlılığını koruduğu saptanmıştır. İnsan seminal plazmasında bulunan eritropoietinin sperm hücreleri için hipoksik alan oluşturduğu ve bu sayede sperm motilitesi ve canlılığa olumlu etki yaptığı bildirilmektedir (Tug ve ark., 2010).

Spermatozoon motilitesi genel olarak 3 temel faktöre bağımlıdır: Regülasyon, yapısal bütünlük ve enerji sürekliliği. Hareketin regülasyonu orta kısımdaki flagellar ve prinsipal bölgeden kontrol edilmektedir. Flagellar kısım motilite aktivitesini sağlarken, prinsipal kısım ise hiperaktivasyondan sorumludur. Fakat orta kısımdaki doymamış yağ asitleri ve doymuş protein kanalları, bu yapıyı serbest radikal ataklarına duyarlı kılmaktadır (Suarez ve ark., 2007; Hamano, 2007). Sunulan çalışmada sulandırıcıya ilave edilen eritropoietinin, 6.25 U eritropoietin/ml içeren sulandırıcı grubunda progresif motilite oranı ve ölü-canlı spermatozoon oranını artırdığı görülmüş olup, bu farklılığın spermatozoonun orta kısmındaki bu fonksiyonel yapıları koruyarak dondurma çözündürme sonrası motilite ve ölü-canlı spermatozoon oranını iyileştirdiği kanaatine varılmıştır.

Tug ve ark. (2010)'nın, yapmış oldukları bir çalışmada eritropoietinin değişen dozları ile insandan alınan sperma numunelerini 37 °C'de 4 saat süre ile inkube etmişler, 1, 10 ve 100 mIU/ml oranında eklenen rEPO'nin motiliteyi artırdığını ortaya koymuşlardır. En yüksek progresif motilitenin ise 10 mIU/ml doz grubunda

olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda da 6.25 U eritropoietin/ml içeren sulandırıcı grubunun, en yüksek progresif motilite oranını vermesi, Tug ve ark., (2010)'nın yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir. Collares ve ark. (2013), tavşanlara haftada 3 kez subkutan yolla 25 UI/kg rEPO'ni 5 hafta uygulama süresince, spermatozoa motilitesi ve canlılığını üzerine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Sonuçta, rEPO uygulamasının motilite ve canlılığa etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamıza elde edilen bulgular Collares ve ark. (2013)'nin çalışmalarından farklı bulunmuştur. Farklılığın *in vivo* çalışmadan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Eritropoietin aynı zamanda insan testiküler germ hücresinde de üretilmektedir. Fakat bu üretim kriptorşidizm vakalarında azalmaktadır (Cortes ve ark., 2001). Eritropoietin fare epididimisinde de sentezlenebildiği, testiküler fonksiyon bozukluğunun tedavisinde eritropoietin takviyesinin gerekli olduğu düşünülmektedir (Dobashi ve ark., 2005). Foresta ve ark., (1995) 5 erkekte rEPO enjeksiyonu ile testiküler testesteron üretimini artırırken, serumda gonodatropinin veya testesteron seviyesini artırmadığını belirterek, EPO'nin doğrudan olarak insan Leyding hücre fonksiyonuna etki ettiğini vurgulamışlardır.

Mitokondriyal yapılar spermatozoonların orta kısmında yerleşik halde bulunmakta ve spermatozoonların progresif motilitelerini ve zona pellusidayı geçmelerini sağlayan kuyruk filamanları için gereken ATP enerjisini üretmektedir (O'connell ve ark., 2002). Bu nedenle, spermatozoon motilitesi ve fertilitesi ile mitokondriyal aktivite arasında pozitif bir ilişkinin olduğu belirtilmektedir Başarılı bir fertilizasyon işleminde de mitokondriyal aktivitenin yüksek olması gerekmektedir (Casey ve ark., 1993; Kasai ve ark., 2002). Bu aktivitenin belirlenmesinde Rhodamin 123, Texas red ve 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) gibi floresan boyalar kullanılmakta, fakat yüksek ya da düşük mitokondriyal aktivite arasındaki farklılığı en iyi yansıtan JC-1 boyasıyla yapılan boyama tekniği olduğu bildirilmektedir (Garner ve Thomas, 1999). Boğa ve koçlarla yapılan çalışmalarda motilite ve yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip spermatozoa arasında yüksek bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir (Garner ve ark., 1997; Martinez-

Pastor ve ark., 2004; Bucak ve ark., 2015). Çalışmamız sonuçları itibariyle, eritropoietinin çözüm sonu mitokondriyal aktiviteyi koruyamayarak, motilite ve mitokondriyal aktivite arasında pozitif bir korelasyon oluşturmadığını göstermiştir. Bu durum farklı türlerin spermatozoan yapılarının farklı olmasından dolayı her türde aynı etkiyi göstermediği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada çözüm sonu sperma hareketlerinin (VCL, VSL, VAP, LIN) ortalamaları arasındaki farklılıklar da önemli bulunmamıştır. Bununla birlikte, çözüm sonu biyokimyasal (TGSH, AOP, LPO) parametreler üzerine gruplar arasında önemli bir farklılığa rastlanmamıştır. Çalışma sonuçları, bilimsel kaynaklardan edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında bazı antioksidanların etkinlikleri olumlu yönde rapor edilmiştir (Bucak ve ark., 2007; Sarıözkan ve ark 2009; Çoyan ve ark., 2010). Çalışmalar arasındaki zıt sonuçların elde edilmesi, kullanılan katkı maddelerinin farklılığına, hayvan türü, ırkı ve antioksidan aktivite ölçümlerinde kullanılan farklı yöntemlere bağlanabilir.

Memeli hayvanlarda *in vitro* fertilizasyon sonrası gelişen oksidatif stres ve buna bağlı ortamda şekillenen serbest radikaller embriyonun gelişimini etkileyen önemli etkenlerden birisidir. Özellikle embriyonun yapısında meydana gelen hasara bağlı olarak blastosiste erişme oranında ve kaliteli embriyo elde edilmesinde oldukça önemlidir. Buradaki temel etken, embriyo hücre membranlarının yapısının doymamış yağ asitleri oranının yüksek olmasıdır. Serbest radikallerin oluşturduğu lipid peroksidasyon, hücre yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Fertilizasyondan sonra *in vitro* kültüre alınan oositlerin 48. saati embriyo gelişimi için oldukça önemli ve kritik bir dönemdir. Bu dönemde oksijen radikallerin etkisi daha büyük olmakta ve embriyonal bloklanmalara sebep olmaktadır (Gasparrini ve ark., 2000). Netice olarak bu oksijen radikallerinin (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksi radikali) neden olduğu hücredeki hasar, hücresel fonksiyonların devam ettirilmesini engelleyerek elde edilecek embriyo sayı ve kalite oranlarını düşürmektedir (Johnson ve Nasr-Esfahani, 1994; Kehrer ve Lund, 1994).

Memeli embriyoların *in vitro* elde edilmesinde çok farklı kültür ortamları kullanılmaktadır. Bunda temel amaç en uygun kültür ortamını sağlayarak embriyo kalitesini ve sayısını artırmaktır. Kaliteli blastosist elde edilmesi halinde embriyoların dondurulup çözünmesi sonrası nakillerinde gebelik oranları üzerinde oldukça önemli katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda kaliteli blastosist elde edilmesi ile embriyoda yapılacak işlemlerden (biyopsi, kriyoprotektanlardan daha az oranda etkilenme, blastomer seperasyonu vb.) etkilenmesi de daha az olacaktır. Bu amaçlarla oositlerin gerek maturasyon gerekse fertilizasyon sonrası kültür medyumlarına çok çeşitli antioksidan etkili maddelerin ilavesi yapılarak uygun bir kültür ortamının oluşturulmasına çalışılmaktadır (Izquierdo ve ark., 1999; Wan ve ark., 2008).

Yapılan bu çalışmada, oositlerin fertilizasyonu sonrası kültürün 48. saatinde yapılan bölünme kontrollerinde; 0.25 µg ve 0.125 µg eritropoietin, kontrol grubuna göre daha yüksek oranlar verdiği görüldü. Morula aşamasına ulaşan embriyo oranları üzerinde ise, 0.5 µg eritropoietin içeren kültür medyumu, diğer gruplara göre daha üstün çıktığı tespit edildi ( $P < 0.05$ ). Blastosist ve ekspanded blastosist oranları üzerinde, eritropoietinin önemli bir etkisi görülmediği belirlendi ( $P > 0.001$ ). Embriyo oksidatif stres parametreleri üzerinde de eritropoietin herhangi bir etkinlik vermediği tespit edildi. Bu sonuç, ortama katılan eritropoietinin antioksidan seviyelerini (glutatyon ve total antioksidan kapasite) artırmadığından hareketle, blastosist ve ekspanded blastosist oranlarına bir etkinliğin olmadığı varsayımını doğurmaktadır. Bilimsel kaynaklarda ise embriyo üzerine eritropoietinin etkinliğini araştıran bir çalışmaya rastlanılmadı. Ancak yapılan diğer antioksidan çalışmalar ile karşılaştırıldığında daha düşük bir oran elde edilmediği de görüldü.

Spermatolojik parametreler bakımından eritropoietinin etkinlik göstermesi göz önüne alındığında, bu sonuçlar ileride yapılabilecek çalışmalarda (eritropoietinin embriyo üzerine antioksidan etkilerinin araştırılması, blastosist verimi ve kalitesi üzerine etkisinin olup olmadığının belirlenmesine yönelik v.b.) referans alınabileceği düşünülmektedir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, çalışmamızda sperma dilisyon solüsyonlarında eritropoietinin antioksidan etkinliği değerlendirildi. Elde edilen tüm sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen özellikle 6.25 U eritropoietin /ml içeren grupta diğer gruplara göre progresif motilite ve ölü- canlı spermatozoon oranının yüksek bulunmuş olması pratik açıdan önemli olarak değerlendirilebilir. Çalışma sulandırıcılara ilave edilen eritropoietinin antioksidan etkinliğine yönelik yapılan ilk çalışma olması yönüyle önem arz etmektedir. Yapılan çalışma sığır sperması ile yapılmış olup, diğer türlerde yapılacak farklı çalışmalar ile desteklenmesi sonuçları daha da anlamlı hale getireceği kanaatine varıldı.

*in vitro* kültür ortamında eritropoietinin serbest radikallerin zararlı etkilerinin azaltılmasına yönelik yaptığımız bu çalışmada oositlerin kültür ortamına aktarıldıktan sonra 48. saat bölünme oranları 0.25 ve 0.125 µL eritropoietin ilave edilmiş deneme gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç verdiği tespit edildi. Bununla birlikte toplam elde edilen embriyo sayıları bakımından 0.125 µL eritropoietin ilave edilen deneme grubunun diğer gruplara göre daha yüksek embriyo sayısı verdiği belirlendi. Çalışmamız eritropoietinin *in vitro* embriyo kültür medyumlarında antioksidan etkinliğinin yapıldığı ilk çalışma olduğu için oksidatif stres parametrelerinin istatistiksel olarak anlamsız olmasının nedeninin ortaya konulabilmesi için farklı kültür medyumlarında da çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bunun yanısıra embriyo kalite ve blastosiste erişme oranlarına etkili olan farklı etkenlerde bulunmaktadır. Özellikle oositlerin elde edildiği hayvanların kondüsonu, oosit kaliteleri ve farklı kültür ortamları da elde edilen sonuçları etkilemektedir. Bu nedenle çalışmaların başka kültür ortamlarında yapılacak farklı çalışmalar ile desteklenmesinin uygun olacağı kanaatine varıldı.

## ÖZET

***In vitro* embriyo kültür medyumlarına ve sperma dilüsyon solüsyonlarına ilave edilen eritropoietinin spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve embriyo gelişimi üzerine etkisi**

Çalışmada, boğa spermasının dondurulmasında kullanılan dilüsyon solüsyonları ve *in vitro* embriyo kültür medyumuna ilave edilen eritropoietinin antioksidan etkiliğini incelendi. Boğalardan alınan spermaların dondurulması esnasında eritropoietinin farklı dozları (6.25, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 IU eritropoietin /ml) ilave edilerek oluşturulmuş 6 deneme ve eritropoietin ilave edilmemiş (antioksidansız) kontrol gruplarıyla sulandırılarak donduruldu. Çözüm sonu biyokimyasal parametreler (oksidatif stres) ve spermatolojik parametreler incelendi. İkinci aşamasında ise sığır ovaryumlarından elde edilen oositlerin *in vitro* maturasyonu ve fertilizasyonlarını izleyen süreçte eritropoietinin 3 farklı dozu (0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg /ml) ilave edilerek 3 deneme grubu ve eritropoietin ilave edilmemiş (antioksidansız) kontrol grubu oluşturularak kültür ortamına alınarak bölünen oosit oranları, blastosiste erişim oranları biyokimyasal parametreler değerlendirildi. Dondurma-çözdürme sonrası 6.25 IU eritropoietin /ml içeren dilüsyon solüsyonu grubu progresif motilite oranı (%31,81±3,74), 200 IU eritropoietin/ml içeren dilüsyon solüsyonu grubuna göre (%22,26±2,01) anlamlı ölçüde yüksek bulundu ( $p < 0,05$ ). SYBR/PI sonuçları bakımından 6,25 IU eritropoietin/ml içeren dilüsyon solüsyonu grubu 12,5 IU eritropoietin /ml içeren dilüsyon solüsyonu grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu ( $p < 0,05$ ). Morula ve 48. saat bölünen oosit oranları bakımından gruplar arasındaki farklılık önemli iken, diğer özellikler için gruplar arası farklılıkların istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edildi ( $p > 0,05$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, embriyo, eritropoietin, oksidatif stres, sperma.

## SUMMARY

### **Effects of erythropoietin addition to sperma dilution solutions and *in vitro* embryo culture mediums, on spermatological parameters, oxidative stress and embryo development**

In this study, effectiveness of erythropoietin addition to sperm dilution solutions and *in vitro* culture mediums on spermatological parameters, oxidative stress and embryo development was investigated. In freezing stage, bull sperm was frozen using 6 trial group by adding several doses of erythropoietin (6,25 IU, 12,5 IU, 25 IU, 50 IU, 100 IU and 200 U erythropoietin/ml) to dilution solutions and 1 control group without erythropoietin (no antioxidant). After thawing, spermatological and biochemical parameters (oxidative stress) were examined. At the second stage of the study, after *in vitro* maturation and fertilization of oocytes from cow ovaries, cleaved oocyte ratios, reaching to blastocyst ratios, and biochemical parameters were evaluated using 3 trial groups with different doses of erythropoietin (0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg /ml) to culture mediums and 1 control group without erythropoietin (no antioxidant). The progressive motility ratio of the solution group containing 6,25 IU erythropoietin/mL (%31,81±3,74) was significantly higher ( $P < 0,05$ ) comparing to the solution group containing 200 U erythropoietin/mL (%22,26±2,01). As for SYBR/PI, the 6,25 IU erythropoietin/ml group was significantly high ( $p < 0,05$ ) comparing to the group of 12.5U erythropoietin/ml. Morula and 48<sup>th</sup> hour cleaved oocyte ratios were significantly different between groups whereas differences regarding the other parameters were insignificant ( $p > 0,05$ ).

**Key Words:** Antioxidant, embryo, erythropoietin, oxidative stress, semen

## KAYNAKLAR

- ABRAHAM NG, NELSON J, AHMED T, KONWALINKA G, LEVERE RD (1989). Erythropoietin controls heme metabolic enzymes in normal human bone marrow culture. *Exp Hematol*, **17**: 908-913.
- ABRAHAM NG, KAPPAS A (2005). Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med*, **39**: 1-25.
- AITKEN RJ (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*, **7**: 659-668.
- AITKEN RJ, BAKER MA (2004). Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev*, **16**: 581-588.
- AKİSU M, TUZUN S, ARSLANOGLU S, YALAZ M, KULTURSAY N (2001). Effect of recombinant human erythropoietin administration on lipid peroxidation and antioxidant enzyme(s) activities in preterm infants. *Acta Med Okayama*, **55**: 357-362.
- ALVAREZ JG, STOREY BT (1983). Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid peroxidation. *Biol Reprod*, **28**: 1129-1136.
- ALTINIŞIK M (2006). Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. Erişim Adresi:[[www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01](http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01)]. Erişim Tarihi: 20/03/2015
- BAILEY DM, ROBACH P, THOMSEN JJ, LUNDBY C. (2006) Erythropoietin depletes iron stores: antioxidant neuroprotection for ischemic stroke? *Stroke*, **37**: 2453-39.
- BANY-MOHAMMED FM, SLIVKA S, HALLMAN M (1996). Recombinant human erythropoietin: possible role as an antioxidant in premature rabbits. *Pediatr Res*, **40**: 381-387.
- BAŞPINAR N, ÇOYAN K, BUCAK MN, AKALIN PP, ATAMAN MB, ÖMÜR AD, GÜNGÖR Ş, ÖZTÜRK C (2011). Koç Spermasının ekilibrasyon ve dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik ve biyokimyasal parametreleri üzerine lipoik asitin etkisi. *Eurasian J Vet Sci*, **27** (2): 87-92.
- BILAZER CA (2006). Mekonyum boyalı yenidoğanlarda kordon kanı MDA konsantrasyonları ve Biological antioxidants. *Philos Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **17**: 565-578.
- BILODEAU JF, CHATTERJEE S, SIRAD MA, GAGNON C (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*; in pres, **8**: 339-350.
- BILODEAU JF, BLANCHETTE S, GAGNON C, SIRARD MA (2001) Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Therio*, **56**: 275-286.
- BILODEAU JF, BLANCHETTE S, CORMIER N, SIRARD MA (2002). Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Therio*, **57**: 1105-1122.
- BRACKETT BG, ZUELKA KA (1993). Analysis of factor involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Therio*, **39**: 43-64.

- BUCAK MN, ATEŞŞAHİN A, VARIŞLI Ö, YÜCE A, TEKİN N, AKÇAY A (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Therio*, **67**: 1060-7.
- BUCAK MN, SATILMIŞ M, KIZIL SH, KARASHAHİN T, AKYOL N (2010). Sığır embriyolarının *in vitro* gelişiminde kültür medyumlarına katılan antioksidanların etkisi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, **16** (1): 69-74.
- BUCAK MN, ATAMAN MB, BAŞPINAR N, UYSAL O, TAŞPINAR M, BİLGİLİ A, ÖZTÜRK C, GÜNGÖR Ş, İNANÇ ME, AKAL E (2015). Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, **47**: 545-552.
- BUDWORTH PR, AMANN RP, HAMMERSTEDT RH (1987). A microcomputer photographic method for evaluation of motility and velocity of bull sperm. *Journal of Dairy Science*, **70** (9): 1927-1936.
- BURTON, G.W., FOSTER. D.O., PERLY, B., SLATER, T.E., SMITH, I.C., INGOLD, K.U. (1985). perinatal döneme ait faktörler ile ilişkisi. Uzmanlık Tezi, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi İstanbul.
- CALO LA, STANIC L, DAVİS PA, PAGNIN E, MUNARETTO G, FUSARO M, LANDINI S (2003). Effect of epoetin on HO-1 mRNA level and plasma antioxidants in hemodialysis patients. *Int J Clin Pharmacol Ther* **41**: 187-192.
- CALO LA, DAVIS PA, PICCOLI A, PESSİNA AC (2006). A role for heme oxygenase-1 in the antioxidant and antiapoptotic effects of erythropoietin: the start of a good news/bad news story? *Nephron Physiol*, **103**: 107-111.
- CANESTRARI F, BUONCRISTIANI U, GALLI F, GIORGINI A, ALBERTINI MC, CAROBI C, PASCUCCI M, BOSSU M (1995). Redox state, antioxidative activity and lipid peroxidation in erythrocytes and plasma of chronic ambulatory peritoneal dialysis patients. *Clin Chim Acta*, **234**: 127-136.
- CASEY PJ, HILLMAN RB, ROBERTSON KR, YUDIN AI, LIU IK, DROBNIS EZ (1993). Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J Androl*, **14**: 289-297.
- CEMELI E, BAUMGARTNER A, ANDERSON D (2009). Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research*, **681**: 51-67.
- CHEESEMAN KH, SLATER TF (1993). An introduction to free radicals biochemistry. *Br Med Bull*, **49**: 481- 493.
- CHERUBINI A, RUGGIERO C, MORAND C, LATTANZIO F, DELL G, ZULIANI G, Di IORIO A, ANDRES-LACUEVA C (2008). Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem*, **15**: 1236-1248.
- COLLARES TF, CAMPOS VF, URTIAGA G, LEON PM, AMARAL G, HARTLEBEN CP, MCBRIDE AJ, DELLAGOSTİN OA, DESCHAMPS JC, SEIXAS FK, COLLARES T (2013). Erythropoietin non-viral gene therapy does not affect motility, viability, morphology or concentration of rabbit sperm. *Animal*, **7**: 778-783.
- CORTES D, VISFELDT J, THORUP JM (2001). Erythropoietin may reduce the risk of germ cell loss in boys with cryptorchidism. *Hormon Res*, **55**: 41-45.

- ÇOYAN K, BAŞPINAR N, BUCAK MN, AKALIN PP, ATAMAN MB, ÖMÜR AD, GÜNGÖR Ş, KÜÇÜKGÜNAY S, ÖZKALP B, SARIÖZKAN S (2010). Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Res in Vet Sci*, **89**: 426-431.
- DANG J, JIA R, TU Y, XIAO S, DING G (2010). Erythropoietin prevents reactive oxygen species generation and renal tubular cell apoptosis at high glucose level. *Pharmacotherapy*, **64**: 681-685.
- DEL CORSO A, CAPPIELLO M, MURA U (1994). Thiol-dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *Int J Biochem*, **26**: 745-750.
- De MATOS DG, FURNUS CC, MOSES DF (1997). Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells. *Biol Reprod*, **57**: 1420-1425.
- DESHANE J, WRIGHT M, AGARWAL A (2005). Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochim Pol*, **52**: 273-284.
- DIAZ, Z., ASSARAF, M.I., MILLER, J.R, WH, SCHIPPER HM (2005). Astroglial cytoprotection by erythropoietin pre-conditioning: implications for ischemic and degenerative CNS disorders. *J Neurochem*, **93**: 392-402.
- DOBASHI M, GOD K, MARUYAMA H, FUJISAWA M (2005). Erythropoietin gene transfer into rat testes by *in vivo* electroporation may reduce the risk of germ cell loss caused by cryptorchidism. *Asian J Androl*, **7** (4): 369-373.
- DORDAL MS, WANG FF, GOLDWASSER E (1985). The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrino*, **116**: 2293-2299.
- DÜZGÜNEŞ O, KESİCİ T, GÜRBÜZ F (1983). İstatistik Metotları I. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, **861**: 229
- EVANS G, MAXWELL WMC (1987). Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Sidney: Butterworths, pp. 8-21; 107-141.
- FORESTA C, MIONI R, BORDON P, GOTTARDELLO F, NOGARA A, ROSSATO M (1995). Erythropoietin and testicular steroidogenesis: the role of second messengers. *Eur J Endocrinol*, **132**:103-8.
- GARDINER CS, REED DJ (1994). Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod*, **51**: 1307-1314.
- GARETT IR, BOYCE BF, OREFFO ROC, BONEWALD L, POSER J, MUNDY GR (1990). Oxygen derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest*, **85**: 632-629.
- GARNER DL, THOMAS CA, JOERG HW, De JARNETTE JM, MARSHALL CE (1997). Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, **57**: 1401-6.
- GARNER DL, THOMAS CA (1999). Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol Reprod Dev*, **53**: 222-229.
- GASPARRINI B, NEGLIA G, DI PALO R, CAMPANILE G, ZIRCARELLI L (2000). Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. *Therio*, **54**: 1537-1542.
- GENÇ S, AKHİSAROĞLU M, KURALAY F, GENÇ K (2002). Erythropoietin restores glutathione peroxidase activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in

- C57BL mice and stimulates murine astroglial glutathione peroxidase production in vitro. *Neurosci Lett*, **321**: 73-76.
- GRGVEAU JF, LE LANNEU D (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: Physiology and pathology. *Int J Androl*, **20**: 61-69.
- GONZALEZ-PEREZ O, MOY-LOPEZ NA, GUZMAN-MUNIZ J (2008). Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine. *Rev Invest Clin*, **60**: 58-67.
- GUTTERIDGE JMC (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry*, **41**: 1819-1828.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC (1989). Free Radicals in biology and medicine, 2<sup>th</sup> ed. Oxford: Clarendon Press.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC (1996). Free radicals in biology and medicine. 2<sup>th</sup> ed. Oxford: Clarendon Pres, 237-245.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC (2000). Free radicals in biology and medicine. 3<sup>th</sup> ed. Oxford: Oxford Science Publications, 617-24.
- HAMANO S, KOIKEDA A, KUWAYAMA M, NAGAI T (1992). Full-term development of in vitro matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Therio*, **38**: 1085-1090.
- HAMANO Y (2007). Continuous infusion of lipoic acid rapidly reduces plasma  $\beta$ -hydroxybutyrate with elevation of non-esterified fatty acids in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, **97**: 495-501.
- HAMMERSTEDT RH, GRAHAM JK (1992). Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryob*, **29** (1): 26-38.
- HOLLEY AE, WALKER MK, CHEESEMAN KH, SLATER TF (1993). Measurement of n-alkanals and hydroxyalkanals in biological samples. *Free Radic Biol Med*, **15**: 281-289.
- INAL M, KANBAK G, SEN S, AKYUZ F, SUNAL E (1999). Antioxidant status and lipid peroxidation in hemodialysis patients undergoing erythropoietin and erythropoietin- vitamin E combined therapy. *Free Radic Res*, **31**: 211-216.
- IZQUIERDO D, VILLAMEDIANA P, PARAMIO MT (1999). Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Therio*, **52**: 847-61.
- JEULIN C, SOUFIR JC, LAVAL-MARTIM D, CALVAYRAC R (1989). Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res*, **24**: 185-196.
- JOHNSON MH, NASR-ESFAHANI MH (1994). Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro. *Bioessays*, **16**: 31-38.
- KANAGAWA H, SHIMOHIRA I, SAITOH N (1995). Manuel of bovine embryo transfer national livestock breeding center. MAFF, JICA, Japan.
- KARIHTALA P, SOINI Y (2007). Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*, **115**: 81-103.

- KASAI T, OGAWA K., MIZUNO K., NAGAI S, UCHIDA Y, OHTA S, FUJIE, M, SUZUKI K., HIRATA S, HOSHI K (2002). Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl*, **4**: 97-103.
- KATAVETIN P, INAGI R, MIYATA T, SHAO J, SASSA R (2007). Erythropoietin induces heme oxygenase-1 expression and attenuates oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**: 928-934.
- KEHRER JP (1993). Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*, **23**: 21-48.
- KEHRER JP, LUND LG (1994). Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radical Biol Med*, **17**: 65-75.
- KHAN F, ALI R (2006). Antibodies against nitric oxide damaged poly L-tyrosine and nitrotyrosine levels in systemic lupus erythematosus. *J Biochem Mol Bio*, **39**: 189-196.
- KNOBIL E, NEIL JD (1994). The Physiology of reproduction. 2nd. D. Vol. 1. Lea and Febiger. New York.
- KOPANI M, CELEC P, DANISOVIC L, MICHALKA P, BIRO C (2006). Oxidative stress and electron Spin resonance. *Clin Chim Acta*, **364**: 61-66
- KRATZ SB (1991). Erythropoietin. *Blood*, **77**: 419-434
- KUMAR R, JAGGI AS, SING N (2010). Effects of erythropoietin on memory deficits and brain oxidative stress in the Mouse models of dementia. *J Physiol Pharmacol*, **14**: 345-352.
- KUMRAL A, GONENC S, ACIKGOZ O, SONMEZ A, GENÇ K, YILMAZ O (2005) Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate*, **87**: 15-18.
- LACOMBE C, MAYEUX P (1998). Biology of erythropoietin. *Haematologica*, **83**: 724-732.
- LACOMBE C, MAYEUX P (1999). The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant*, **14** (suppl 2): 22-28.
- LAFLEUR MVM, HOORWEG JJ, JOENJE H, WESTMIJZE EJ, RETEL J (1994). The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Radic Res*, **21**: 9-17.
- LAPPIN T (2003) The cellular biology of erythropoietin receptors. *Oncologist*, **8**: 15-18.
- LEE TS, CHANG CC, ZHU Y, SHYY JY (2004). Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection. *Circulation*, **110**: 1296-1302.
- MAIESE K, LI F, CHONG ZZ (2005). New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA*, **293**: 90-95.
- MARTINEZ-PASTOR F, JAHANNISSON A, GIL J, KAABI M, ANEL L, PAZ P (2004). Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci*, **84**: 121-133.
- MARXWEL, RJ (1995). Prospects for the use of antioxidants therapies. *Drugs*, **49**: 345-361.
- MAXWELL WMC, WATSON PF (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, **42**: 55-65.

- MAXWELL PH, FERGUSON DJ, NICHOLLS LG, IREDALE JP, PUGH CW, JOHNSON MH, RATCLIFFE PJ (1997). Sites of erythropoietin production. *Kidney Int*, **51**: 393-401.
- MEISTER A (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biyo Chem*, **269**: 9397-9400.
- MIMIC-OKA J, SIMIC T, DJUKANOVIC L (2002). Epoetin treatment improves red blood cell and plasma antioxidant capacity in hemodialysis patients. *Ren Fail*, **24**: 77-87.
- MOLDOVAN L, MOLDOVAN NI (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol*, **122**: 395-412.
- MULCAHY L (2001). The erythropoietin receptor. *Semin Oncol*, **28**(suppl 8):19-23.
- NASR-ESFAHANI MH, JOHNSON MH (1992). How does transferrin overcome the in vitro block to development of the mouse preimplantation embryo? *J Reprod Fertil*, **96**(1): 41-48
- NISSEN HP, KREYSEL HW (1983). Superoxide dismutase in human semen. *Klinische Wochenschrift*, **61**: 63-65.
- O'CONNELL M, MC CLURE N, LEWIS SEM (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod*, **17**: 704- 9.
- OEHNINGER S, DURU NK, SRISOMBUT C, MORSHEDI M (2000). Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol Cell Endocrinol*, **169**: 3-10.
- PLATT JL, NATH KA (1998). Heme oxygenase: protective gene or Trojan horse. *Nat Med*, **4**: 1364-1365.
- REITER RJ, MELCHIORRY D, SEWERYNEK E, POEGGELER B, BARLOW-WALDEN L, CHUANG J, ORTIZ GG, ACUNA-CASTROVIEJO D (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res*, **18**: 1-11.
- RICH T, ALLEN RL, WYLLIE AH (2000). Defying death after DNA damage. *Nature*, **407**: 777-783.
- RODRIGUEZ C, MAYO JC, SAINZ RM, ANTOLIN I, HERRERA F, MARTIN V, REITER RJ (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, **36**: 1-9.
- ROSS D (1988). Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. *Pharmacol Ther*, **37**: 231-249.
- ROSSERT J, ECKARDT KU (2005). Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transplant*, **20**: 1025-1028.
- SALAMON S, MAXWELL, WMC (1995). Frozen storage of ram semen. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*, **37**: 185-249.
- SALINAS M, WANG J, ROSA De SAGARRA M, MARTIN D, ROJO AI, MARTIN-PEREZ, J, ORTIZ De MONTELLANO PR, CUADRADO A (2004). Protein kinase Akt/PKB phosphorylates heme oxygenase-1 in vitro and in vivo. *FEBS Lett*, **578**(1-2): 90-94.
- SARDESAI VM (1995). Role of antioxidants in health maintenance. *Nutr Clin Pract*, **10**: 19-25.

- SARIÖZKAN S, BUCAK MN, TUNCER PB, ULUTAŞ PA, BİLGİN A (2009). The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, **58**: 134-8.
- SASAKI, R, MASUDA S, NAGAO M (2000). Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**: 1775-1793.
- SCHELLENDER K, FUHRER F, BRACKETT BG, KORB H, SCHLEGER W (1990). In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplement with estrous cows serum. *Therio*, **33**(2): 477-485.
- SHANNON P, VISHWANATH R (1995). The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim Reprod Sci*, **39**: 1-10.
- SIKKA SC (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Bioscience*, **1**: 78-86.
- SILALAH J (2002). Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pac J Clin Nutr*, **11**: 79-84.
- SUAREZ SS, MARQUEZ B, HARRIS TP, SCHIMENTI JC (2007). Different regulatory systems operate in the midpiece and principal piece of the mammalian sperm flagellum. *Society of Reproduction and Fertility, Suppl*, **65**:331-334.
- TAKAGI Y, MORI K, TAKAHASHI T, SUGAWARA S, MASAKI J (1992). Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *J Anim Sci*, **70**: 1923-1927.
- TAYLOR CT (2001). Antioxidants and reactive oxygen species in human infertility. *Environ Toxicol Pharmacol*, **10**: 189-198.
- THOMAS MJ (1995). The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **35**: 21-39.
- TRINCHERO GD, AFFRANCHINO MA, SCHANG LM, BECONI MT (1990). Antioxidant effect of bovine spermatozoa on lipid peroxidation. *Comp Biol*, **8**: 339-350.
- TUG N, ALTUNKAYNAK ME, AKTAS RG, KILIC U., YILMAZ B, CAM , BC, KARATEKE A (2010). Does erythropoietin affect motility of spermatozoa? *Arch Gynecol Obstet*, **281**: 933-938.
- UMAOKA Y, NODA Y, NARIMOTO K, MORI T (1992). Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, **31**: 28-33.
- USBERTI M, GERARDI, GM, MICHELI AM, TIRA P, BUFANO G, GAGGIA P, MOVILLI E, GALLI F (2002). Effects of erythropoietin and vitamin E modified membrane on plasma oxidative stress markers and anemia of hemodialyzed patients. *Am J Kidney Dis*, **40**: 590-599.
- VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCO J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. **39**: 44-84.
- YADA T, SHIMOKAWA H, HIRAMATSU O, SATOH M, KASHIHARA N, TAKAI A, GOTO M, OGASAWARA Y, KAJIYA F (2010). Erythropoietin enhances hydrogen peroxide-mediated dilatation of canine coronary collateral arterioles during myocardial ischemia in dogs in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **299**(6):1928-35.

YOSHIMURA A, ARAI K (1996). Physician education: the erythropoietin receptor and signal transduction. *Oncologist*, **1**: 337-339.

YURDAKUL Z (2007). Oksijen ve Canlılar. Erişim Adresi:[ [www.genbilim.com /index2.php?](http://www.genbilim.com /index2.php?)].  
*Erişim Tarihi*: 05.11.2009.

WAN PC, HAO Z.D, ZHOU P, WU Y, YANG L, CUI MS, LIU SR, ZENG SM (2008). Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. *Animal Reproduction Science*, in pres.

WANG L, ZHANG Z, WANG Y, ZHANG R, CHOPP M ( 2004). Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, **35**: 1732-1737.

WANG Q, PFISTER F, DORN-BEINEKE A, HAGEN F, LIN J, FENG, Y, HAMMES HP (2010). Low -dose erythropoietin inhibits oxidative stres and early vascular changes in the experimental diabetic retina. *Diabetol*, **53**: 1227-1238.





T.C.  
TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI  
Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu


KURUL KARARI


KARAR SAYISI : 58  
KARAR TARİHİ : 29.06.2011


Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 29 Haziran 2011 tarihinde aylık olağan toplantısını yapmıştır. Toplantıda "In Vitro Embriyo Kültür Medyumlarına ve sperma Dilüsyon Solüsyonlarına İlave Edilen Eritropoietinin Spermatolojik Parametreler, Oksidatif Stres ve Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisi" isimli proje etik yönünden değerlendirilmesi ile ilgili başvuru ele alınmıştır. Söz konusu projenin Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Etik Kurul Çalışma Yönergesinde belirtilen ilkelere uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.


  
Dr. Umut TAŞDEMİR  
Kurul Başkanı

  
Engin ÜNAY  
Başkan Vekili

  
Dr. P. Barbaros TUNCER  
Üye

  
İbrahim Alper ARIK  
Üye

  
Halil EROL  
Üye

  
Dr. Neval ÖZDOĞAN  
Üye

  
Selahattin ŞEN  
Üye

  
Mustafa KÖYLÜOĞLU  
Üye

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

Adı : Muharrem  
Soyadı : SATILMIŞ  
Doğum Yeri ve Tarihi : Kızılcahamam. 15.01.1972  
Uyruğu : T.C.  
Medeni Durumu : Evli ve 3 çocuk babası  
Askerlik Durumu : 247. Kısa dönem 1995-1996  
İletişim Adresi ve Telefonu : Avcılar mah. Karahöyük cad. No: 20 - B/6  
Yenimahalle, Ankara. 05336437228  
E- posta : satilmis96@gmail.com

### II- Eğitim

Doktora : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (devam)  
Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (1988- 1994)  
Lise : Etlik Lisesi (1985-1988), ANKARA  
Orta Okul : 19 Mayıs Ortaokulu (1982-1985), ANKARA  
İlkokul : Şinasi İlkokulu (1977-1982), ANKARA  
Yabancı Dili : İngilizce

### III- Ünvanları

Veteriner Hekim

### IV- Mesleki Deneyimi:

**1995**, Veteriner Hekim, Erzincan Gıda Ltd. Şti., ANKARA.

**1996**, Veteriner Hekim, Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü, ANKARA.

**1996-2000**, Veteriner Hekim, Altındağ Belediyesi, ANKARA.

**2000- 2001**, Gıda Denetim Şefi, Altındağ Belediyesi, ANKARA.

**2001-2002**, Veteriner İşleri Müdür Yrd., Altındağ Belediyesi, ANKARA.

**2002-2004**, Veteriner İşleri Müdürü, Altındağ Belediyesi, ANKARA.

**2004-2009**, Araştırmacı Veteriner Hekim, Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, ANKARA.

**2009-2012**, Embriyo Transferi Laboratuvarı Şube Şefi, Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, ANKARA.

**2012 --**, Enstitü Müdürü, Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, ANKARA.

#### **V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar**

- 1- Farmakolji ve Toksikoloji Derneği
- 2- Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası

#### **VI- Bilimsel İlgi Alanları**

##### **A- Science citation index' te taranan dergilerdeki yayınları**

Tahir KARAŞAHİN, Numan AKYOL, **Muharrem SATILMIŞ**, Sedat Hamdi KIZIL, Mustafa Numan BUCAK, Kenan ÇOYAN (2014). Investigation of conception rates achieved with the transfer of sexed and unsexed bovine embryos. *Turk J Vet Anim Sci*, **38**: 253-256.

Numan AKYOL, Sedat Hamdi KIZIL, **Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, (2014). Investigation of bull effect on *in vitro* embryo production. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, **20** (4): 561-564

Numan AKYOL, Sedat Hamdi KIZIL, **Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Serkan ERAT (2014). The results of consecutive superovulations in cows by induction with various exogenous progesterone routes. *Turk J Vet Anim Sci*, **38**: 157-160

Umut TAŞDEMİR, **Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Sedat Hamdi KIZIL, Mustafa KAYMAZ, Kei IMAI (2012). The effect of single epidural plus intramuscular injection of FSH on superovulatory response in Anatolian Black cow. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **59**: 211-216.

Aksu DA, Ağca C, Aksu S, Bağış H, Akkoç T, Çaputcu AT, Arat S, Taşkın AC, Kızıl SH, Kardeş T, Akyol N, **Satılmış M**, Sağırkaya H, Üstüner B, Nur Z, Ağca Y. (2012). Gene expression profiles of vitrified *in vitro* and *in vivo* derived bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*, **79**(9):613-25.

Sedat Hamdi KIZIL, Numan AKYOL, Tahir KARAŞAHİN, **Muharrem SATILMIŞ** (2011). Etilen Glikol ile direkt transfer metoduna göre dondurulan *in vivo* sığır embriyolarının transferi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, **17** (5): 721-724.

Mustafa Numan BUCAK, **Muharrem SATILMIŞ**, Sedat Hamdi KIZIL, Tahir KARAŞAHİN, Numan AKYOL (2010). Sığır embriyolarının *in vitro* gelişiminde kültür medyumlarına katılan antioksidanların etkisi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, **16** (1): 69-74.

#### **B- Yurtiçi dergilerdeki yayınları**

Tahir KARAŞAHİN, **Muharrem SATILMIŞ**, Sedat Hamdi KIZIL, Numan AKYOL (2013). Farklı dönemlerdeki *in vivo* üretilmiş sığır embriyolarında cinsiyetin dağılımının belirlenmesi ve cinsiyetin bu dağılıma etkisinin araştırılması. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, **10**(2): 87-91.

**Muharrem SATILMIŞ**, Ali BİLGİLİ (2013). Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların yeni kullanım seçenekleri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, **10**(1): 63-71.

Numan AKYOL, Sedat Hamdi KIZIL, Tahir KARAŞAHİN, **Muharrem SATILMIŞ**, Hashiyada Yutaka (2008). Sığırlarda Ovum Pick-Up tekniği kullanılarak *in vitro* embriyo üretimi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **48** (1): 1-11.

Sedat Hamdi KIZIL, Numan AKYOL, Tahir KARAŞAHİN, **Muharrem SATILMIŞ** (2007). 7 Günlük *in vitro* sığır embriyolarının vitrifikasyonla dondurulması. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **47** (2): 1-5.

#### **C- Uluslararası bildiriler**

**Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Sedat Hamdi KIZIL, Numan AKYOL, Mustafa Numan BUCAK (2011). Use of Charles Rosencrans (CR1aa) as embryo culture medium on development of *in vitro* bovine embryos. 3<sup>rd</sup> East Mediterranean International Council for Laboratory Animal Science Symposium. 13-15 June 2011, İSTANBUL.

Tahir KARAŞAHİN, Numan AKYOL, Sedat Hamdi KIZIL, **Muharrem SATILMIŞ**. The effect of different FSH dosage on development of *in vitro* bovine embryo. 3<sup>rd</sup> East Mediterranean International Council for Laboratory Animal Science Symposium. 13-15 June 2011, İSTANBUL.

Sedat Hamdi KIZIL, Numan AKYOL, Tahir KARAŞAHİN, **Muharrem SATILMIŞ**, Kurtuluş GÖK. Investigation of pregnancy rates obtained from vitrified holstein embryos. Reproduction in Domestic Animals., The 15<sup>th</sup> Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) . 15-17 September 2011, Antalya-TURKEY

Arat S, Bagis H, Erdag B, Aktoprakligil D, Özdemir A, Balcioglu KB, Ozturk U, Daskin A, Tekin N, Kaymaz M, Uysal O, Akcay O, Ertugrul O, Akyuz B, Gucuyener O, Kurar E, Bulut Z, Altunok V, Nizamlioglu M, Dinc DA, Semacan A, Coyan K, Guler M, Ataman M, Guzeloglu A, Pabuccuoglu S, Ak K, Birler S, Aklan S, Baran A, Evecen M, Ozdas OB, Cirit U, Bacinoglu S, Soysal I, Sagirkaya H, Nak Y, Nak D, Nur Z, Gumen A, Ustunel B, Tasdemir U, Tuncer BP, Kinet H, Akyol N, Kızıl SH, Karasahin T, **Satilmis M**, Togan I, Koban E, Dinc H, Ankarali B, Akin O, Kucukkepaci M, Ozluturk A, Kopuzlu S, Soysal D, Sezenler T, Unalan A, Işık A, Aytac M, Demirhan İ (2008). (TÜRKHAYGEN-1 Konsorsiyumu). In vitro Conservation and Preliminary Molecular Characterization of Some

Turkish Native Domestic Animal Genetic Resources-I (TURKHAYGEN-I) 31. ISAG 2008 Kongresi (31<sup>st</sup> International Society of Animal Genetics. 24/07/2008, Amsterdam, Netherlands) Amsterdam, Hollanda. www.isag2008.nl., Erişim Tarihi: 09.01.2008.

#### **D- Uluslararası katılımlı bildiriler**

**Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Sedat Hamdi KIZIL, Ali Bilgili, Ender Yarsan. Sığır embriyolarının *in vitro* gelişiminde Charles Rosencrans (CR1aa) mediyumuna ilave edilen eritropoietinin etkisi. 3.Ulusal Laboratuvar Hayvanları Bilimi Kongresi. 26-28 Eylül 2013, KAYSERİ.

**Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Sedat Hamdi KIZIL, Numan AKYOL, Umut TAŞDEMİR, Ali BİLGİLİ. Yerli Kara düvelerde kas içi ve epidural boşluğa uygulanan FSH'nın etkilerinin karşılaştırılması. 4. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi. 11-14 Eylül 2013, ELAZIĞ.

Umut TAŞDEMİR, **Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Sedat Hamdi KIZIL, Mustafa KAYMAZ, Kei IMAI. İntramuscular uygulama ile birlikte epidural boşluğa uygulanan FSH'nın Yerli Kara inekte süperovulasyona olan etkisi. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 1-4 Temmuz 2013, KARS.

**Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Sedat Hamdi KIZIL, Numan AKYOL Mustafa Numan BUCAK. Vitrikiye edilen sığır embriyolarında direkt transfer imkânlarının araştırılması. VI. Uluslararası Katılımlı Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 56-57. 18-22 Mayıs 2011, Belek-ANTALYA.

**Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Sedat Hamdi KIZIL, Umut TAŞDEMİR, Oğuz BÜYÜKKAYAER, Halil İbrahim AKÇADAĞ, İlkay DEMİRHAN. Yerli Kara düve ve ineklerde epidural boşluğa uygulanan FSH'nın embriyo kalitesi üzerine etkisi. VI. Uluslararası Katılımlı Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 146-147. 18-22 Mayıs 2011, Belek-ANTALYA.

**Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Numan AKYOL, Sedat Hamdi KIZIL, Umut TAŞDEMİR, Mustafa Numan BUCAK, İlkay DEMİRHAN. Farklı süperovulasyon protokollerinin embriyo eldesi üzerine etkileri., IV. Uluslararası katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 76-77. 4-7 Kasım 2010, Belek-ANTALYA.

**Muharrem SATILMIŞ**, Sedat Hamdi KIZIL, Tahir KARAŞAHİN, Numan AKYOL, Umut TAŞDEMİR. Dört- yedi uterus yıkaması uygulanan Yerli Kara ineklerde östrüs ve gebe kalma oranları. IV. Uluslararası katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 210-211. 4-7 Kasım 2010, Belek-ANTALYA.

**Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Numan AKYOL, Sedat Hamdi KIZIL, Umut TAŞDEMİR, Mustafa Numan BUCAK, İlkay DEMİRHAN. Farklı FSH dozlarının embriyo kalitesi üzerine etkisi. IV. Uluslararası katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 246-247. 4-7 Kasım 2010, Belek-ANTALYA.

Mustafa Numan BUCAK, **Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Numan AKYOL, Sedat Hamdi KIZIL, Umut TAŞDEMİR. Sığır embriyolarının *in vitro* gelişiminde CR1aa ve SOF kültür medyumlarının etkisi. IV. Uluslararası katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 248-249. 4-7 Kasım 2010, Belek-ANTALYA.

Mustafa Numan BUCAK, **Muharrem SATILMIŞ**, Tahir KARAŞAHİN, Sedat Hamdi KIZIL, Numan AKYOL, Umut TAŞDEMİR. *in vitro* sığır embriyolarının gelişiminde antioksidanların etkisi. V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi. 64. 1-4 Ekim 2009, ELAZIĞ.

## **VII- Bilimsel Etkinlikleri**

### **A- Görev Aldığı Sonuçlanmış Projeler**

- 1- Saha Şartlarında Embriyo Transferinin Uygulanabilirliğinin Araştırılması (**TAGEM-2013**).
- 2- Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının *in vitro* Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması (**106G113 - TÜBİTAK 2012**).
- 3- Modern Biyoteknolojik Yöntemler Kullanılarak Dondurulmuş Koç Spermaları ve Cinsiyeti Belirli İnek Embriyosu Üretimi (**107G095 - TÜBİTAK 2011**).
- 4- Vitriyifiye Edilmiş Sığır Embriyolarında Direkt Transfer İmkânlarının Araştırılması (**TAGEM-2010**).
- 5- Anakara Keçisi Halk Elinde Islahı Projesi (**TAGEM-2010**).
- 6- Sığır Embriyolarının *in vitro* Gelişiminde Kültür Medyumlarına Katılan Antioksidanların Etkisi (**107O884 - TÜBİTAK- 2009**).
- 7- Cinsiyet Tayini Yapılan Sığır Embriyolarından Elde Edilen Gebelik Oranlarının Araştırılması (**TAGEM-2009**).
- 8- Vitriyifiye sığır embriyolarından elde edilen gebelik oranlarının araştırılması (**TAGEM - 2009**).
- 9- Sığırlarda Ovum Pick-up (OPU) tekniği kullanılarak *in vitro* embriyo üretimi (**TÜBİTAK 2006**).

### **B- Görev Aldığı Devam Eden Projeler**

- 1- Yerli Evcil Hayvan Gen Bankası ve Sürdürülebilir Kullanımı: (Doğu Anadolu Kırmızısı ineklerde epidural yolla yapılan süperovulasyon etkinliğinin araştırılması) (TAGEM).
- 2- Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı Projesi (Akkaraman Koyunu) (TAGEM).
- 3- Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Projesi (Kalkınma Bakanlığı)

- 4- Ülkesel İpekböceği Alt Yapı Geliştirme Projesi (Kalkınma Bakanlığı)

### **C- Verdiği Seminerler**

- 1- Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanların Kullanımı, 2010.
- 2- Nonsteroid Antiinflatuvar İlaçların Yeni Kullanım Seçenekleri, 2010.
- 3- Türkiye'de Embriyo Transferi Uygulamaları ve Embriyo Transferi İle İlgili Teknolojiler (Applications of Embryo Transfer in Turkey and Its Related Technologies). 20.02. 2014 Animalia, İSTANBUL.

### **D- Katıldığı Kongre ve Bilimsel Toplantılar**

- 1- II. Uluslararası katılımlı Doğum ve Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2006 Belek/ANTALYA
- 2- Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Deneysel Araştırmalar Sempozyumu 15-16 Ekim KIRIKKALE-ANKARA
- 3- IV. Uluslararası Katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi, 4-7 Kasım 2010 Belek/ANTALYA
- 4- VI. Uluslararası Katılımlı Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, 18-22 Mayıs 2011 Belek ANTALYA
- 5- 3rd East Mediterranean International Council for Laboratory Animal Science Symposium, 13-15 June 2011 İSTANBUL
- 6- 15th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), 15-17 September 2011 Antalya-TURKEY.
- 7- IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, 11-14 Eylül 2013 ELAZIĞ
- 8- III. Ulusal Laboratuvar Hayvanları Bilimi Kongresi, 26-28 Eylül 2013 KAYSERİ
- 9- Uluslararası Katılımlı Küçük Ruminant Kongresi, 16-18 Ekim 2014 KONYA

### **VIII- Diğer Bilgiler**

#### **A- Katıldığı Kurslar**

- 1- Recto Vaginal Yolla Suni Tohumlama Kursu, Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü (1995) ANKARA
- 2- Gıda Denetçi Eğitimi, Ankara İl Sağlık Müdürlüğü (2003) ANKARA
- 3- Araştırma Yönetimi, Anadolu Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü (2006) ESKİŞEHİR

- 4- Sığırlarda Embriyo Transferi Kursu, National Livestock Breeding Center (2006)  
JAPONYA
- 5- Japonca Dil Kursu, Japanese language instructors JICA Nihonmastsu Center (2006)  
JAPONYA
- 6- İngilizce Dil Kursu, Türk- Ameriken Derneği (2008) ANKARA
- 7- Koyunlarda Embriyo Toplama ve Manipülasyonları, Marmara Hayvancılık  
Araştırma Enstitüsü (TÜBİTAK-MAM) ve S.Ü. Veteriner Fakültesi (2008) KONYA
- 8- Etkili İletişim Kursu, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (2008)  
ANKARA
- 9- Sığırlarda Embriyo Toplanması ve Dondurulması, Lalahan Hayvancılık Merkez  
Araştırma Enstitüsü (2009) ANKARA
- 10- Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Deneysel Araştırmalar Sempozyumu, Kırıkkale  
Üniversitesi ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (2009)  
KIRIKKALE
- 11- Pankreas Adacık ve Kök Hücre Korelasyonu Kursu, Dışkapı Yıldırım Beyazıt  
Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve TÜBİTAK (2012) ANKARA
- 12- Koyun- Keçi Genetik Islah Çalıştayı (2014) UŞAK
- 13- Türkiye Küçükbaş Hayvancılık Çalıştayı (2015) ANTALYA

#### **B- Eğitici Olarak Görev Aldığı Kurslar**

- 1- Sığırlarda Embriyo Üretimi, Dondurulması ve Transferi Kursu (SUDAN'lı teknik  
elemanlar) 05-22 Ekim 2008
- 2- Sığırlarda Embriyo Üretimi, Dondurulması ve Transferi Kursu (KIRGIZİSTAN'lı  
teknik elaman) 10-16 Mayıs 2009
- 3- Sığırlarda Embriyo Üretimi, Dondurulması ve Transferi Kursu (Veteriner Hekimler)  
05-09 Ekim 2009
- 4- Embriyoda Cinsiyet Tayini ve Embriyo Dondurulması Kursu (Veteriner Hekimler)  
12-16 Ekim 2009
- 5- Sığırlarda Embriyo Üretimi, Dondurulması ve Transferi Kursu (Veteriner Hekimler)  
04-08 Ekim 2010
- 6- Sığırlarda Embriyo Üretimi, Dondurulması ve Transferi Kursu (Veteriner Hekimler)  
04-14 Ekim 2011
- 7- Sığırlarda Embriyo Üretimi, Dondurulması ve Transferi Kursu (FİLİSTİN'li teknik  
elamanlar) 12-16 Kasım 2012