

TC
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FARKLI SICAKLIKLARDA *in vitro* OLGUNLAŞTIRILAN SIĞIR
OOSİTLERİNDE ISI ŞOK PROTEİNİ 70'İN BELİRLENMESİ**

TEMMUZ 2018

SAMSUN

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI SICAKLIKLARDA *in vitro* OLGUNLAŞTIRILAN SIĞIR
OOSİTLERİNDE ISI ŞOK PROTEİNİ 70'İN BELİRLENMESİ

LEYLA BENER

15210224

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

SAMSUN, 2018

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Leyla BENER tarafından hazırlanan “Farklı Sıcaklıklarda *in vitro* Olgunlaştırılan Sığır Oositlerinde Isı Şok Proteini 70’in Belirlenmesi” adlı tez çalışması 22/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mehmet KURAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Başkan Prof. Dr. Mehmet KURAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Üye Dr. Öğr. Üyesi Emre ŞİRİN
Ahi Evran Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Üye Dr. Öğr. Üyesi Uğur ŞEN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım. .../.../2018

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.



22.06.2018

Leyla BENER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI SICAKLIKLARDA *in vitro* OLGUNLAŞTIRILAN SIĞIR OOSİTLERİNDE ISI ŞOK PROTEİNİ 70'İN BELİRLENMESİ

Leyla BENER

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Mehmet KURAN

Bu çalışma, sığır oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılmasında (IVM) uygulanan 36,5 °C ve 38,5 °C kültür sıcaklıklarının ısı şok protein 70 üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada sığır kumulus oosit kompleksleri (KOK), % 10 fetal calf serum eklenmiş bikarbonat tamponlu medyum-199'da 36,5 °C veya 38,5°C de ve % 5 CO₂ içeren içeren nemlendirilmiş ortamda 24 saat IVM'na bırakılmıştır. IVM sonunda KOK'lerinin olgunlaşmaları tam kumulus genişlemesine göre belirlenmiştir. Olgunlaşan KOK'ların kumulus hücreleri % 0,1 hyrulinidaz enzimi içeren hepes tamponlu TCM-199'da 10 dakika vortekslenerek uzaklaştırıldıktan sonra % 9,6'lık fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (PBS) yıkanıp protein izolasyonuna geçilmiştir. Protein örneklerinin konsantrasyonunu arttırmak için örnekler 24 saat -80 °C'de dondurulduktan sonra liyofilizatörde 0.140 hPA basınç altında lyofilize edilip -20 °C'de depolanmıştır. Oositlerin 70 kDa ağırlıktaki proteinlerin seviyesi SDS- PAGE yöntemi ile belirlenmiştir. IVM'de uygulanan 36,5 °C (% 81,11) veya 38,5°C (% 84,41) inkübasyon sıcaklıkları arasında kumulus genişlemesi bakımından bir farklılık tespit edilmemiştir. Western blot sonucunda farklı sıcaklıklarda olgunlaştırılan sığır oositlerinin ısı şok 70 proteini bant görüntüsü elde edilemediğinden dolayı farklı inkübasyon sıcaklıklarının sığır oositlerinin ısı şok proteinin 70 üzerine olabilecek etkileri tespit edilememiştir.

Haziran 2018, 83

Anahtar kelimeler: Oosit Olgunlaştırma, Kültür Sıcaklığı, Isı Şok Proteini 70, Western Blot

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 IN BOVINE OOCYTES MATURED DIFFERENT CULTURE TEMPERATURES *in vitro*

Leyla BENER

Ondokuz Mayıs University

Institute of Science

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Proff. Dr. Mehmet KURAN

This study was conducted to determine the effect of 36,5 or 38,5 °C culture temperatures during vitro maturation (IVM) on heat shock protein 70 in cattle oocytes. In the study, bovine cumulus oocyte complexes (COC) were subjected to IVM in bicarbonate-buffered TCM-199 supplemented with 10% FCS for 22 hours with a humidified 5% CO₂ in air at either 36,5 or 38,5 °C. Maturation of COCs was determined according to fully cumulus expansion at the end of in vitro maturation period. The cumulus cells of matured COCs were removed by vortexing in TCM-199 with hepes buffered TCM-199 containing 0,1% hyaluronidase enzyme, following washing in 9,6 % phosphate buffered saline solution for protein isolation. To increase the concentration of isolated protein samples, the samples were frozen at -80 °C for 24 hours and lyophilized at 0,140 hPa in lyophilizer, and stored at -20 °C. The level of 70 kDa proteins in oocytes was determined by SDS-PAGE method. There were no significant differences between 36,5 ° C (81,11%) or 38,5 ° C (84,41%) incubation temperatures in IVM in terms of full cumulus expansion. Since the heat shock 70 protein band image of bovine oocytes matured at different temperatures could not be obtained after Western blot analysis, the effects of different incubation temperatures on bovine oocytes of heat shock protein 70 could not be determined.

June 2018, 83

Key Words: Oocyte Maturation, Culture Temperature. Heat Shock Protein 70, Western Blott

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın her aşamasında yardımcı olan, benden desteğini esirgemeyen, bütün bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak çalışmalarımaya yön veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet KURAN'a,

Çalışmalarımın başından sonuna kadar bana yardımcı olan ve önerilerinden faydalandığım çok değerli hocam Doç. Dr. Uğur ŞEN'e, Arş. Gör. Zafer SEÇGİN'e, Yüksek Lisans eğitimim süresince yanımda olarak bana destek veren, ihtiyacım olan her anda yardım ve dualarını esirgemeyen dostlarım Rabia YAŞAR, Özlem YETGİN Neslihan AKARSU, Merve AYDIN ve Selin KARAKÜTÜK'e,

Hiçbir konuda benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman en iyiye ulaşmam için bana yol gösteren, fedakârlıktan kaçınmayan ailem Pervin- Sedat BULUT ve kardeşlerim Barış ve Gülizar BENER'e teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması, PYO. ZRT. 1904. 17. 031 nolu Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Aralık 2018, Samsun

Leyla BENER

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	iii
ETİK BEYAN.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER.....	xii
2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI.....	4
2.1 Oosit Olgunlaşması.....	4
2.1.1. Çekirdek (Nükleer) olgunlaşma.....	4
2.1.2. Sitoplazmik olgunlaşma.....	5
2.2. <i>İn vitro</i> Olgunlaşmayı Etkileyen Faktörler.....	6
2.2.1. Vericisinin yaşı ve fizyolojik durumu.....	6
2.2.2. Kızgınlık döngüsü ve folliküler dalgalanma.....	6
2.2.3. Follikül ve oosit büyüklüğü.....	7
2.2.4. Kumulus oosit büyüklüğü.....	7
2.2.5. Oosit kalitesi.....	8
2.2.6. Olgunlaşma süresi.....	8
2.2.7. Nem ve çevresel gaz bileşimleri.....	8
2.2.8. Olgunlaşma ortamlarının ozmotik değeri.....	9
2.2.9. <i>İn vitro</i> olgunlaşma ve olgunlaşma sistemleri.....	9
2.2.10. Olgunlaşma amacıyla kullanılan <i>in vitro</i> ortamlar.....	9
2.2.11. Protein (fötal buzağı serumu ve serum albumin) katkıları.....	10
2.2.12. Sıcaklık.....	10
Şekil 2.2. Domuz ovaryumunun termografik fotoğrafı (Hunter vd, 2006'dan alınmıştır).....	11
2.6. Isı Şok Proteinleri.....	13

2.3.1. Isı şok protein çeşitleri.....	15
2.3.1.1. Isı şok protein 100 (HSP 100).....	15
2.3.1.2. Isı şok protein 90 (HSP 90).....	16
2.3.1.3. Isı şok protein70 (HSP 70).....	16
2.3.1.4. Isı şok protein 60 (HSP 60).....	17
2.3.1.5. Küçük ısı şok proteinler (HSP 60>).....	17
2.4. Isı Şok Proteinlerin Genel Özellikleri.....	18
2.5. Isı Şok Proteinlerinin Görevleri	18
2.5.1. Isı şok proteinleri ve homeostazis.....	22
2.5.2. Isı stresi ve in vitro embriyo	23
2.5.3. Stres durumunda serbest radikal oksijenleri (SOR).....	23
2.5.4. Isı şok proteininin gen transkripsiyonu.....	24
2.6. Isı Şok Proteinleri ve Gametogenesis	25
2.6.1. Isı şok proteinlerin ifadesi ve spermatogenezis	25
2.9.2. Isı şok proteini ve oogenesis	25
2.7. Isı Şok Proteinlerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler	26
2.7.1. Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	26
2.7.2. Western blot yöntemi.....	27
2.8. Amaç.....	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	29
3.1. Kullanılan Medyum ve Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.1.1. Ovaryum taşıma çözeltisinin (Serum fizyolojik) hazırlanması	29
3.1.2. Oosit arama medyumunun hazırlanması.....	29
3.1.3. Stok Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisinin (PBS) Hazırlanması	29
3.1.4. <i>In vitro</i> oosit olgunlaştırma medyumunun hazırlanması	29
3.1.5. Hyarulinidaz çözeltisinin hazırlanması.....	30
3.1.6. Tris-HCl 1,5 molar çözeltisinin hazırlanması.....	30
3.1.7. Amonyum persulfat (APS) hazırlama.....	30
3.1.8. Tris-HCl 0,5 molar çözeltisinin hazırlanması.....	30
3.1.9. Akrilamid –bisakrilamid çözeltisinin hazırlanması	30
3.1.10. Destaining tampon (500 ml) çözeltisinin hazırlanması	31
3.1.11. Coomassie R-250 (250 ml) çözeltisinin hazırlanması.....	31
3.1.12. Running tampon (5X) çözeltisinin hazırlanması	31

3.1.13. Running tampon (1X) çözeltisinin hazırlanması	31
3.1.14. 1X Lyzis tampon çözeltisinin hazırlanması.....	31
3.1.15. Transfer tampon çözeltisinin hazırlanması 1X (TBS)	31
3.1.16. Transfer tampon tween 20 çözeltisinin hazırlanması (TBST)(500 ml)	32
3.1.17. Blocking tampon çözeltisinin hazırlanması	32
3.1.18. Bradford çözeltisinin hazırlanması	32
3.1.19. Stok standart protein çözeltilerinin hazırlanması (Bradford yöntemi için)	32
3.1.20. Fosfat tuz tampon çözeltinin hazırlanması (PBS 1X).....	32
3.1.21. İmmünolojik saptama çözeltinin hazırlanması	32
3.2. Yöntem	33
3.2.1 Ovaryumların laboratuvara getirilmesi	33
3.4. Olgunlaşma Kriterinin Belirlenmesi.....	35
3.5. Oositlerde Protein İzolasyonu.....	36
3.6. Bradford Protein Analiz Yöntemi.....	37
3.7. Poliakrilamid Jel Hazırlama	37
3.8. Bradford Analiz Sonucunun Değerlendirilmesi	39
3.9. Western Blott Analizleri	40
4. BULGULAR.....	43
4.1. Kullanılan Sığır Ovaryumu ve Elde Edilen KOK'ların Sayıları	43
4.3. Isı Şok Proteini 70 Seviyesi	44
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ	49
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER DİZİNİ

Simge	Açıklama
%	Yüzde
μg	Mikrogram
$^{\circ}\text{C}$	Santigratderece
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
Na	piruvat
O	Oksijen
CO_2	Karbondioksit
Na_2HPO_4	Sodyum Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür

KISALTMALAR

Gr	Gram
Lt	Litre
Mg	Miligram
ml	Mililitre
BSA	Sığır Serum Albümin
ECS	Kızgın İnek Serumu
FCS	Fötal Buzağı Serumu
KOK	Kumulus Oosit Kompleksi
M II	Metafaz II
M I	Metafaz I
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi
TCM	Doku Kültür Medyumu
ZP	Zona Pellusida
Tris-HCl	Tris Hidroklorik Asit
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
LH	Lüteinleştirici Hormon
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
FSH	Folikül Stimule Edici Hormon
EGF	Epitelyal Büyüme Faktörü
GVBD	Germinal Vezikül Yıkılmanması
OPU	Oyum Pick- up
LOS	Büyük Yavru Sendromu
HSP	Isı Şok Protein

HSF	Isı Şok Faktörü
kDA	Kilo Dalton
APS	Amonyum Persulfat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Memeli oositinin nükleer olgunlaşması	5
Şekil 2.2. Domuz ovaryumunun termografik fotoğrafı	11
Şekil 2.3. Isı şok proteinin protein katlanmasındaki rolü: Isı stresine maruz kalan proteinlerin yapısında meydana gelen denatürasyon veya doğru katlanmamış proteinlerin doğru katlanmasındaki ısı şok proteinleri rolü.....	19
Şekil 3.1. a) Ovaryumların su banyosuna bırakılması.....	33
b) Ovaryumun görüntüsü.....	33
Şekil 3.2. a) Oositlerin enjektör yardımı ile aspire edilmesi.....	34
b) Oositlerin stereo mikroskopta incelenmesi ve pipet yardımı ile alınıp yıkama işlemi için başka bir petriye alınması.....	34
Şekil 3.3. a) Olgunlaşma medyumuna antibiyotik eklenmesi hazırlanması.....	35
b) Olgunlaşma medyumunun filtre edilmesi.....	35
c) Olgunlaşma medyumunun dört gözlü petriye aktarılması.....	35
d) Olgunlaşma medyumunun inkübatöre bırakılması.....	35
Şekil 3.4. a) Oositlerin yıkama medyumunun görüntüsü.....	35
b) Stereo mikroskopta stereo mikroskopta kumulus hücrelerinin görüntüsü.....	35
Şekil 3.5. Olgunlaşmaya bırakılan oositlerin kumulus oosit kompleksinin genişlemesinin stereo mikroskop altındaki görüntüsü.....	36
Şekil 3.6. Poliakrilamid jel görüntüsü	38
Şekil 3.7. poliakrilamid jelinin hazırlanmasında kullanılan elektroforez.....	48
Şekil 3.8. A) Düşük sayıdaki oosit sayısının jel görüntüsü B) Fazla sayıdaki oositlerin jeldeki görüntüsü	39
Şekil 3.9 Western blot analizleri Sonucu membran görüntüsü.....	40

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Isı Şok Proteinlerinin Moleküler Büyüklüğü, Hücredeki Yeri ve Görevi.....	21
Çizelge 4.1. Farklı sıcaklıklarda (36,5 °C veya 38,5 °C) olgunlaştırılan sıgır oositlerinin kumulüs ekspansiyonuna göre olgunlaşma oranları.....	42



1.GİRİŞ

Uzun yıllardır çiftlik hayvanlarında verim seviyesinin hızlı bir şekilde artırılması ve üreme performansını iyileştirilmesi amacıyla çeşitli biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır (Akyol, 2006). Çiftlik hayvanlarında süperovulasyon, embriyo transferi, embriyo, oosit ve sperm dondurma, *in vitro* embriyo kültürü, klonlama, transgenik hayvan üretimi ve kök hücre uygulamaları gibi çeşitli biyoteknolojik çalışmalar yapılmaktadır (Gordon, 2003). Biyoteknolojik gelişmelere paralel olarak memelilerde fertilizasyonun anlaşılmasıyla birlikte üreme biyoteknolojilerinin gelişim süreci ve *in vitro* koşullarda embriyo geliştirme fikri ortaya çıkmıştır (Gordon, 2003).

Günümüzde üreme biyoteknolojilerinin uygulanmasındaki başarı düzeyinde istenilen seviyeye ulaşılamamıştır (Lojkić vd, 2016). Örneğin *in vitro* embriyo üretiminde ulaşılan blastosist verimi düzeyi % 30-50 arasında değişmekte olup gebelik oranı ise embriyo transferinden sonra doğal çiftleşmedeki gebelik oralarından çok düşüktür (Lojkić vd, 2016). *In vitro* ortamda kumulus oosit komplekslerinin (KOK) olgunlaştırılması ortamın *in vivo* koşullara uyumlu veya benzer olmasını gerektirmektedir. KOK'lar *in vitro* olgunlaşma ortamında strese girmemeli ve gelişimini başarı ile devam ettirebilmesi için koşullar uygun hale getirilmelidir.

Yapılan çalışmalar sığır (Badinga vd, 1985), domuz (Omtvedt vd, 1971) ve koyun (Dutt, 1963) gibi çiftlik hayvanlarında yaz mevsiminde fertilitenin diğer mevsimlerden daha düşük olduğu bildirilmiştir (Wang vd, 2009). Isı stresinin fertilite sürecinde sadece hormonal salgıyı (Wolfenson vd, 2000) ve embriyo gelişimini (Edward ve Hansen, 1997; Rivera ve Hansen, 2001) etkilemediği, aynı zamanda oosite de zarar verdiği belirlenmiştir. Al katanani vd (2002) yaz mevsiminde sığır ovaryumlarından toplanan oositlerin *in vitro* koşullarda blastosist ve fertilizasyon oranını düşürdüğü belirlenmiştir.

Memeli oositlerinde başarılı bir *in vitro* olgunlaştırma (hem sitoplazmik hem de nükleer olgunlaşma) embriyonik ve fetal gelişim üzerine olumlu etki yapmaktadır (Sagirkaya vd, 2007). *In vitro* koşullarda sağlıklı embriyo elde edilmesi ve yüksek başarı oranı KOK'lerinin vücut içerisindeki olgunlaşma süreçlerinin tam olarak

bilinmemesiyle yüksek oranda ilişkili olduğu bildirilmektedir (Akyol, 2005). *In vitro* olgunlaştırma da KOK olgunlaşmasını veya embriyonun gelişimini sadece kültür ortamına ilave edilen katkı maddeleri değil aynı zamanda kültür ortamının sıcaklığı da önemli oranda etkileyebilmektedir (Şen, 2014).

Yapılan çalışmalar hücre kültürlerinde hücrelerin stres durumundan korunmak için stres proteini ürettiği bildirilmiştir (Whitley vd, 1999; Lopes ve Hansen 2002). Organizmayı çevresel stresten koruyan ısı şok proteinlerinin yüksek sıcaklık ve diğer stres faktörlerine maruz kalındığında yüksek oranda sentezlendiği belirlenmiştir (Neuer, 1999). Yapılan çalışmalar memeli embriyo gelişimi ve fertilizasyon sürecinde bu proteinlerin önemli rolü olduğunu belirlenmiştir (Matwee vd, 2001). Sıcaklığa bağlı stres durumunda ısı şok proteinleri ilk kez 1974 yılında *drosiphila*'da (sirke sinegi) tespit edilmiştir (Tissières vd, 1974). Daha sonra bugüne kadar hücrelerin olgunlaşma, gelişim ve büyüme sürecinde meydana gelen değişiklikleri belirlemek ve stres şartlarında proteinlerin hücredeki miktarını ve görevini belirlemek için birçok araştırma gerçekleştirilmiştir (Morimoto vd, 1986; Feige vd, 1996; Camargo vd, 2007; Edwards ve Hansen 1996; Whitley vd, 1999; Petrof vd, 2004; Zhang vd, 2009). Yardımcı üreme tekniklerden biri olan *in vitro* embriyo üretim sürecinin herhangi bir aşamasında strese maruz kalan oosit veya embriyonun ısı şok proteini üretip üretmediğini belirlemek *in vitro* embriyo üretimindeki başarı oranını büyük oranda etkileyebilir.

Isı şok proteini 70 hücrelerin yüksek ısı maruziyetine karşı kendilerini korumak ve herhangi bir hücresel yapısına veya sahip olduğu genetik materyale (DNA, RNA) zarar vermemesi için ürettiği bir proteindir (Verbeke vd, 2001). Bu sebeple bu proteinlerin yüksek miktarlardaki varlığı hücrenin stres altında olduğunun en büyük göstergelerindendir. Son zamanlarda günümüz *in vitro* embriyo üretiminin olgunlaştırma aşamasında oositin ve sonraki kültür ortamında embriyonun metabolik veya biyokimyasal aktivitesini değiştirebilecek sıcaklıkların kullanıldığı iddia edilmektedir (Edwards ve Hansen, 1996). Yapılan çalışmalar ovaryum içerisinde bulunan foliküllerin vücut sıcaklığından yaklaşık 1,5-2 °C daha soğuk olduğunu ve yumurta kanalı boyunca sıcaklığın kademeli olarak (ishmus ampulladan yaklaşık 0,43 °C daha soğuk ve her ikisi rektal sıcaklıktan yaklaşık 1-1,5°C daha soğuk) vücut sıcaklığına yükseldiğini saptamıştır (Einer-Jensen ve Hunter, 2006; Ye vd, 2007).

Fakat günümüz *in vitro* embriyo üretiminin olgunlaştırma aşamasında ve kültür aşamasında sadece vücut sıcaklığı kullanılmakta bu da oositin veya embriyonun metabolik veya biyokimyasal aktivitesini değiştirebilecek serbest oksijen radikallerin ortaya çıkmasına ve oosit ve embriyoda DNA hasarlarına ve bunun bir sonucu olarak ölüme varan durumlar ile karşılaşmaktadır. Yapılan çalışmalar düşük kültür sıcaklığında olgunlaştırılan sığır oositlerinin geleneksel kültür sıcaklığında olgunlaştırılan oositler ile benzer oranda nükleer olgunlaşma sergilediğini göstermiştir (Ravindranatha vd, 2003; Sen ve Kuran, 2013). Dahası düşük kültür sıcaklığında olgunlaştırılan sığır oositlerinin *in vitro* fertilizasyon sonrasında geleneksel kültür sıcaklığında olgunlaştırılanlar ile benzer embriyonik gelişim sergilediği bildirilmiştir (Sen ve Kuran, 2013).

Bu çalışma, *in vitro* olgunlaştırma aşamasında uygulanan farklı kültür sıcaklıklarının oositlerde üretilen ısı şok protein 70 üzerine olabilecek etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Böylece, farklı kültür sıcaklıklarında olgunlaştırılan sığır oositlerinde bir stres göstergesi olan ısı şok protein 70 in belirlenmesi oositlerin farklı sıcaklıklardaki kültür ortamlarında strese girip girmediğinin önemli bir göstergesi olacaktır. Böylece farklı sıcaklıklara oositlerin verdiği tepkileri belirlemek çiftlik hayvanlarında maksimum embriyo üretimi sağlayabilecek optimum olgunlaştırma sıcaklığının belirlenmesinde önemli rol oynayacaktır. Dolayısıyla *in vitro* embriyo üretiminin olgunlaştırma aşamasına uygulanan düşük sıcaklığın kültürdeki gelişimi iyileştirmek suretiyle blastosist eldesini artırmakla birlikte erken embriyonik ölümlerin önüne geçilebilmesi mümkün olabilir.

2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI

2.1 Oosit Olgunlaşması

Oosit olgunlaşma süreci nükleer olgunlaşma ve sitoplazmik olgunlaşma olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Oositler, mayoz bölünme ile dişi germ hücresi olan oositin, $2n$ kromozom sayısını yarıya indirgeyerek n kromozomlu hücre oluşumu ile biten bölünme sürecidir. Mayoz bölünme dişilerde fetal gelişim ile başlar ve mayoz bölünmenin profaz I evresinde durur. Dişi pubertas çağına ulaştığında ise bu süreç devam eder. Mayoz germinal vezikülün yıkımlanması ve kutup cisimciğinin atılması ile tekrar başlar. Bu dönemde ovulasyona uğrayan oosit mayozun metafaz II safhasında durur ve fertilizasyon ile mayoz bölünme tamamlanır ve pronükleuslar oluşur. Sığır oositlerinin *in vitro* olarak olgunlaştırılma süreci birçok araştırmacı tarafından; 18-20 saat (Van der Westerlaken vd, 1992; Semple vd, 1993), 22 saat (Duby vd, 1995), 20-22 saat (Birler vd, 1998), 24-26 saat (Saeki vd, 1990) olarak bildirilmiştir.

2.1.1. Çekirdek (Nükleer) olgunlaşma

Çekirdek olgunlaşması, oosit çekirdeğinin germinal vezikül safhasından metafaz II (M II) safhasına geçişi olarak tanımlanmaktadır (Şen, 2014). Oosit çekirdeği germinal vezikül (GV) olarak tanımlanmaktadır. Mayoz bölünmenin diakinesis aşamasından diploten aşamasına geçişi ile germinal vezikül yıkımlanması (GVBD) gerçekleşir. Diakinesis boyunca çekirdek zarı katlanmaya başlar ve çift katlı lipit zar erimesiyle birlikte porlar kaybolmaya başlar. Memeli oositlerinde çekirdek olgunlaşması mayozun metafaz II safhasında durmaktadır. Sığır oositlerinin çekirdek olgunlaşması yaklaşık 24 saatte tamamlanmaktadır (Sirard vd, 2007). Sığırlarda GVBD, oositin follükülden ayrılması esnasında ya da LH uyarımından hemen sonra gerçekleşmektedir. GVBD' yi takiben kromozomlar daha yoğun hale gelmekte ve Anafaz I safhasında kromozomların ayrılması ve kutuplara çekilmesi gerçekleşmektedir. Telofaz I safhasında ise kromozomlar kutuplarda nükleer zarla sarılı bir şekilde bulunmaktadır. İkinci mayotik bölünme kromozom replikasyonu gerçekleşmeden oluşur ve oositler M II safhasına ulaşır. Oositler fertilizasyona kadar metafaz II safhasında kalırlar. *In vitro* ortamda kültüre edilen kumulus-oosit

kompleksinin kendiliğinden mayozu devam ettirme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Şen, 2014). Oosit olgunlaşma safhaları şekil 2.1 de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Memeli oositinin nükleer olgunlaşması

2.1.2. Sitoplazmik olgunlaşma

Sitoplazmik olgunlaşma, oositin GV safhasından M-II safhasına, olgun bir oosit oluncaya kadar geçirmiş olduğu hücresel değişimleri ifade etmektedir (Akyol, 2006). Oositte kutup cisimciğın oluşmasıyla birlikte perivitellin boşluğın genişlemesi, mitokondrilerin sayılarının artması ve golgi kompleksinden kortikal granül salınmasıyla birlikte sitoplazmik olgunlaşma görülür. Sitoplazmik olgunlaşma üç aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada mitokondriler oositin gelişimi ile hücre içerisinde dağılmaya başlar ve endoplazmik retikulumla yaklaşmaktadır (Şen, 2014). Mitokondrilerin hücrede kortikal granüllerin, golgi kompleksinin ve zona pellusidanın oluşumundan sorumlu olduğu bildirilmiştir (Shamsuddin vd, 1993). İkinci aşamada lipid keseleri ve lipid damlacıkları azalmakta ve sitoplazmanın hücre zarına yakın bölgelerine yönelirler. Üçüncü aşamada kortikal granüller hücre zarına doğru hareket etmeleri ile sitoplazmik olgunlaşma tamamlanmaktadır (Shamsuddin vd, 1993).

2.2. *In Vitro* Olgunlaşmayı Etkileyen Faktörler

2.2.1. Vericisinin yaşı ve fizyolojik durumu

Pubertasa ulaşmış düveler ve inekler oosit vericisi olabilirler. Oosit vericisi olabilmek için, ovaryumlarda antral folliküllerin bulunması yeterlidir. Sayı ve kalite bakımından vericilerden toplanan oositlerde farklılık olabilmektedir. Bunun nedeni vericilerin genetik karakterleri, bakım ve beslenme koşullarındaki farklılıklardır. Sağlık durumu ve beslenme şartları iyi olan vericilerden toplanan oositin sayı ve kalitesi yüksek olmaktadır (Galli ve Lazzari, 1996). Hayvanlardan pubertas öncesi oosit toplanabilse de elde edilen oositlerde yeteri düzeyde hormon reseptörü bulunmaması nedeniyle bunların olgunlaşma yetenekleri düşük olabilmektedir (Nagai, 2001). Al-Katanani vd (2002) sıcaklık stresi altındaki sığırların ovaryumlarından elde edilen oositlerin, olgunlaşma ve embriyo oluşturma yetenekleride azalma olduğunu bildirmiştir..

2.5.2. Kızgınlık döngüsü ve folliküler dalgalanma

Kızgınlık döngüsünün folliküler safhasında foliküler gelişimle birlikte gonadotropin salgılanmasında yükseliş görülmektedir (Akyol ve Sulu, 2004). İneklerin ortalama % 70'inde iki, % 30'unda ise üç folliküler dalgalanma olurken, dört folliküler dalga nadiren görülmektedir (Hagemann, 1999). Gonadotropin yükselişinin ardından folliküler gelişim başlar ve bir grup follikül aynı anda gelişmeye başlar. Bu folliküllerin çapları 2-4 mm kadar olmaktadır. Gelişmeye başlayan follikül grubunun içinden bir follikül dominant hale gelir. Dominant follikülün büyüme süreci içerisinde ikincil folliküller (subordinate follicles-SF) ve ardışık folliküler dalga baskılanır. Gelişimi baskılanan ikincil folliküller atrezi olurlar. Dolayısıyla atrezi safhasına giren ve ikincil foliküllerden elde edilen oositlerin *in vitro* gelişim kapasiteleri düşük olmaktadır (Akyol vd, 2005). Bu yüzden, henüz foliküler fazda yani atrezi dönemine girmeden önceki safhada, oosit toplanmasının daha yüksek olgunlaşma oranı sağlayacağı bildirilmiştir (Kojima, 1999).

2.2.3. Follikül ve oosit büyüklüğü

In vitro olgunlaştırmada embriyo üretimi amacıyla 2-8 mm çapındaki folliküller kullanılmaktadır. Antral folliküllerden çapı 2 mm'ye kadar olanlarda gelişim için gerekli mikro çevre şartları henüz oluşmadığından, olgunlaşma yetenekleri çok düşük olmaktadır. Bunun nedenlerinden biri büyüme sürecinde olan oositin yeteri düzeyde RNA sentezi yapamamış olmasıdır (Akyol vd, 2005).

2.2.4. Kumulus oosit büyüklüğü

Ovaryumda bulunan folliküler üç çeşit hücreden oluşmaktadır. Bunlar; granuloza hücreleri ve teka (interna ve eksterna) hücreleridir. Granuloza ve teka hücreleri birlikte mayotik dinlenme süreci içinde oositin ihtiyaçlarının karşılanmasına, olgunlaşmaya başlayan oositlerin gelişim yeteneği kazanmasına yardım ederler. Granuloza hücreleriyle birlikte oosite kumulus oosit kompleksi (KOK) denilmektedir (Akyol ve Sulu 2004). Granuloza hücreleri aracılığı ile oosit, parakrin, otokrin hormonlar ve büyüme faktörleri ile dolaylı olarak ilişki halindedirler. Ayrıca kumulus hücreleri ile oosit, kendine has bir bağlantı sistemi sayesinde doğrudan bağlantı halindedir (Hagemann, 1999). Kumulus hücreleri, RNA sentezinde ayarlayıcı bir role sahiptir (Gordon, 2003; Kanagawa vd, 1995). Teka ve granuloza hücreleri folliküler steroid sentezinde önemli rol oynamaktadır. Teka hücreleri, progesteronlardan androjenleri sentezleyebilmekte fakat aromataz yetenekleri düşük olmaktadır. Granuloza hücreleri ise progesteronlardan androjenleri sentezleyememelerine rağmen sahip oldukları yüksek aromataz aktivitelerinden dolayı eksojen androjenleri östrojenlere çevirebilirler. Bu özelliklerinden dolayı kumulus hücreleri uzaklaştırılmış foliküllerde olgunlaşma ve fertilizasyon yetenekleri çok düşük kaldığı bildirilmiştir (Akyol ve Sulu, 2004). Kumulus hücreleri oositin yeterli gelişim kapasitesine ulaşması ve beslenmesi açısından önemli bir role sahiptir. Olgunlaşmamış oositte, glutasyon oranı düşük olmakla birlikte bu oran olgunlaşma sürecinde yükselir ve ikinci metafaz safhasında en yüksek seviyesine ulaşır. Glutasyon, fertilizasyonda spermatozoon kromatinlerinin dekonduksiyonu ve histonlar tarafından protaminlerin yer değiştirmesi süresince disülfid bağlarının azaltılmasından sorumludur.

2.2.5. Oosit kalitesi

Brackett ve Zuelke (1993) oositlerin kalitelerini değerlendirirken, kumulus hücresi ve sitoplazmayı dikkate almışlardır. Memeli oositlerinin kalite sınıflandırması dört farklı (1, 2, 3, 4 veya A, B, C, D) şekilde yapılmaktadır (Brackett ve Zuelke, 1993). Bu sınıflamaya göre üç ve dördüncü grup çok düşük *in vitro* olgunlaşma yeteneğindedir. Homojen görünümlü bir sitoplazma, oositi çevreleyen, bozulmamış ve kompakt yapıda kumulus hücreleri, olgunlaşmamış olan oositin olgunlaşma ve embriyonik gelişim yeteneğinin en önemli belirtisi olduğu söylenmiştir (Younis vd, 1989). Dolayısıyla sitoplazması homojen görünüşte, zona pellusidaya sıkıca tutunmuş ve kompakt yapıda kumulusa sahip oositler iyi kalitede (1, 2 veya A, B), heterojen sitoplazmalı ve genişlemiş kumulus hücrelerine sahip oositler de düşük (3, 4 veya C, D) kalitede oositler olarak sınıflandırılmaktadır (Akyol, 2005).

2.2.6. Olgunlaşma süresi

In vitro olgunlaşmaya bırakılan olgunlaşmamış sığır oositlerinde, 0-6 saatlerde germinal vezikül oluşumu, 6-8 saatlerde germinal vezikül yıkımı, 10-15 saatler arasında birinci metafaz, 15-18 saatler arasında birinci anafaz ile telofaz ve 18-24 saatler arasında da ikinci metafaz safhasına geçilir. GVBD ve birinci polar cisimciğın atılması, kumulus hücrelerinin ekspansiyonu ile ilgilidir. Sığır oositlerinin *in vitro* olgunlaşmasında, olgunlaşma zamanı olarak 18 saatten 27 saate kadar değişen sürelerin etkili olduğu ve çoğunlukla 22-24 saat dilimleri kullanılmaktadır (Gordon, 1994; Birler vd, 1998).

2.2.7. Nem ve çevresel gaz bileşimleri

İnkübatör ortamında, olgunlaşmaya alınan oositlerin inkübatör ortamının pH'sı çevresel nemin % 95'in üzerinde olması gerektiği bildirilmiştir (Nagai, 1999). Yüksek oksijen konsantrasyonunun, oositler üzerindeki olumsuz etkisini azaltmak amacıyla *in vitro* embriyo kültür ortamında % 5 CO₂, % 5 O₂ ve % 90 N₂ bileşimi kullanılmaktadır. Yüksek oksijen konsantrasyonu, oosit olgunlaşmasını düşürdüğü bildirilmiştir (Nagai, 1999). Oosit olgunlaştırılmasında *in vitro* kültür koşullarında

atmosferik oksijen oranı (% 20) yüksek kabul edilmekle birlikte % 5 oksijen düzeylerinin en uygun olgunlaşma oranını sağladığı bildirilmiştir (Şen, 2014).

2.2.8. Olgunlaşma ortamlarının ozmotik değeri

İn vitro kültür ortamlarının oosit için optimum olması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan ortamların ozmotik basıncı, vücut sıvılarının sahip olduğu değere yakın olarak hazırlanması gerekmektedir. Hiperozmotik olgunlaşma medyumları içerisinde yapılan kültürün de belirgin oranda, dejenere oosit varlığı gözlenmiştir (Bae vd Foote, 1980). Yüksek ozmolariteye sahip kültür medyumlarında oositin gelişme yeteneğinin önemli oranda düştüğü bildirilmiştir (Mazur ve Schneider, 1986; Gardner, 1998).

2.2.9. *İn vitro* olgunlaşma ve olgunlaşma sistemleri

Oositler, olgunlaştırma ortamlarına değişik şekillerde yerleştirilerek inkübe edilebilmektedir. Kültür ortamında bulunan besin miktarının yeterlilik oranına göre oosit inkübasyona alınır. Bunun için; 35 mm petri kutularında 50- 100 µl medyum 20- 30 oosit sayısı tercih edilirken, pH'ın daha stabil tutulabildiği 600 µl medyum 100 oosit tercih edilmektedir (Kanagawa vd, 1995).

2.2.10. Olgunlaşma amacıyla kullanılan *in vitro* ortamlar

Sığır oositlerinin olgunlaştırılmasında kullanılan ortamlar; basit ve bileşik olarak sınıflandırılır (Abdoon, 2003). Basit olgunlaşma ortamları, bikarbonat tampon sistemlerinin kullanıldığı temel fizyolojik tuzlardan oluşan sistemlerdir. Bu ortamlara piruvat, laktat tuzları ve glukoz da ilave edilebilir. Basit olgunlaşma ortamları arasındaki farklılık, içerdikleri iyon düzeyleri ve enerji verici kaynaklarının çeşitlilik göstermesindedir (Abdoon, 2003). Bileşik olgunlaşma ortamları; basit ortam içeriklerine ilave olarak amino asitler, vitaminler, pürinler ve serum içerisinde bulunan diğer maddeleri içermektedirler. Bileşik olgunlaşma ortamlarından en yaygın olarak kullanılanı TCM-199'dur. Ham's F-10, Menezo-B2 vasatı ise bileşik olgunlaşma ortamlarına örnek verilebilir (Brackett vd, 1989; Liu vd, 1991).

2.2.11. Protein (fötal buzağı serumu ve serum albumin) katkıları

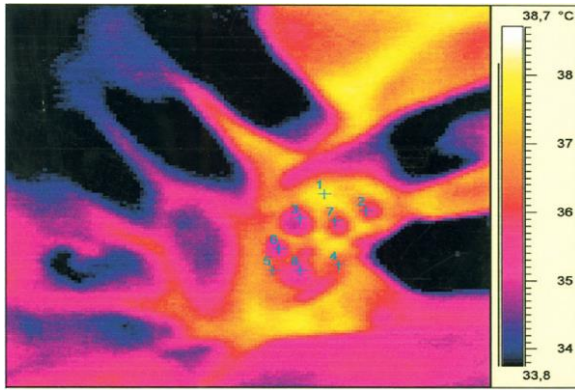
Embriyo kültüründe, ortamda protein olmaması durumunda istenmeyen değişik türde metabolik aktiviteler ve gelişim yeteneğinin düşmesi gibi olumsuzluklar gözlenebilmektedir. Fötal buzağı serumu (FCS), östrustaki inek serumu (ECS), süperovulasyon oluşturulmuş inek serumu, kastre öküz serumu gibi serumlar olgunlaşma ortamlarına eklenebilmektedirler. Serum kaynağı olarak fötus, yeni doğan buzağı ve seksüel siklusunun değişik evrelerinde olgun inek ve düveler kullanılabilir. Ancak bu değişik dönemlerde, hayvanlardan elde edilen serum içeriği özellikle de hormon düzeylerinin doğal olarak farklılık gösterebildiği bildirilmiştir. Örneğin, fötusta kan parametreleri anne ile büyük oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Nakada vd, 2000). Kültür ortamlarına, serum ve sığır serum albumini (BSA) eklenmesi oositlerin olgunlaşmasına yardımcı olmaktadır. *In vitro* oosit olgunlaştırmasında en çok tercih edilen protein kaynağı fötal buzağı serumudur (Ocana vd, 1999; Gomez ve Diez, 2000). *In vitro* olgunlaşma da fötal buzağı serumunun (FCS) sığır serum albumininden (BSA) daha yüksek başarıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca LH ve östrustaki inek serumu (ECS) ile birlikte kullanıldığında elde edilen fertilizasyon oranının yüksek olduğu, östrustaki inek serumu katkısıyla da ilk bölünme oranının önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Schellander vd, 1990; Zuelke ve Brackett, 1990). Olgunlaşma ve kültür aşamalarında serum kullanımı, birçok riski de beraberinde getirmektedir. Serum gibi biyolojik ürünlerin kullanımıyla, mikrobiyal kontaminasyonlar oluşabilmektedir. *In vitro* fertilizasyon tekniği ile elde edilen gebelik süresinin değişiklik göstermesi, yavru atımı oranının yüksek olması ve normalden büyük fötus gelişimi (large offspring sendromu) gibi anormalliklerin *in vitro* oosit olgunlaştırmasında kültür ortamına serum ilavesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bu olumsuzlukların önlenmesi amacıyla serumsuz kültür ortamları ve ya farklı protein kaynakları geliştirmeye çalışılmıştır (Hoshi, 2003).

2.2.12. Sıcaklık

Olgunlaşma ortamının sıcaklığı, oositin olgunlaşma ve fertilizasyon yeteneğini etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Germinal vezikül yıkımlanması (GBVD) ve birinci metafazın (MI) son safhaları oosit olgunlaşma sürecinde en hassas

dönemlerdir. Düşük sıcaklıklarda mayoz safhasında iğ iplikçiklerinin oluşumunu durdurmaktadır. Sığırlarda *in vitro* olgunlaşma süreci içerisinde, 39 °C vücut sıcaklığına yakın sıcaklık değerlerinde normal iğ iplikçikleri morfolojisinin korunduğu ve olgunlaşma oranının optimum olduğu bildirilmektedir (Ocana vd, 1999).

Memeli testislerinde spermatogenesis'in vücut sıcaklığından yaklaşık 2–2,5 °C altında gerçekleştiği ve yüksek sıcaklıktan kaynaklı stresin spermatogenesisi ve semen kalitesini olumsuz etkilediği bilinmektedir (Leese vd, 2008). Ancak, tavşan, domuz ve sığır gibi memeli hayvanların ovaryumundaki olgunlaşmış graff folliküllerin vücut iç sıcaklığından yaklaşık 1,5–2,0 °C daha soğuk olması memeli fertilitesinde ve *in vitro* embriyo üretiminde pek fazla dikkate alınmamaktadır (Leese vd, 2008). Çeşitli çiftlik hayvanlarında yapılan bazı çalışmalarda ovaryum üzerindeki olgunlaşmış graff folliküllerin vücut sıcaklığından tavşanlarda yaklaşık 1,4 °C (Grinsted vd, 1980), domuzlarda 2,4 °C (Hunter ve Nichol, 1986) ve sığırlarda 2,0 °C (Grondahl vd, 1996) daha soğuk olduğu bildirilmiştir. Dahası, (Hunter vd, 2006) ile (Ye vd, 2007) domuz ovaryumundaki folliküllerin, ovaryum stromasından daha soğuk olduğunu laparoskopik ultrason kullanarak termografik olarak görüntülemiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Domuz ovaryumunun termografik fotoğrafı (Hunter vd, 2006'dan alınmıştır)

Domuz ve çeşitli kemirgenler üzerine yapılan çalışmalarda ovidukt boyunca olan sıcaklığın kademeli olarak vücut sıcaklığına ulaştığını bildirmiştir (David vd,

1971; Hunter ve Nichol, 1986). Hunter ve Nichol, (1986) domuzlarda ovulasyon öncesi isthmus'un ampulladan yaklaşık 0,43 °C daha soğuk (0,2–0,7 °C aralığında) olduğunu ve çiftleşmeyi takiben bu sıcaklık farkının yaklaşık 0,69 °C'ye kadar (0,2–1,6 °C aralığında) yükseldiğini tespit etmişlerdir. Benzer olarak, (Bahat vd, 2005) tavşan ve ratlarda isthmus (spermin depolandığı yer) ile ampulla (fertilizasyonun gerçekleştiği yer) arasındaki sıcaklık farkının ovulasyon öncesinde yaklaşık 0,8 °C ovulasyon sonrasında yaklaşık 1,6 °C kadar yükseldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada isthmus ve ampullanın rektal sıcaklıktan sırasıyla yaklaşık 3,1 ve 2,0 °C daha soğuk olduğu rapor edilmiştir. İsthustaki bu düşük sıcaklığın spermanın ampulladaki fertilizasyon esnasındaki hiperaktivasyonundan önceki depolanması esnasında dinlenmesinde önemli bir role sahip olduğu iddia edilmektedir. Ayrıca oviduktaki sıcaklık farkının spermatozoa tarafından hissedilerek sperm hücrelerinin depolanma alanından fertilizasyon alanına geçişinde yol gösterici olduğu da iddia edilmektedir (Bahat vd, 2003; Eisenbach ve Giojalas, 2006).

Ovidukt kanalı boyunca olan sıcaklık farkının sperm hücrelerinin fonksiyonları için önemli bir role sahip olmasının yanında oosit ve erken embriyonik dönemdeki metabolizmayı düşürmesi açısından önemli bir role sahip olduğu iddia edilmektedir (Leese vd, 2008). Çünkü biyolojik organizmaların çoğu "Q10" sıcaklık katsayısı denilen 10 °C'ye kadar oluşan sıcaklık değişikliklerine kimyasal ya da biyolojik süreçlerinde 2–3 kata kadar azalan veya artan oranda cevaplar gösterebilmektedir (Leese vd, 2008). İnsanlarda vücut içi sıcaklığı ile ovidukt kanalının sıcaklığı arasındaki sıcaklık farkı konusunda tespit edilen herhangi bir çalışma bulunmamasına rağmen kademeli sıcaklık değişiminin diğer memeli türleri ile benzerlik göstereceği düşünülmektedir (Eisenbach ve Giojalas, 2006). Tahmini olarak insanlarda ovulasyon sonrası ovidukt kanalının sıcaklığının vücut iç sıcaklığından yaklaşık 1,5 °C soğuk olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, insan oositinin ve erken dönemdeki embriyo metabolizmasının vücut iç sıcaklığındakine (37 °C) göre % 15 daha düşük olacağı düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında *in vitro* embriyo üretimindeki süreçlerin (*in vitro* olgunlaşma ve *in vitro* fertilizasyon) 37 °C vücut sıcaklığı yerine 35,5–36 °C'de gerçekleştirilebilir mi sorusunu gündeme getirmektedir.

McEvoy vd, (2000) *in vitro* olgunlaştırmada kullanılan inkübasyon sıcaklığının *in vivo* gerçeklikten uzak olduğunu ileri sürmektedir. Çünkü, örneğin sığır ve domuz oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılmasında uygulanan inkübasyon sıcaklığının vücut sıcaklığına göre ayarlandığı ancak olgunlaşmış oositi barındıran graff follikülün iç sıcaklığının ovaryum stromasından veya vücut sıcaklığından yaklaşık 2–3 °C daha düşük olmasının dikkate alınmadığı bildirilmiştir (Grondahl vd, 1996; Hunter vd, 1997). Yapılan ilk çalışmalarda sığır ve domuz embriyoların düşük sıcaklıkta (37 °C’de geleneksel 39 °C olanın aksine) geliştirildiğinde, blastosist safhasına ulaşma oranında değişme olmaz iken amino asit tüketimi ve üretimi bakımından metabolizmayı yavaşlattığı bildirilmiştir (Sturmeiy vd, 2009). Bu bağlamda *in vitro* olgunlaştırma veya kültür aşamalarında uygulanan inkübasyon sıcaklıklarının embriyonik gelişim üzerine olabilecek etkilerinin incelenmesi önem arz etmektedir. *İn vitro* embriyo üretiminin oosit olgunlaştırma aşamasında uygulanan inkübasyon sıcaklığındaki değişimlere karşı (graff follikül sıcaklığı veya vücut sıcaklığı) ileriki dönemde embriyoların verdiği tepkilerin belirlenmesi, sağlıklı bir embriyonik gelişim için *in vitro* uygulamalardaki inkübasyon sıcaklıklarının yeniden tasarlanmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir (Leese vd, 2008). Sıcaklık stresinin embriyonunun hayatta kalması üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmalar ışığında (Hansen, 2007) farklı inkübasyon sıcaklıklarının gamet hücreleri veya embriyonik gelişim üzerine olan etkileri belirlenebilir.

2.6. Isı Şok Proteinleri

Ritossa (1962) *Drosophila melanogaster*’ın tükürük salgısından yüksek ısıya bağlı bir protein sentezlediğini tespit etmiştir (Ritossa, 1962). Bu doğrultuda laboratuvar şartlarında hücrenin stres etkeni ile karşılaştığı zaman yapısında protein miktarında artışlar meydana geldiğini belirlenmiş ve bu proteinler ısı şok proteinleri (HSP) olarak isimlendirmiştir (Yılmaz vd, 2005). Stresin hücrede protein yapısında moleküler hasar meydana getirdiği ve anormal protein katlanması sonucunda hücrede protein birikimine neden olduğu gözlemlenmiştir ((Whitley vd, 1999). Bu proteinler molekül ağırlıklarına göre boyutları 8- 150 kd arasında değişen ısı şok (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 ve küçük HSP’ler) proteinleri olarak isimlendirilmişlerdir. HSP’ler hücre içi, hücre dışı ve plazma membranı yerleşimli

olabilirler ((Whitley vd, 1999). Hücre içinde bulunanlar, hemen hemen her hücrenin sitoplazma, mitokondri, çekirdek gibi organellerinde bulunmaktadır (Petrof vd, 2004). HSP'ler hücre metabolizması kontrolünde anahtar rol oynamaktadırlar. Hücre metabolizmasında, sitoplazmasında, hücre yüzeyinde, hücrel redoks tepkimeleri durumunda, hücre iskeletinde, DNA sentezi sürecinde bir stres etkeni ile karşılaştığı zaman protein yapısında modifikasyonlar meydana gelebilmektedir. Bu durumda stres proteinleri hücre içerisinde birikir ve hücrede bir dizi ardışık stres yanıtının açığa çıkmasına neden olur (Verbeke vd, 2001). HSP hücrede; yeni sentezlenen proteinlerin katlanmasının düzenlenmesi, nükleer bütünlüğün ve matriks materyalinin korunması, yapısı bozulmuş proteinlerin onarılması, hasar görmüş proteinlerin elimine edilmesi, proteinlerin organellerde lokalizasyonu, organel alınması ya da organelden atılması gibi çok sayıda göreve sahiptir (Kaufmann, 1990). Ayrıca bu proteinler geri dönüşümsüz olarak hasara uğramış polipeptidlerin de sindirilmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir (Whitley vd, 1999).

HSP'ler ısı stresine yanıt olarak sentezlenirken, farmakolojik ajanlara, metabolik ve çevresel stresleri içeren iskemia, ağır metal iyonları, etanol, nikotin, viral enfeksiyonlar gibi durumlarda da sentezlenirler. HSP ailelerinden bazıları hücrede sürekli olarak sentezlenirken, bazıları ise yalnızca stres etkisi sonucunda sentezlenmektedir (Samali ve Orrenius, 1998). Büyük moleküler ağırlıklı ısı şok proteinlerinin (HSP 100, HSP 90 gibi) moleküler şaperonlar, ısı şokuna maruz kalan hücrelerin protein kümelenmesi ve katlanmaları durumlarında görev aldığı gözlemlenmiştir (Otake vd, 2006). HSP'lerin bir kısmının da yalnızca proteaz aktivitesi gösterdikleri ya da yıkılması gereken polipeptidlerin proteazlarla etkileşmelerine yardım ettikleri belirlenmiştir (Feder ve Hofmann, 1999). Çekirdekte ve kromatinin korunmasında hücre yapısı ile ilişkilendirilen ısı şok proteinlerinin önemli lokasyonlarından dolayı strese karşı hücreyi koruduğu düşünülmektedir (Velazquez ve Lindquist, 1984).

Organizmanın yaşamı boyunca HSP ailesi ve amino asit dizileri evrimleşme süreci boyunca önemli ölçüde korunmuştur (Sreedhar ve Csermely, 2004). Organizmalarda en iyi korunan ve en çok çalışılan grup HSP70 protein ailesidir (Neuer vd, 1999). HSP70 protein ailesi insanda en az 11 gen tarafından kodlanan

moleküler ağırlığı 66 ile 78 kD arasında değişen proteinleri içermektedir. Bu protein ailesinin indüklenebilir HSP70 (HSP72) ve bazal metabolizmada sentezlenen HSC70 gibi üyeleri sitoplazmada lokalize olurken, bir grup HSP70'de mitokondride (mtHSP70) ve diğer bir grup üyesi de endoplazmik retikulum üzerine yerleşmiştir (Jäättelä vd, 1998). Ökaryotik HSP70 proteini iki işlevsel bölgeye sahiptir. Bunlar; ATP'ye bağlanan -NH₂ terminal bölge (ABD) ve peptide bağlanan -COOH terminal bölge (PBD)'dir. Normal koşullarda HSP70 ailesine ait proteinler yeni sentezlenen proteinlerin düzgün katlanmaları, multiprotein komplekslerin oluşması, hücrel membranlardan proteinlerin taşınması gibi işlevlere sahip ATP bağımlı moleküler şaperonlardır (Shi ve Thomas, 1992). Bu proteinler HSP70'in PBD ya da ABD bölgelerine bağlanarak bu proteinin şaperon aktivitesini düzenleyebilir. Anti-kanser ilaçları hücreyi uyararak uyarının oranına bağlı olarak stresle indüklenen HSP70 sentezini artırabileceği bildirilmiştir (Schmitt vd, 2003). Enflamasyonu önlemek için hasar gören hücrelerin uzaklaştırılması için apoptozis meydana gelir, ısı şoku ya da stres yanıtı hücreyi hayatta tutmak üzere hasar gören hücrelerin kurtarılmasını sağlamaktadır. Stresin biyolojik sonuçları üzerinde baskın etkilere sahip olan bu iki süreç hücrenin geleceğini belirlemektedir (Beere vd, 2000). HSP'ler farklı apoptotik proteinler ile etkileşerek apoptozisin kritik durumlarda düzenleyici etki yapmaktadırlar (Parcellier vd, 2003). Apoptozisin düzenlenmesinde oldukça önemli role sahip olan ısı şok proteinleri hücrel koruyucu özelliklerinden dolayı apoptotik yanıtı inhibe etmektedirler. Ayrıca apoptozisin başlaması ve ilerlemesinde önemli görevler alan sinyal proteinlerinin şaperonları olarak görev alabilir ya da doğrudan apoptozisin ilerlemesine neden olabilirler (Sreedhar ve Csermely, 2004).

2.3.1. Isı şok protein çeşitleri

2.3.1.1. Isı şok protein 100 (HSP 100)

HSP100, golgi kompleksin de bulunur ve ısı stresi durumunda nükleusa transloke olmaktadır (Whitley vd, 1999). HSP100, moleküler şaperon özelliği göstererek protein kümelerinin ayrılması ve yeniden katlanmasında rol almaktadır. HSP100, aktin bağlayıcı proteinler kategorisinde çapraz aktin bağlayıcı yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Al-Katanani vd, 2002).

2.3.1.2. Isı şok protein 90 (HSP 90)

Memeli hücrelerinde en fazla bulunan ısı şok protein ailesidir. Moleküler şaperon özelliğinde olup, sinyal iletimi ve tümör yayılmasının önlenmesinde, proteinlerin katlanmasında görev aldığı ve hücrede bulunan en fonksiyonlu stres proteinidir (Zhang vd, 2009). HSP90 daha çok sitoplazmada nükleus çevresinde ve membrana yerleşmiştir. Endoplazmik retikulum üzerinde en çok bulunan proteindir (Whitley vd, 1999). HSP90'ın çeşitli ajanlarla inhibisyonu mitokondri membranında depolarizasyona neden olabilmektedir. Bu da HSP90'ın normal hücre mitokondrilerinde değil de tümör hücrelerindeki mitokondrilerde şaperon işlevlerinin kanser tedavisinde kullanılması bakımından önemli olabileceği düşünülmektedir (Kang vd, 2007).

2.3.1.3. Isı şok protein70 (HSP 70)

Omurgalılarda HSP ailelerinde en önemli üç protein ailesi HSP70, HSP90 ve küçük ısı şok proteinleridir (Morimoto vd, 1986; Feige vd, 1996). Organizmalarda en iyi korunan ve en çok çalışılan grup HSP70 protein ailesidir (Neuer vd, 1999). HSP70.1, memelilerde dört izoform tarafından kodlanan 70 kDa proteindir. Bunlar; HSPA-1A, 1B, 1C ve 1D genleri tarafından ifade edilmektedirler (James vd, 1997). Son zamanlarda HSP70 genin ifadesi amfibiler dahil (Simoncelli vd, 2010) domuz embriyoları (Bernardini vd, 2003), sığır oositleri (Camargo vd, 2007) ve embriyoları gibi farklı hayvan modellerinde çalışılmıştır (Edwards ve Hansen, 1996; Tavares vd, 2005). HSPA-1A, kimyasal, çevresel ve beslenme gibi çeşitli streslere karşı termotolerans sağlar ve sığır embriyolarında stres göstergesi olarak kullanılabilir (Wrenzycki vd, 2001; Oliveira vd, 2006). Tüm HSP'ler arasında, en fazla bulunan HSPA-1A çevre ısısına karşı duyarlıdır. Kemirgenlerde (Christians vd, 1995) sığırlar (Chandolia vd, 1999) ve at embriyolarında (Mortensen vd, 2010) embriyonik hücreleri stresten önemli ölçüde korur (Sharma vd 2012). HSP70'in fertilizasyon öncesi spermatozoayı koruduğu (Miller vd, 1992) ve gamet interaksiyonun da rol oynayabileceği düşünülmektedir (Matwee vd, 2001). HSP70'in hücre içi görevi bilinmemekle birlikte hücrenin termotoleransının gelişmesi ile ilişkilendirilmiştir (Whitley vd, 1999). İnsan HSP70 ve *e-coli* de amino asit zincirinin % 50'sinin benzer olduğu ve yüksek ısıda denatüre olduğu belirlenmiştir (Schlesinger, 1990). HSP70 ısı

şok faktörlerinin aktivitesini düzenler ve bu proteinlerin transkripsiyon kontrolünü sağlarlar. HSP70 hücrede sitoplazma, çekirdek, endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondride bulunmakta ve protein taşınmasına katılmaktadır (Aşkar vd, 2007). DNA'da 5' tarafında bulunan 4 sekans motifi insan HSP70 geni, serum faktörü, ağır metaller ve adeno virüs proteini olan E1A proteininden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Schlesinger, 1990).

2.3.1.4. Isı şok protein 60 (HSP 60)

HSP60'in apoptozisin (toplu hücre ölümü) gerçekleşmesinde kilit rol oynadığı düşünülmektedir. İnsan arteriokloritik lezyonlarda yüksek oranda bulunur (Whitley vd, 1999). HSP60, ökaryot hücrelerin mitokondri ve kloroplastlarında bulunur (Petrof vd, 2004). Normal şartlarda HSP60 enzimlerin bir araya gelmesinde ve bağlanmasında işlev görür ve bu da hücrenin enerji metabolizması ile ilgilidir. Çevre şartlarındaki değişiklikler hücrede HSP60'ın sentezini yükseltir ve biyolojik aktivitenin devam edebilmesi için hasar gören proteinlerin agregasyonlarını engellemek suretiyle hasarı onarır (Choi vd, 2008). Ökaryotlar da HSP60 mitokondri ve kloroplast gibi sitoplazmik organellerde bulunur. HSP60 mitokondri membranında proteinlerin kompleks oluşturmasını ve apoptozisi inhibe edebilmektedir (Gething ve Sambrook, 1990).

2.3.1.5. Küçük ısı şok proteinler (HSP 60>)

Büyüklikleri 8 ile 50 kDA arasında değişen protein ailesidir. Bazı küçük HSP'ler vasküler sistemde önemli role sahiptir. HSP32 miyokardiyal hücrede bol miktarda bulunan protein ailesidir. HSP25/27 hücre iskeletinde aktin polimerizasyonunu etkiler ve hücre göçünde yer alabilir. HSP20 düz vasküler kasta bulunur. Ubiquitin (8 kDA) proteini hedeflenen ve stres esnasında denatüre olan diğer proteinlerin uzaklaştırılmasında görev alır (Whitley vd, 1999). Küçük HSPler gelişimsel olarak blastula safhasında ve ısı şokuna duyarlı olan nöral tüp kapanışı sırasında yüksek seviyede yapısal olarak ifade edilir. Gastrulasyon sürecinde HSP47/27'nin başlangıçtaki kolajen ve aktin moleküllerine bağlandığı ve katlanma gösterdiği belirlenmiştir (Walsh vd, 1997;Carcy vd, 1991). HSP27 ifadesinin artışı hücre içi glutasyon miktarını arttırıp, demir içeriğini azaltarak, hidroksil radikallerinin ve

okside proteinlerin oluşumunu azaltarak, antioksidan gibi görev yapar (Jaattela, 1999). HSP40 en çok balıklarda, midye ve salyangoz gibi sucul organizmalarda bulunur (Lyons vd, 2003).

2.4. Isı Şok Proteinlerin Genel Özellikleri

HSP'ler, prokaryot, ökaryot, insan dâhil tüm organizmalarda artan ani sıcaklığa tepki olarak üretilmektedirler. HSP ailesinin farklı organizmalarda verdiği yanıt benzer özellik gösterebilmektedir (Kaufmann, 1990).

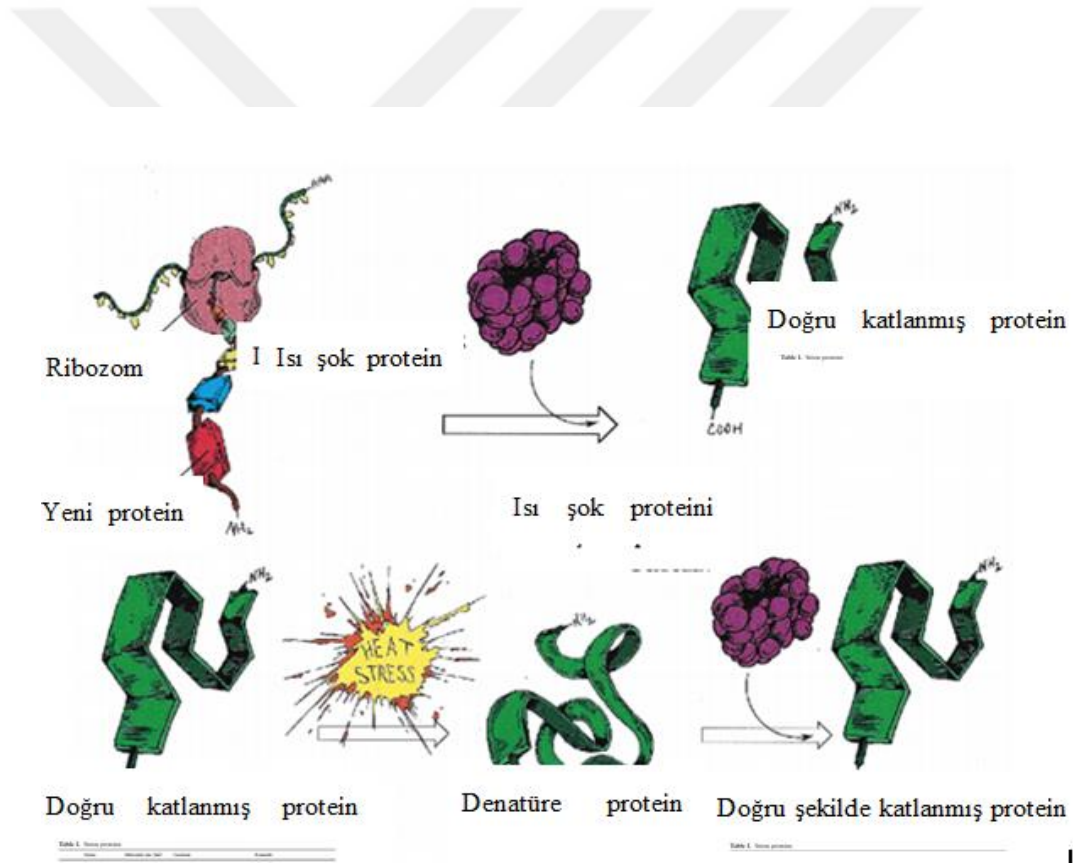
HSP'lerin iki önemli fonksiyonu bulunmaktadır. Birincisi, fizyolojik koşullar altında moleküler şaperon olarak işlev görürler. Şaperonlar (hücre içi protein korunması) hücre içi proteinlerin katlanmasına aracılık ederler ve bazı durumlarda bunların oligomerik (iki veya daha fazla polipeptid) yapılara yerleştirilmesi gibi görevleride bulunur. Ayrıca erken katlanma gösteren ya da yıkılan proteinlerde, hücre içi transfer ve inaktif protein formunun devamının sağlanması gibi önemli rolleri bulunmaktadır. HSP'ler hücrel yanıt olarak sıcaklık değişimlerinden kaynaklanan hücrel hasarlar, serbest oksijen radikalleri, enfeksiyonlar, ağır metaller, etanol ve iskemi gibi durumlarda sentezlenmektedirler (Lindquist, 1986; Welch, 1992).

Mikrobiyal HSP'ler, baskın antijenleri temsil ederler. Bu yüzden, insanlarda oldukça immünojeniktirler. Birçok kadında mikrobiyal enfeksiyon durumunda hassasiyet gözlemlenmiştir. İnfertilite tedavisi sürecinde kadınlarda HSP'lerin antibadisinin yaygın olduğu gözlemlenmiştir (Neuer vd, 1999).

2.5. Isı Şok Proteinlerinin Görevleri

Stres proteinleri transkripsiyon sürecinde (mRNA'nın ürününün DNA'da oluşması) ve translasyon (mRNA'nın proteine dönüşümü) mekanizmasının aktive olması sürecinde rol aldığı düşünülmüştür (Welch vd, 1983). Ayrıca hücre içerisinde peptidleri sararak sınırlandırır ve bu peptidler HSP yardımı ile hücre içerisine alınır. Stres proteinleri hücre içerisinde proteinin üç boyutlu katlanmasında önemli rol oynamaktadır ve yeni oluşan polipeptidlerin katlanmasının doğru bir şekilde

olmasını sağlamaktadırlar (Pockley, 2001; Whitley vd, 1999). Bu proteinler aynı zamanda stres sonrası ya da yaralanmalarda protein yıkımının olmamasını ya da protein denaturasyonun tamir edilmesine yardımcı olurlar. Bu özelliğinden dolayı “moleküler şaperon” olarak adlandırılmışlardır (Şekil 2.3). Bu proteinler ATP bağımlı şaperonlardır, kendi konformasyonlarının düzenlenmesi ve ATP’nin bağlanması için yardımcı şaperonlara ihtiyaç duyarlar. Ancak küçük şaperonlardan HSP27 gibi proteinler ATP’ye bağımlı değildirler (Parcellier vd, 2003). Hücre sitoplazmasında bulunur ve hücre içi süreçlerde görev alarak proteinin katlanmasında ve ortamdaki ihtiyaca göre proteinin oluşmasına yardımcı olarak hücre içi dengenin korunmasını sağlarlar (Ciocca ve Calderwood, 2005).



Şekil 2.3. Isı şok proteinin protein katlanmasındaki rolü (Whitley, 1999)

Bazı bakteriyel HSP’lerin özellikle HSP60 ve HSP70’in yüksek hassasiyetin geciktirilmesinde ve otoimmün sisteme cevap verilmesinde sorumlu olduğu belirlenmiştir (Dobson ve Ellis, 1998). HSP’lerin aynı zamanda hücre içinde

fagositik olan etkiye karşı da koruyucu görevi olduğu düşünülmektedir (Fields vd, 1986). HSP'ler hidrojen bağları, güçlü hidrofobik etkileşimleri ve çift kutuplu heliks yapısından dolayı denatüre olmazlar (Aşkar vd, 2007). Çekirdekte ve kromatinin korunmasında hücre yapısı ile ilişkilendirilen ısı şok proteinlerinin strese karşı hücreyi koruduğu düşünülmektedir (Velazquez ve Lindquist, 1984).

HSP70 ve HSP90 tüm dokularda bulunur ancak bazı küçük stres proteinleri sadece vasküler sistemde önemli görevler yapar (Whitley vd, 1999). Isı şok faktörü (HSF) sensör özellik gösterdiğinden, farklı sıcaklığı aktive etmek için türler arasında ısı şok faktör yapısı farklılık göstermektedir. Örneğin 30 °C de *drosophila*'da, 43-45 °C kuşlarda ısı şok proteini görüldüğü belirlenmiştir (Rougvie ve Lis, 1988). Yapılan çalışmalarda saflaştırılan ve çalışılan proteinlerin ısı şok geninin iki önemli sonucu olduğu belirlenmiştir (Walsh vd, 1997). Birincisi ısı şok proteinleri farklı organizmalar arasında yüksek oranda korunmuştur. Örneğin majör protein olan HSP70'in, insan ile *E. Coli* arasında % 50 oranında benzerliğini koruduğu gözlemlenmiştir. Ancak bazı domainlerinin de % 96 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiş. İkincisi çoğu durumda hücre için temel olan majör ısı şok proteinlerine ait ısı şok gen ailesidir. HSP70, hücrede porlardan taşınırken katlanmamış veya kısmen katlanmış olması gerekmektedir (Schlesinger, 1990). Yapılan çalışmalar, HSP70'in protein bağlama ve ATP'de bulunma, protein kompleksinin ayrışmasında rol alabileceği bildirilmiştir (Samali ve Orrenius, 1998). Yapılan çalışmalarda HSP70'in hücreyi koruyarak apoptozisin etkilerinde de rol aldığı tespit edilmiştir (Samali ve Orrenius, 1998). Endoplazmik retikulum üzerinde protein bağlama ve anormal oligomerik proteinin ve quarterner yapısının korunmasında rol aldığı bildirilmiştir (Gething ve Sambrook, 1992). HSP70'in iki majör domaini bulunmaktadır. Bunlar yüksek oranda korunmuş olan kompakt amino terminal ATP bağlama bölgesi ve zayıf ATPaz aktivitesi; kalmodülün bağlama bölgesi proteaz hassasiyeti ile ilişkilendirilmiştir. Katlanmamış proteinlerde HSP70 ve HSP60 polipeptidlerin katlanmasında rol alırlar. HSP70 ile HSP40 eşleşerek mitokondrinin dış membranına lokalizasyonu engeller ve mitokondrinin dış membranın geçirgenliğini korurlar (Stankiewicz vd, 2005). HSP'lerin moleküler büyüklükleri, hücrede bulunma yeri ve hücredeki görevleri Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Isı şok proteinlerin moleküler büyüklüğü, hücredeki yeri ve görevi (Whitley, 1999)

İsim	Moleküler Büyüklüğü (kDa)	Hücrede Bulunma Yeri	Hücredeki Görevleri
Ubiquitin	8	Sitozol/Nükleus	Denatüre olan proteinin uzaklaştırılması
HSP10	10	Mitokondri	HSP60 için kofaktör görevi görür.
HSP20-40	20-40	Sitozol/Nükleus	Bazısı hücre iskeleti ve hücre göçünden sorumlu bazıları da damar sisteminde görev almaktadır.
HSP56	56	Sitozol	Steroid hormon reseptör kompleksini bağlar ve stabilize eder.
HSP60	60	Mitokondri	Moleküler şaperon
HSP70	70	Sitozol/Nükleus	Moleküler şaperon ve termotolerans özellik gösterir.
HSP90	90	Sitozol/Nükleus	Moleküler şaperonun ekspresinde
HSP100	100	Golgi kompleksi	Moleküler şaperon özelliği göstererek protein kümelerinin ayrılması

kDa = kilo dalton, HSP = ısı şok proteini

2.5.1. Isı şok proteinleri ve homeostazis

HSP'ler, organizma yüksek ısıya maruz kaldığında organizmanın şiddetli ve ölümcül etkilerinden korur. Bu yüzden termotolerans olarak adlandırılmıştır. Bir HSP başka bir proteinin hasarını azaltmak için destek sağlayabilir. Buna karşı tolerans denilmektedir. Örneğin stres proteini lokal hipertemi aracılığıyla ağır metale maruz kalan arteriyal yaralanmalarda iskemik yaralanma veya ısıya karşı korumaya neden olmaktadır (Suzuki vd, 1997).

HSP'ler sadece proteinlerin tekrar katlanması ya da yanlış katlanmış, denatüre olmuş proteinlerin elimine edilmesine yardımcı olmaz, aynı zamanda birçok açıdan hücrenin yaşamında kritik rolü olan hücresel proteinin sentezlenmesini de sağlar. Hücresel homeostazın sağlanmasında HSP'lerin pek çok rolü bulunmaktadır (Sreedhar ve Csermely, 2004). Hayvanların maruz kaldığı sıcaklığa karşı nöroendokrin ve fiziksel yanıtlar homeostasinin korunmasında ve adaptasyonun sağlanmasında stres önemli bir faktördür. Isıya bağlı stres gonadotropinler ve gonad hormonlarındaki değişim üreme döngüsüne zarar vericidir. Buna bağlı olarak fertilizasyon döngüsünün düşük olmasına neden olduğu düşünülmüştür. Isı stresi dişi hayvanda üreme kapasitesinin düşük olması, üreme kanalı ve dokular üzerinde değişikliklere, gebelik oranının düşük olması gibi zararlı sonuçlara neden olabileceği düşünülmüştür (Alves vd, 2013). Lopes ve Hansen'e (2002) göre maternal ısı stresine yanıt verme gelişme döneminde ve embriyoda kritik periyot; ovulasyon, oosit gelişimi ve fertilizasyonun ilk günlerine bağlıdır. Embriyonun çevresindeki değişikliklere cevap verme yeteneği embriyonun genomunun çoğunlukla inaktif olduğu difüzyon anında sınırlıdır (Lopes ve Hansen, 2002). Oositler ısı stresine maruz kaldığında, hücresel yapılarını korumak için HSP70 sentezini gerçekleştirirler (Chemelikova vd, 2006). Olgunlaşma sürecini tamamlamış olan oositlerin HSP70'i sentezleyemediği belirlenmiştir (Sharma vd, 2012). Stres durumunda HSP70'in izotopları olan HSP72 ve HSP73 homeostasinin sağlanması ve hücrenin hayati devamlılığı sağlamak amacıyla sitoplazmadan çekirdeğe geçip hücresel yıkımı engellediği ve proteini denatüre ettiği düşünülmektedir (Naughton vd, 2006).

2.5.2. Isı stresi ve in vitro embriyo

Isı stresi, follikül, östrus, steroid ve gonadotropin konsantrasyonlarının yanı sıra uterus ve ovidukt üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır (Wolfenson vd, 2000). Dinlenme halindeki hayvanın vücut ısısını artıran dış etkenlere ısı stresi denilmektedir (Ergene, 2009). Yapılan çalışmalarda kısa sürede (42 °C’de 30 dakika) ısı stresine maruz bırakılan sığır oositlerinde vitellin membranın yapısında değişimlerin olduğu ve sitoplazmada genişleme olduğu bildirilmiştir (Susuki vd, 1998; Tseng vd, 2006). Domuz oositlerinde (41,5 °C’de 4 saat) ısı stresinin mikrotübüllerin depolarize olmasına neden olduğu gözlemlenmiştir (Tseng vd, 2006). Isı şokunun fare (Komar, 1973), tavşan (Whittingham, 1980) ve sığır oositlerinde partenogenetik gelişimi etkilediği gözlemlenmiştir (Suzuki vd, 1998; Whittingham, 1980). Isı stresi altındaki hayvanın dominant follikülünün büyüme olasılığının düştüğü bildirilmiştir. Stres altındaki folliküler hücrelerin steroidogenik kapasiteleri ile östradiol sentezi için granuloza hücrelerinden androjen üretiminin azaldığı bildirilmiştir (Wolfenson vd, 1997). Progesteron konsantrasyonunun düşük olması dominant follikülde korpus luteumda steroid salınımını etkileyerek anormal oosit olgunlaşmasına neden olur. Bu da endometriyal morfolojiyi etkileyerek embriyo ölümlerine neden olabilmektedir (Ahmad vd, 1995). Isı stresi durumunda endometriyumdaki ısı şok proteini üretimi artmaktadır (Ergene, 2009).

2.5.3. Stres durumunda serbest radikal oksijenleri (SOR)

Serbest oksijen radikallerinin üretimi iç ve dış kaynaklı olabilmektedir. Bunlar; oksidatif fosforilasyon, NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, glikolat oksidaz, ortamdaki oksijen konsantrasyonu, metalik katyonlar, gün ışığına maruz kalma, amin oksidazlar ve spermatozoa olarak sıralanabilir (Guerin vd, 2001; Trimarchi vd, 2000). SOR’lar kararlı bileşikler haline geçebilmek için hücrede protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyaleden elektron kopartıp kararlı hale geçmeye çalışırken bu yapılara zarar vermektedirler (Johnson ve Nasr-Esfahani, 1994). Oksidatif stres nedeniyle aşırı düzeyde SOR’lar oluşturulmakta ve bu serbest radikaller, hücre membranını geçerek lipid, protein, nükleik asit gibi hücresel moleküllerin yapısının değişmesine, mitokondride değişimlere, embriyonal hücre gelişiminde bloklanmaya, aşırı düzeyde ATP tüketimine ve apoptozise yol

açmaktadır (Guerin vd, 2001; Johnson ve Nasr-Esfahani, 1994). Çoğu memeli türünde ısı şok embriyoda fizyolojik fonksiyonlar üzerine ciddi etkileri olmaktadır (Biggers vd, 1987). Bunun serbest oksijen radikalleri ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. *In vitro* koşullarda hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit anyon (O₂⁻) ve radikal oksitler (OH) gibi serbest oksijen radikalleri embriyo gelişimini baskılamaktadır (Sakatani vd, 2004; Tseng vd, 2006). Yüksek miktardaki serbest oksijen radikalleri preimplantasyon dönemindeki embriyoyu etkilemekte ve bununla birlikte ısı şok olgunlaşma sürecinde sadece organelleri değil aynı zamanda hücre isketine de zarar verebilmektedir (Tseng vd, 2006). Leese (2002)'e göre kültür ortamında bulunan sağlıklı embriyoların daha yavaş, sağlıklı embriyoların daha hızlı metabolizmaya sahiptir (Leese, 2002). *In vivo* veya *in vitro* fertilizasyon sonrası elde edilen memeli embriyolarının blastosist safhasına ulaşıncaya kadarki embriyo kültüründe glikoz tüketimi, piruvat üretimi ve tüketimi, oksijen tüketimi, amino asit tüketimi ve üretimi, laktik asit üretimi gibi metabolik aktivitelerini belirlemek için verilere dayalı sessiz embriyo hipotezi ortaya çıkmıştır. *In vitro* olgunlaştırmadan *in vitro* kültüre kadar *in vitro* embriyo üretim sistemlerinde uygulanan çevresel şartların, sıcaklık, besin içeriği, gaz dengesi gibi stres etmenlerinin oosit ve fertilizasyon sonrası embriyonun metabolizma hızı ve gelişimi üzerine doğrudan etkili olabileceği düşünülmektedir (Leese vd, 2007). Stres durumunda, nükleik asit hasarı ve ısı şoku gibi etkiler oluşarak embriyonal hücrelerde heterojenliği artırmakta ve bu heterojenlik embriyo içerisinde hızlı bir şekilde yayılarak embriyo gelişimini olumsuz etkileyebilmektedir. Kültür ortamındaki sağlıklı embriyoda moleküler düzeyde genom, transkriptom (Transkriptlerin tamamı) ve proteom (genomdaki toplam protein) süreçleri sorunsuz bir şekilde devam etmektedir. Bu durumdaki embriyo daha az besin ve oksijen tükettiğinden daha sessiz bir metabolizmaya sahiptir (Leese vd, 2008; Şen, 2014)

2.5.4. Isı şok proteininin gen transkripsiyonu

Isı şok proteininin gen transkripsiyonu, ısı şok transkripsiyon faktörleri ile ısı şok protein gen promotör bölgelerindeki ısı şok elementlerinin etkileşimi aracılığı ile gerçekleşmektedir. Normal koşullar altında sitoplazma içinde ısı şok faktör1 (HSF1) DNA'ya bağlı olmayan bir monomer molekül gibi bulunmaktadır. Stres durumunda

HSF1, DNA'ya bağlanma kapasitesine sahip olmak için üç fosfatlı forma dönüştürülür ve sitoplazmadan çekirdeğe geçer. Çekirdekte DNA'nın promotör bölgelerine HSF'leri bağlanır. Böylece HSP geninin transkripsiyonunu sağlanıp, HSP sentezi gerçekleşmektedir (Aşkar 2007).

2.6. Isı Şok Proteinleri ve Gametogenesis

2.6.1. Isı şok proteinlerin ifadesi ve spermatogenezis

Spermatogenezis üç ayrı faz olarak farklılaşmaktadır. Bunlar; spermatogonianın mitotik proliferasyonu, spermatositlerin mayotik gelişimi ve mayoz sonrası spermatit gelişimi ve spermatozoonun olgunlaşmasıdır (Eddy vd, 1991). Isı şok proteinlerinin ekspresyonu transformasyon ve hücrel farklılaşmanın olduğu spermatogenezis gelişim sürecinde doğrudan ilişkili olmasa da (Dix, 1997; Miller vd, 1992) fare ve rat spermatogenezis sürecinde HSP70'in yapısal formunun (HSC70) biriktiği gözlemlenmiştir (Neuer vd, 1999). Aynı zamanda proteinleri kodlayan mRNA'nın HSP86 ile ilişkili olduğu rat ve insan testislerinde gözlemlenmiştir (Lee, 1990). İnfertil erkeklerde HSP60 ekspresyonunun spermatogonia ile spermatojenik fonksiyon ile paralellik gösterdiği bildirilmiştir (Werner vd, 1997). Bu gözlemler sonucunda düşük miktardaki HSP60 ekspresyonu spermatogonyayı korumaya neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca fare spermatitlerinde mayoz bölünme esnasında başarılı spermatogenez için HSP70 ve HSP72'nin gerekli olduğu düşünülmüştür (Neuer vd, 1999).

2.9.2. Isı şok proteini ve oogenesis

Erkek germ hücreleri gibi dişi germ hücreleride hipertermik ve diğer çevresel stres faktörlerine karşı duyarlıdır (Ambrosio ve Schedl, 1984). Böcekler, balık, sürüngenler ve memelilerin dâhil birçok canlı türünde oogenesis sürecinde ve spermatogeneziste stres proteinin ifade edilmesinde ısı şok proteini önemli rol oynamaktadır (Heikkila vd, 1986). Yapılan çalışmalar fare oositinde ısı şok yanıtının oositin büyüme periyodunda olduğu belirlenmiş ve oosit gelişimini tamamladıktan

sonra miktarının azaldığı tespit edilmiştir (Neuer vd, 1999). HSP'ler follikülün erken büyüme sürecinde etkili olmakta ve ovulasyondan önce miktarı azalmaktadır (Curci vd, 1987). Ovulasyon öncesinde, HSP 70 ve HSP 90 proteinlerinin sentezinin yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir (Curci vd, 1991). Germinal vezikül yıkımlanmasından kısa süre sonra HSP 70 ve HSP 90 sentezinin durduğu gözlemlenmiş ve fertilize olan oositlerde de tespit edilememiştir (Curci vd, 1991). HSC70'in sentezi, mayozdan sonra durur. *In vitro* ortamlarda sıcaklık artışı oositin metafaz II safhasına gelme sürecini azalttığı ve fertilizasyon oranını düşürdüğü belirlenmiştir (Baumgartner vd, 1981). Isı şok proteinlerinin ovulasyon süreci ve ovulasyon sonrası metabolik aktivite ve oositin yaşam sürecinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Neuer vd, 1999).

2.7. Isı Şok Proteinlerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler

2.7.1. Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Elektroforez tekniği: protein, peptid, şeker ve nükleik asit gibi yüklü taneciklerin iyonize ortamda belirli bir pH ve elektriksel alan içerisinde molekül ağırlıkları ve yük farklılıklarına göre saflaştırılması ve ayrıştırılması işlemidir. SDS-PAGE tekniğinde anyonik bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) ile kombine edilen indirgeyici ajanlar (β -mercaptoetanol veya ditiyotretol) proteinleri üç boyutlu yapıdan tek boyutlu yapıya dönüştürerek poliakrilamid jelde ayrılmasını sağlamaktadır. Jelin ayrıştırma gücü ve molekül büyüklüğü akrilamid ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan bisakrilamidin yoğunluğu ve polimerizasyonu ile ilgilidir. Polimerizasyon işlemi stabilizatör N,N,N',N' tetrametiletilediamin (TEMED) ve bir serbest radikal olan amonyum persülfatın (APS) 20 °C üzerindeki sıcaklıkta akrilamidi katalize etmesiyle gerçekleşmektedir. Anyonik deterjan olan SDS, proteinlerin dördüncül, üçüncül ve ikincil yapılarını bozarak proteinleri peptid zincirlerine dönüştürmektedir. Peptidler SDS ile sarılarak misel görünümü kazanır. Zincirde yer alan her 2 aminoasit artığına 1 molekül SDS bağlanarak proteinlerin hepsi (-) yükle yüklenmesini sağlar. SDS-PAGE ile proteinler, net yük ve şekillerine göre değil sadece molekül büyüklüklerine göre birbirinden ayrılmaktadır. Böylece

moleküllerin elektriksel alandaki hareketi güç kaynağının sağladığı akımla negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutba doğru gerçekleşmektedir. Jeldeki akrilamid yoğunluğu arttığında gözenekler daha sık oluşacağından büyük molekül ağırlığına sahip moleküllerin jelde hareket etme hızını azaltmaktadır (Baykalır, 2017). Molekül ağırlıkları bilinen standart proteinden (markır), molekül ağırlığı bilinmeyen proteinin (örnek) molekül ağırlığı bulunur. Markır proteinin jelde göç ettiği mesafe, örnekler ile kıyaslanarak moleküler ağırlık Da veya kDA olarak hesaplanır. Standart elektroforez uygulamaları dikey elektroforez şeklinde gerçekleştirilir (Aygan, 2008; Balkan, 2008). Elektroforez uygulamasında kullanılan jel, genellikle stacking (yığıma) ve seperating (ayırma) jeli olmak üzere iki kısımdan oluşur. Her iki jel de içerdikleri akrilamid konsantrasyonları bakımından birbirlerinden farklılık gösterir. Bu iki jeldeki pH ve konsantrasyon farklılığı, protein karışımlarının birbirlerinden ayrılmasını ve belirgin bantlar oluşmasını sağlamaktadır (Aygan, 2008).

2.7.2. Western blot yöntemi

Western blot; hücre ve moleküler biyolojide kullanılan belirli proteinleri, kompleks proteinlerden ayırılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu teknik proteinleri boyutuna (Philips vd, 2018) göre ayırma, jele aktarma (Mahmood ve yang, 2012) ve hedeflenen proteinin belirlenmesi için antibadinin kullanılması esasına dayanır. İstenilen protein için spesifik antibadi kullanılır. Antibadi belirli molekül ağırlığındaki istenilen kDA aralığındaki proteinin belirlenmesini sağlar. İstenilen aralıktaki proteinin elde edilip edilmediğini anlamak için görüntüleme yapılmalıdır (Mahmood ve Yang, 2012). Western blotta iki farklı jel kullanılır. Bunlar; yığıma ve yükleme jelleridir. Yığıma jeli daha asidik ve düşük akrilamid konsantrasyonuna sahiptir. Buda jelin porlu yapıya sahip olmasını sağlar. Yükleme jeli, ayırma jeli olarak da bilinir. Yüksek poliakrilamid içeriğine sahiptir. Bundan dolayı jelin daha sıkı porlu yapıya sahip olmasına neden olur. Protein jele yüklenip koşturulduktan sonra membrana aktarılır. Aktarım yapılırken jelin yüzeyine dik olan proteinlerin jelin dışına ve zarın üzerine hareket etmesi elektrik alandan yararlanılarak yapılır. Membran jel yüzeyi ve pozitif elektrot arasına yerleştirilir. Negatif yüklü proteinlerin jelden zara göç ettirilmesi sağlanır. Bu transfer işlemine elektroforetik transfer denir.

Membran yerleştirilirken dokunmamaya dikkat edilmelidir (Mahmood ve Yang, 2012).

2.8. Amaç

Sığırlarda *in vitro* embriyo üretimindeki başarı oranının artırılması *in vitro* koşullarda gerçekteşen oosit olgunlaşmasının *in vivo* koşullara yakın olmasına bağılıdır. *In vitro* olgunlaştırmada sıcaklık, medyumun besin içeriğı ve gaz dengesi ve kùltür medyumuna kadar *in vitro* embriyo üretim sistemlerinde uygulanan çevresel şartlar stres etmeni olabilmektedir. Stres, oositin olgunlaşması ve fertilizasyon sonrası embriyonun metabolizma hızı ve gelişimi üzerine etkili olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda ovaryum içeresinde bulunan folikùllerin vùcut sıcaklığından yaklaşık 1,5-2 °C daha soğıuk olduğı ve yumurta kanalı boyunca sıcaklığıın kademeli olarak (isthmus ampulladan yaklaşık 0,43 °C daha soğıuk ve her ikisi rektal sıcaklıktan yaklaşık 1-1,5°C daha soğıuk) vùcut sıcaklığına yükseldiğini belirlenmiştir (Einer-Jensen ve Hunter, 2006; Ye vd, 2007). Ancak *in vitro* ortamlarında genellikle vùcut sıcaklığı tercih edilmektedir. Bunun sonucunda, oosit ve embriyonun metabolik ve biyokimyasal aktivitenin değışmesine ve serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bu da oosit ve embriyoda, DNA hasarlarına hatta hücre ölümlerine neden olabilmektedir (Ravindranatha vd, 2003; Sen ve Kuran, 2013). *In vivo* şartlarda vùcut sıcaklığıından daha düşük sıcaklıkta olgunlaşan oositin, metabolizma hızının *in vitro* şartlarda yükselebileceğı düşünùlebilir. Bu sebeple, oosit *in vitro* şartlarda *in vivo* şartlara göre daha yüksek sıcaklığıa maruz kalması metabolizmasını hızlanarak daha fazla stres proteini HSP70 üretilmesine neden olabilir. *In vitro* olgunlaştırmada uygulanacak farklı sıcaklıkların ısı şok protein miktarına olabilecek etkileri western blot yönteminden yararlanılarak belirlenebilir. Dolayısıyla, bu çalışmanın amacı, *in vitro* olgunlaştırmada için kullanılan geleneksel sıcaklık (38,5°C) ile düşük sıcaklıkta (36,5 °C) olgunlaştırılan sığır oositlerinde olgunlaşma sonrası farklı sıcaklıkların uygulanmasının sonucu sentezlenen ısı şok proteini 70'in (HSP70) western blot yönteminden yararlanarak belirlenmesidir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Mevcut çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında 2017-2018 yılları arasında, Hayvansal Biyoteknoloji laboratuvarlarında yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan ovaryumlar Samsun ili Ondokuz Mayıs ilçesine bağlı özel bir mezbahaneden (Florya) temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan medyum ve çözeltilerin hazırlanması aşağıda belirtilmiştir.

3.1. Kullanılan Medyum ve Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.1. Ovaryum taşıma çözeltisinin (Serum fizyolojik) hazırlanması

Ovaryum taşıma çözeltisi 1lt distile suda 9,6 gr (% 0,96) sodyum klorür'ün (Sigma S-9888;NaCl) çözdürülmesi ile hazırlanmış ve 4 °C'de depolanmıştır. Kullanım günü % 0,1 oranında antibiyotik antimikotik (Sigma A-5966) solüsyon ilave edilmiş ve ovaryumların taşınması için 37 °C'ye ısıtılmıştır.

3.1.2. Oosit arama medyumunun hazırlanması

Oosit arama medyumunu için Hepes tamponlu (Sigma M-7528) medyum-199 kültür medyumuna %1 antibiyotik antimikotik solüsyon ilave edilerek hazırlanmış ve 4 °C'de depolanmıştır.

3.1.3. Stok Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisinin (PBS) Hazırlanması

Stok PBS (Sigma P-4417; PBS) 1 lt çift distile suda 9,6 gr (% 0,96) PBS'in çözdürülmesiyle elde edilmiş ve 4 °C'de depolanmıştır.

3.1.4. *In vitro* oosit olgunlaştırma medyumunun hazırlanması

Olgunlaşma medyumunu 15'lik falkon tüp içerisinde sodyum bikarbonat tamponlu medyum-199 kültür medyumundan (Sigma M-4530) 4425 ml, fetal calf serum (FCS; Sigma C-8056)'dan 500 ml, sodyum piruvat'tan (Sigma P- 4562) 25 ml (27,5

$\mu\text{g/ml}$), antibiyotik antimikotik solüsyondan (Sigma A-5966) 50 ml birleştirilmiş ve 0,22 μm por çapındaki filtre (TPP, 99722) kullanılarak filtre işlemi yapılmıştır. Hazırlanan olgunlaştırma medyumundan-dört gözlü petrinin her bir gözüne 500 ml medyum aktarılmıştır ve üzeri 300 ml mineral yağ (Sigma M-5904) ile kapatılıp ısınması ve gazlanması için inkübatöre bırakılmıştır.

3.1.5. Hyarulinidaz çözeltisinin hazırlanması

Hyarulinidaz çözeltisi 4 mg Hyarulinidaz enziminin (H-3506) 4 ml sodyum bikarbonat tamponlu medyum-199'da çözündürülmesiyle taze olarak hazırlanmıştır.

3.1.6. Tris-HCl 1,5 molar çözeltisinin hazırlanması

Tris-HCl 1.5 Molar çözeltisi 54,51 gr Tris Base (Sigma T-5941), 300 ml distile suda çözündürülmüş ve pH HCl ile 8,8'e ayarlanıp 4 °C'de depolanmıştır.

3.1.7. Amonyum persulfat (APS) hazırlama

Amonyum persulfat çözeltisi 1000 ml çift distile suda 0,1 gr APS (Akkim 193148) çözündürülmesiyle taze olarak hazırlanmıştır.

3.1.8. Tris-HCl 0,5 molar çözeltisinin hazırlanması

Tris-HCl, 0,5 Molar Çözeltisi 6 gr Tris Base (Sigma T-5941), 60 ml çift distile suda çözündürülüp pH 8,8'e ayarlanmış ve çözelti çift distile su ile 100 ml tamamlanarak 4 °C'de depolanmıştır.

3.1.9. Akrilamid –bisakrilamid çözeltisinin hazırlanması

Akrilamid–Bisakrilamid (Sigma A-3553) çözeltisi 146 gr akrilamid ve 4 gr N-N Metil bisakrilamidin 500 ml çift distile suda çözündürülüp filtre kâğıdından geçirilmesiyle hazırlanmış ve 4 °C'de depolanmıştır.

3.1.10. Destaining tampon (500 ml) çözeltisinin hazırlanması

Destaining tampon 50 ml metanol ve 50 ml glacial asetik asitin (Sigma R27225) 500 ml çift distile su ile karıştırılması ile hazırlanmış ve 4 °C'de depolanmıştır.

3.1.11. Coomassie R-250 (250 ml) çözeltisinin hazırlanması

Coomassie R-250 (Thermo Fisher 20278) çözeltisini hazırlamak için 0,25 gr coomassie R-250, 125 gr metanol ve 25 ml glacial asetik asit (Sigma R27225) 100 ml çift distile suda karıştırılmış ve 4 °C'de depolanmıştır.

3.1.12. Running tampon (5X) çözeltisinin hazırlanması

5X'lik Running tampon çözeltisi hazırlamak için 15 gr Trisbase, 72 gr Glisin (Sigma 50046) ve 5 gr sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merc Kod. 8.17034.1000) 1 lt çift distile suda karıştırılmış ve 4 °C'de depolanmıştır.

3.1.13. Running tampon (1X) çözeltisinin hazırlanması

1X'lik running tampon çözeltisi hazırlamak için 200 ml 5 X Running tampon, 800 ml çift distile su ile karıştırılmış ve 4 °C'de depolanmıştır.

3.1.14. 1X Lyzis tampon çözeltisinin hazırlanması

Lyzis tampon çözeltisi için pH 7,4 olan 50 milimolar Tris- HCl'den 25 ml (1 Molar), %5 Triton-X 100'den (Sigma T 8787) 2500 ml, 250 milimolar NaCl'den 25 ml (5 Molar), 5 milimolar EDTA'dan (Sigma 1233508) 5 ml (0.5 molar), %0.1 SDS (Kod. 8.17034.2500), 10 ml DTT (Sigma 3483-12-3) taze olarak eklenip 4 °C'de depolanmıştır.

3.1.15. Transfer tampon çözeltisinin hazırlanması 1X (TBS)

Transfer tampon için 24,5 g tris baz, 11,2 g glisin, ve running tampona % 20 metanol 1 lt hazırlanıp oda sıcaklığında depolanmıştır.

3.1.16. Transfer tampon tween 20 çözeltisinin hazırlanması (TBST)(500 ml)

TBS yıkama çözeltisinden 500 ml alınarak 250 µl tween 20 eklenerek hazırlanmıştır. Her western blot işleminde yeni çözelti hazırlanmıştır.

3.1.17. Blocking tampon çözeltisinin hazırlanması

Blotting tampon için % 5 süt tozu 1X TBS, % 0,1 tween 20 hazırlanmıştır. Filtre edilerek hazırlanıp 4 °C’de depolanmıştır.

3.1.18. Bradford çözeltisinin hazırlanması

100 mg Commassie Brillant Blue G-250, 50 ml % 95’lik etanolde çözüldü. Üzerine 100 ml % 85’lik fosforik asit ilave edildi. Filtre kağıdı ile süzülerek saf su ile 1L’ye tamamlandı.

3.1.19. Stok standart protein çözeltilerinin hazırlanması (Bradford yöntemi için)

Standart protein çözeltilerinin hazırlanmasında 100 µg sığır serum albumin, 1000 µl distile suda çözümlenerek hazırlanmıştır.

3.1.20. Fosfat tuz tampon çözeltinin hazırlanması (PBS 1X)

Fosfat tuz tampon çözeltisi için 0,454 g Na₂ HPO₄, 0,068 g KH₂PO₄, 0,097 g KCl ve 7,88 g NaCl hassas terazide tartılarak 800 ml de pH 7,4 ayarlanarak hazırlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.21. İmmünolojik saptama çözeltinin hazırlanması

İmmünolojik saptama çözeltinin hazırlanması için 0,030 g diaminobenzidin 50 ml PBS’te çözdürülmüş ve kullanılacağı zaman % 30’luk 10 µl hidrojen peroksit eklenmiştir. Her işlem için taze hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1 Ovaryumların laboratuvara getirilmesi

Çalışmada ineklerin kesimden hemen sonra ovaryumlar bir bıçak yardımı ile dişi üreme sisteminden alınmış (Şekil 3.1. B) ve içerisinde 37 °C’de serum fizyolojik bulunan termos içerisinde konulmuştur. Ovaryumlar kesimi takip eden 3 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Laboratuvara getirilen termosun içerisindeki serum fizyolojinin son sıcaklığı $34,0 \pm 2,0$ °C olarak tespit edilmiştir. Ovaryumlar beher içerisinde 37 °C’deki distile su ile birkaç kere yıkanıp üzerine 37 °C’de serum fizyolojik eklenip su banyosuna (BM 402) aspire edilmek üzere bırakılmıştır (Şekil 3.1 A).

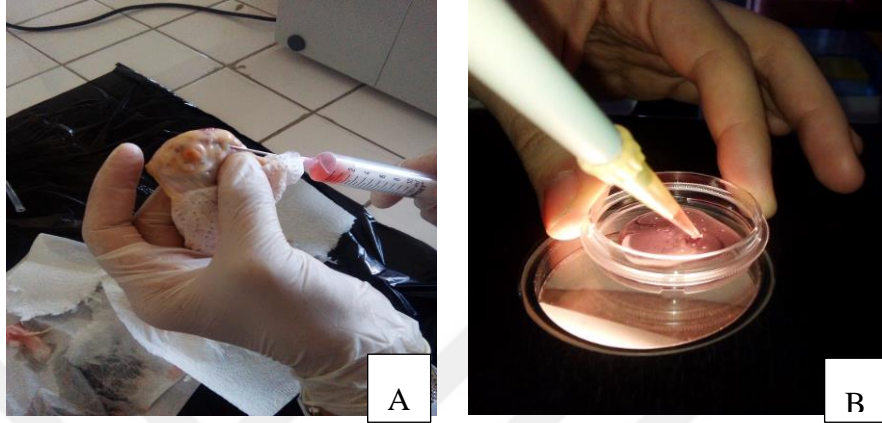


Şekil 3.1. A) Ovaryumların su banyosuna bırakılması B) Ovaryumun görüntüsü

3.2.2. Oosit aspirasyonu ve oositlerin seçimi

Aspirasyon işlemi 18 gauge iğne takılmış 5 ml’ lik enjektörlerle gerçekleştirilmiştir. Enjektöre önceden hazırlanmış olan oosit arama medyumu alınıp aspirasyona başlanmıştır (Şekil 3.2 A). Aspirasyonda ovaryumlar kağıt havlu ile kurulandıktan sonra yüzeyindeki 2–8 mm çapındaki folliküller toplanmıştır Elde edilen foliküler içerik tabanı karelere bölünmüş 35 mm’lik petri kaplarına dikkatlice boşaltılıp stereo mikroskop altında pipet ile kumulus oosit kompleksi (KOK) arama işlemi yapılmıştır. Seçilen KOK’lar oosit arama medyumu üç defa ile yıkanmıştır (Şekil 3.2

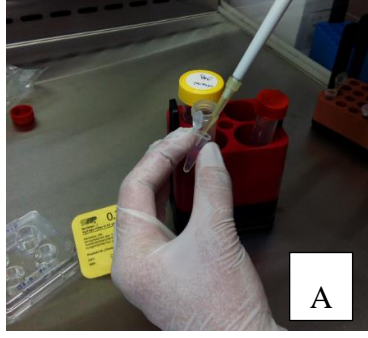
B). Her yıkama aşamasında pipet ucunun değiştirilmesine özen gösterilmiştir. KOK'lar olgunlaştırma medyumunu ile iki kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra oositler ayrı ayrı 4 gözlü kültür kabının her bir kuyusuna yaklaşık 30–40 adet olacak şekilde aktarılmış ve olgunlaşması için inkübatöre (Panasonic MCO-5M-PE) konulmuştur (Şekil 3.3 C).



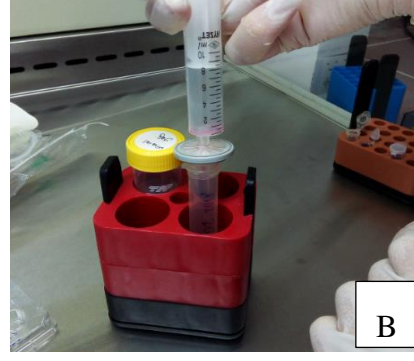
Şekil 3.2. A) Oositlerin enjektör yardımı ile aspire edilmesi. B) Oositlerin stereo mikroskofta incelenmesi ve pipet yardımı ile alınıp yıkama işlemi için başka bir petriye alınması

3.3. Kültür Şartları

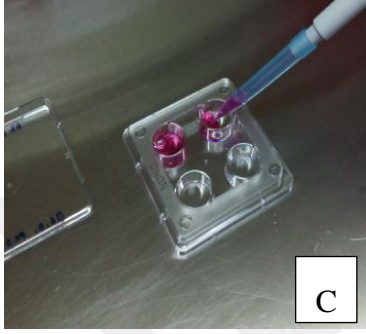
Tüm gruplarda kullanılan medyumlar, oosit olgunlaştırmaya başlamadan en az 2 saat önce inkübatöre bırakılmıştır (Şekil 3.3 D). KOK'ların *in vitro* olgunlaştırması iki farklı inkübatör sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Birinci gruptaki KOK'lar 36,5 °C'de, %5 CO₂ ve %95 oranında nem içeren atmosferde, ikinci gruptaki KOK'lar 38,5 °C'de, %5 CO₂ ve %95 oranında nem içeren atmosferde kültüre alınmışlardır. Her iki gruptaki KOK'lar 22 saat süreyle inkübatörde tutulmuşlardır.



A



B

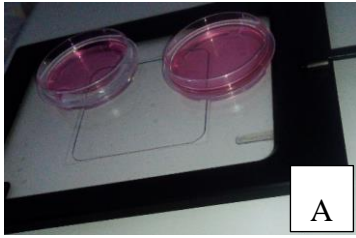


C

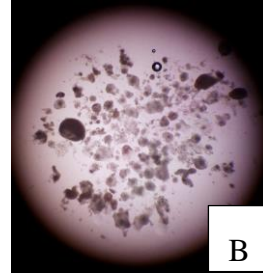


D

Şekil 3.3. A) Olgunlaşma medyumuna antibiyotik eklenmesi B) Olgunlaşma medyumunun filtre edilmesi C) Olgunlaşma medyumunun dört gözlü petriye aktarılması D) Olgunlaşma medyumunun inkübasyona bırakılması (Panasonic MCO-5M-PE)



A



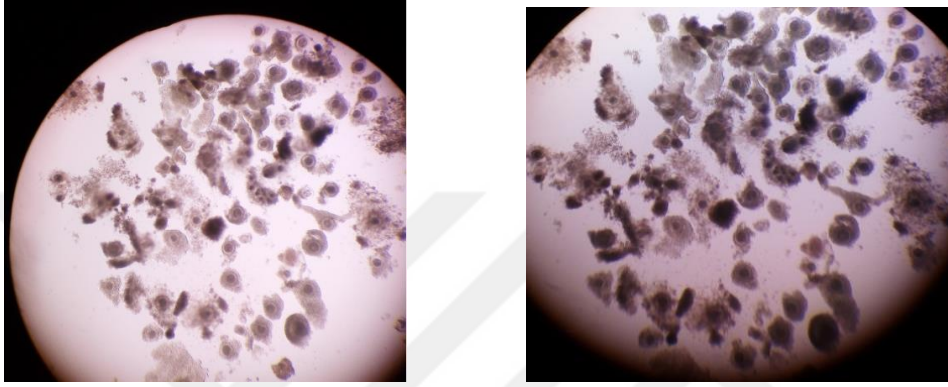
B

Şekil 3.4. A) Oosit yıkama medyumunun görüntüsü B) Stereo mikroskopta (Leica MZ6) kumulus hücrelerinin görüntüsü

3.4. Olgunlaşma Kriterinin Belirlenmesi

Olgunlaşma süresinin tamamlanmasının ardından KOK'ların kumulus genişlemesi kaydedilmiştir. Tam kumulus genişlemesi gösteren KOK'lar olgunlaşmış olarak değerlendirilmiştir. Olgunlaşmış oositler, önceden hazırlanmış hyrulinidaz çözeltisi

ile muamele edilip kumulus hücrelerinin uzaklaştırılması için 15 dakika inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra oositler üç defa önceden hazırlanmış PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra KOK'lar 0.5'lik ependorf (Sigma Z- 763004) içerisindeki 100 µl PBS'e aktarılıp 15 dakika vorteks (Labart Mult-Mixer) yapılmıştır. Daha sonra tekrar PBS ile yıkanıp kumulus hücreleri uzaklaştırılan oositler protein izolasyonuna tabi tutulmuştur.



Şekil 3.5. Olgunlaşmaya bırakılan oositlerin kumulus oosit kompleksinin genişlemesinin stereo mikroskop altındaki görüntüsü

3.5. Oositlerde Protein İzolasyonu

Kumulus hücreleri uzaklaştırılan oositler buz üzerine alınıp önceden hazırlanmış lysis tampondan 2,5 ml ependorflara (Sigma Z763020) konulmuştur. Daha sonra 2 µl DTT (Sigma 3483-12-3) eklenip pipet yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Buz üzerindeki örnekler, PBS'in uzaklaştırılması için 4 °C'de 5 dakika 300 g de santrifüj (Ependorf Centrifuge 5804 R) edilmiş ve PBS pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Elde edilen protein örneklerinin her birine 100 ml lysis tampondan eklenip 15 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Örnekler buz üzerinde behere alınıp 30 dakika çalkalayıcıya bırakılmıştır. Daha sonra tekrar 4 °C'de 13000 rpm 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Ependorfların üst kısmında protein içeren süpernatant alınıp – 20 °C'de depolanmıştır.

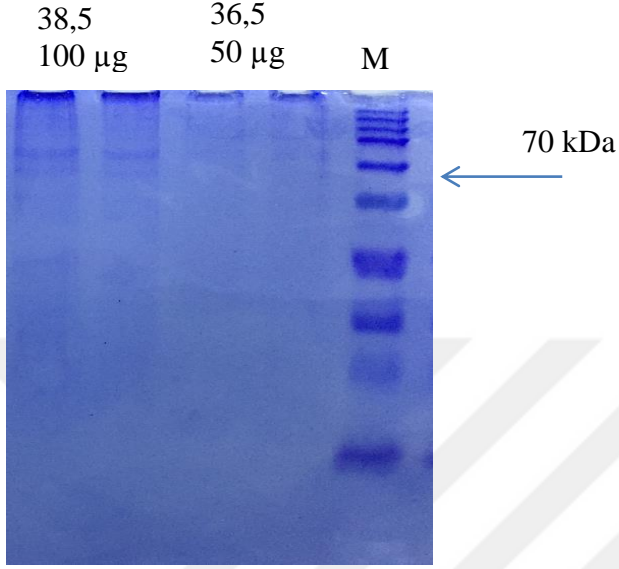
3.6. Bradford Protein Analiz Yöntemi

Çalışmada in vitro olgunlaştırılan sığır oositlerinden elde edilen protein tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde bir organik boyar madde olan Commassie brillant blue G-250'nin proteini renklendirme özelliğinden yararlanıldı. Commassie brillant blue G-250, negatif yüklü olan ve proteindeki (+) yüklü gruplara bağlanan bir boyadır (Ernst ve Zor 2010). Boya proteine bağlanınca mavi renk oluşmaktadır.

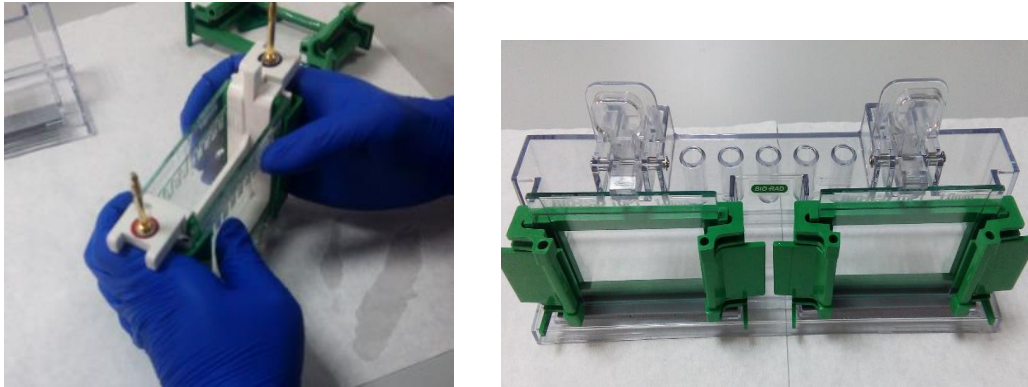
3.7. Poliakrilamid Jel Hazırlama

Farklı sıcaklıklarda olgunlaştırılan sığır oositlerinden her bir gruba ait oositler olgunlaştırmadan sonra protein izolasyonu için lizis edilip santrifüj edilerek protein izole edilmiştir. SDS-PAGE jelde iyi görüntü alabilmek için ependorf tüp içerisinde -20 °C'de saklanan protein örneklerinin konsantrasyonunu yükseltmek amacıyla örnekler -80 °C'de 24 saat dondurulup 0,140 hPA basınç altında 6 saat boyunca liyofilizatörde liyofilize edilmişlerdir. Liyofilize örneklerde protein tayini için, ilk olarak yığma jeli % 10'luk hazırlanmıştır. Bunun için akrilamid-bisakrilamid çözeltisinden 3,33 ml, 1,5 M'lık tris-HCl çözeltisinden 2,08 ml, 4,65 ml distile su, SDS'den (Kod. 8.17034.2500) 83 µl, son olarak % 10'luk APS (Akkim 193148) çözeltisinden 41 µl ve 4,16 µl Temed eklenip pipet yardımı ile hızlıca karıştırılmış ve elektroforezin (Şekil 3.7) iki cam plağı arasına pipet yardımı ile üstte tarağın takılabileceği yere kadar eklenmiştir. Hava ile temasının kesilmesi için üzeri alkol ile doldurulmuştur. Jelin donması için 35-40 dakika beklenmiş ve jel donduktan sonra yükleme jeli için akrilamid-bisakrilamid çözeltisinden 650 µl, 0,5 M tris-HCl çözeltisinden 625 µl, % 10'luk SDS'den 50 µl, 3,05 ml distile su ve son olarak % 10'luk APS'den 25 µl ve Temed'den 5 µl eklenerek pipet yardımı ile hızlıca karıştırılmıştır. Yığma jelin üstüne eklenmiş ve tarak yerleştirilmiştir. Hava ile temasının kesilmesi için üzeri alkol ile doldurulmuştur. Jelin donması için 30-45 dakika beklenmiş ve jel donduktan sonra tarak dikkatlice alınıp, cam plaklar yürütme tamponu tankına yerleştirilmiştir. Örnekler spin edilmiş ve 3 dakika ısıtıcı üzerinde protein denaturasyonu için ısıtılmıştır. Protein örnekleri jele yükleme yapılırken 50 µg ve 100 µg olacak şekilde (Şekil 3.6) yükleme yapılmıştır. Membrana aktarma sürecinde 250 µg ve 500 µg protein aktarımı gerçekleştirildi (Şekil 3.9). Koşurma

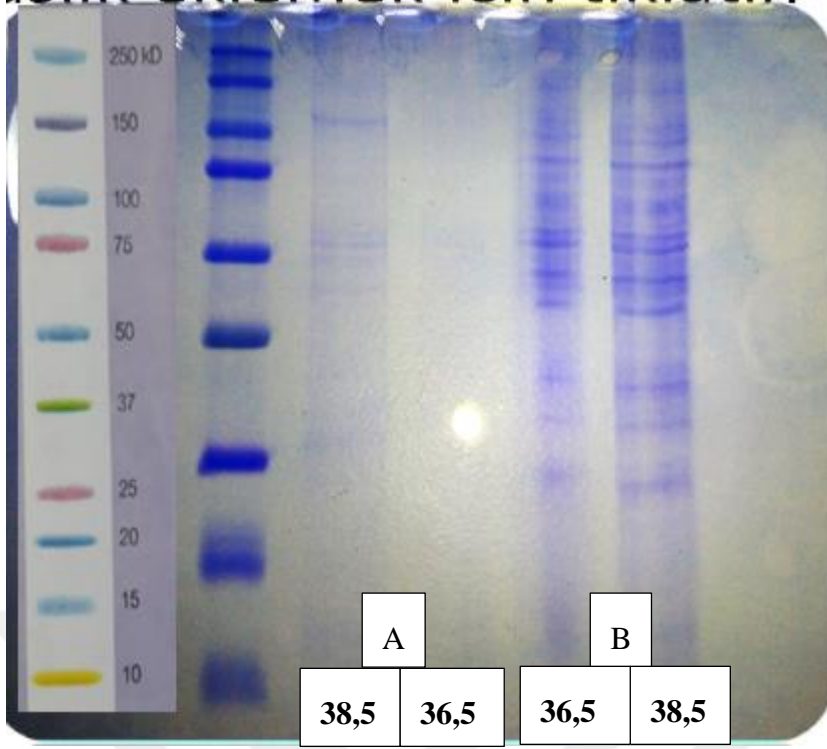
tamponunda 1,5 saat 140 A'(amper) de yürütüldü. Yürütme işleminden sonra iki cam plak arasından jel dikkatlice alınıp boyama işlemine tabi tutuldu. Yarım saat sonra jel yıkama işlemine tabi tutuldu. Bunun için destaining tamponunda yarım saat bekletildi ve bu işlen iki defa tekrarlandı. İkinci işlem den sonra protein bantlarının iyice görüntülenebilmesi için jel destaining tamponunda bir gün bekletildi.



Şekil 3.6. Poliakrilamid jel görüntüsü



Şekil 3.7. Poliakrilamid jelinin hazırlanmasında kullanılan elektroforez (Bio Rad Mini- Proteon Cell, 4-Gel System 1658004)



Şekil 3.8. A) Düşük sayıdaki oosit sayısının jel görüntüsü B) Fazla sayıdaki oositlerin jeldeki görüntüsü

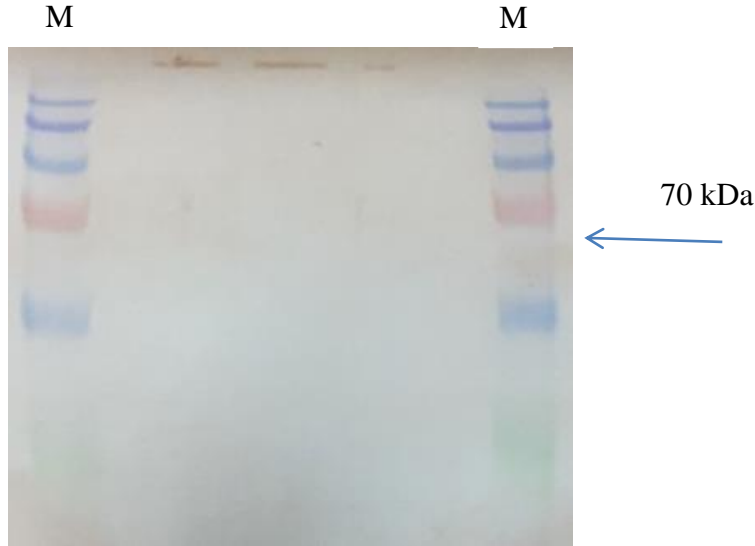
Deney sonucunda direkt olarak -20 de saklanan oositler çözülerek lysis edilen örneklerin SDS-PAGE’de görüntülenmesi sağlandı (Şekil 3.8 A). Buna göre 36,5 °C de (şekil 3.8 A) görülen protein bant görüntüsünün belirgin olmadığı, 38,5 °C’de protein bant görüntüsünün (şekil 3.8 A) belirgin olmadığı gözlemlendi. Kültür ortamında olgunlaştırılıp hemen lysis edilen sonra jel görüntülenmesi yapılan (Şekil 3.8 B) 38,5 °C’de olgunlaştırılan sığır oositlerinden elde edilen protein bant görüntüsünün, 36,5 °C’de olgunlaştırılan sığır oositlerinden elde edilen protein bant görünümünden daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir (100 adet oosit).

3.8. Bradford Analiz Sonucunun Değerlendirilmesi

Yapılan Bradford analiz yöntemine göre her bir örnekteki protein miktarı 36,5 °C’de 28,8 µg ve 38,5 °C’de 32,3 µg ve mikrogram olduğu belirlenmiştir. Isı şok 70 proteini tespiti için yapılan western blot analizi öncesinde Bradford analizi ile farklı konsantrasyonlarda (5 µg, 10 µg, 20 µg, 50 µg ve 100 µg) protein örnekleri hazırlanmıştır

3.9. Western Blott Analizleri

Western Blott analizinde blottlama işlemi için ilk olarak platform oluşturuldu ve platform üzerine sırasıyla sünger, watman kâğıdı, jel, membran, watman kâğıdı, kaba filtre kâğıdı ve sünger olacak şekilde sistem hazırlandı. Transfer tamponun içerisinde gerçekleşen bu işlem için öncelikle protein jelde koşturulan protein bantlarının membrana aktarmak için; membran TBS tampon ile ıslatılıp ve filtre kâğıtları ve süngerler ıslatıldı. Transfer tamponunda hazırlanan sandiviç 40 voltta bir gece için 4 °C’de transfer gerçekleştirildi. Bloklama işlemi için blocking tamponunda 1 saat çalkalayıcı da bırakılır. Sistem transfer tampon 4 derecede 40 voltta 12 saat koşturuldu. Transfer sistemden alınan membran blocking tamponunda 1 saat çalkalayıcıya bırakıldı. Daha sonra membran yıkama tamponu ile 3 defa 5’er dakika arayla yıkama işlemine tabi tutuldu. Daha sonra 20 ml blocking tamponunda 1/100 oranında primer (Santa Cruz Sc- 32229 Lot G0815) antibadi eklenerek 3 saat 40 rpm, 28 °C’ de çalkalayıcıya bırakıldı. Bu işlemden sonra membran tekrar 3 defa 5’er dakika yıkama işlemine tabi tutuldu. Daha sonra 20 ml blocking tampon içine konjuge antibadi (Skonder antibadi) eklenip, membran 1 saat çalkalayıcıda inkube edildi. Protein bant görüntüsünü sabitlemek için membran üzerine diamino benzidin çözeltisi eklendi ve immüno görüntüleme sağlanmıştır.



Şekil 3.9. Western blot analizi sonucu membran görüntüsü

3.10. İstatistik Analiz

Çalışma boyunca elde edilen veriler Ondokuz Mayıs Üniversitesi lisansı ile kullanılan SPSS 20,0 (2014) paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Farklı sıcaklıklarda (36,5 °C ve 38,5 °C) olgunlaştırmaya alınmış sığır oositlerinin olgunlaştırma verilerinin normallik varsayımı Shapiro Wilk testi ile belirlenmiş ve normal dağılmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle veriler açığı transformasyonuna tabi tutulmuş ve transformasyon sonrası normal dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca Levene testi ile verilerin varyans homojenliği testleri belirlenmiş ve varyansların homojen olduğu bulunmuştur. Deneme grupları açığı değerleri üzerinden t testi ile karşılaştırılmış olup veriler geriye doğru transforme edilmiş ve çizelgelerde gerçek değerler sunulmuştur.



4. BULGULAR

4.1. Kullanılan Sığır Ovaryumu ve Elde Edilen KOK'ların Sayıları

Mevcut projede mezbahadan toplam 297 adet sığır ovaryumu laboratuara getirilmiş, bunlar içerisinde 36 tanesi folliküler ve luteal kistli yapılar içerdiğinden veya KOK elde etmek için uygun folliküler yapıya sahip olmadığından deneme dışı bırakılmıştır. Dolayısıyla, çalışma boyunca toplam 261 adet sığır ovaryumu kullanılmıştır. Kullanılan ovaryumlar üzerindeki 2–8 mm çapındaki foliküllerden toplam 2894 (ovaryum başına 9,7 adet) adet KOK elde edilmiştir. Her iki olgunlaştırma sıcaklığında (36,5 °C veya 38,5 °C) 910 oosit kumulus hücrelerinden uzaklaştırıldıktan sonra lysis işlemine tabi tutulmuştur.

4.2. Sığır Oositlerinin Kumulus Genişlemesi

36,5 °C (düşük) veya 38,5 °C (geleneksel) inkübasyon sıcaklıklarında *in vitro* olgunlaştırılan sığır KOK'larının olgunlaştırma periyodu sonunda gözlemlenen kumulus hücrelerinin genişleme oranları Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Sığır oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılmasında uygulanan düşük (36,5 °C; % 81,11) veya geleneksel (38,5 °C; %84,41) inkübasyon sıcaklıklarının olgunlaştırma periyodunun sonunda gözlemlenen tam kumulus hücre genişlemesi üzerine benzer etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı sıcaklıklarda (36,5 °C veya 38,5 °C) olgunlaştırılan sığır oositlerinin kumulus ekspansiyonuna göre olgunlaşma oranları.

Sıcaklık (°C)	Toplam Oosit Sayısı	Olgunlaşan Oosit Sayısı	Olgunlaşma Oranı (%)	Std Hata	P
36,5 C°	1393	1121	81,11	3,41	0.554
38,5 C°	1501	1325	84,41	2,26	

Hücrel çevredeki sıcaklık metabolik aktivite ve gelişim için temel değişken olup sığırlarda sıcaklık stresinin veya vücut sıcaklığındaki artışın döl veriminde

düşüşlere neden olduğu bilinmektedir (Zeron vd, 2001; Şen, 2014). Şen (2014) yaptığı çalışmada sığır oositlerinin düşük (36,5 °C) veya geleneksel (38,5 °C) inkübasyon sıcaklıklarında olgunlaştırılmalarının metafaz II safhasına ulaşarak nükleer olgunlaşmalarını tamamlamış oositlerin oranı üzerine herhangi bir etkiye sahip olmadığını bildirmiştir (% 75,2 ve % 84,3). Benzer olarak çalışmamızda sığır oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında uygulanan düşük (36,5 °C) veya geleneksel (38,5 °C) inkübasyon sıcaklıklarının olgunlaştırma periyodunun sonunda gözlemlenen kumulus hücrelerinin genişleme oranı üzerine benzer etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.3. Isı Şok Proteini 70 Seviyesi

Çalışmada 36,5 °C veya 38,5 °C inkübasyon sıcaklıklarında olgunlaştırılan sığır oositlerinde, sıcaklık stresi sonucunda sentezi artan ısı şok proteini 70 belirlemek amacıyla yapılan western blot analizi sonucu elde edilen görüntü Şekil 3.9'da sunulmuştur. Western blot analizi sonucunda farklı kültür sıcaklıklarında olgunlaştırılan sığır oositlerinde ısı şok 70 proteini tespit edilememiştir. Bu sonuç sonrasında farklı konsantrasyonlardaki protein örneklerinin (1µl'de 50 1µl'de, 1µl'de100 µg, 1µl'de 250 µg ve 1µl'de 500 µg) sodyum dodesil sulfat poliakrilamid jele yüklemesi gerçekleştirilmiş ve Western blot yöntemi ile membrana aktarımı gerçekleştirilmiştir. Mevcut çalışmada farklı konsantrasyonlardaki protein örneklerinde de ısı şok 70 proteini görüntüsü elde edilememiştir.

5. TARTIŞMA

Sığır oositlerinin olgunlaşması fonksiyonel ve yapısal değişiklikler ile ilgilidir (Bever vd, 1997). Kromatinlerin yapısal değişimleri oositin nükleer olgunlaşması ya da mayoz bölünme aşamasında gerçekleşmektedir. Oositlerin son olgunlaşma (sitoplazmik olgunlaşma) safhasında fonksiyonel değişimleri ise fertilize olabilme ve ileriki embriyonik gelişim yeteneği ile dolaylı olarak ilişkilendirilebilmektedir (Bever vd, 1997; Gordon, 2003). *In vitro* koşullarda sığır oositleri metafaz II (nükleer olgunlaşma) safhasına kolayca ulaşabilmelerine rağmen, *in vivo* olgunlaşmış oositler ile kıyaslandığında sonraki embriyonik gelişimleri sınırlıdır (Hyttel vd, 1997; Shi vd, 1998). Bu durum oositlerin alışık olmadıkları *in vitro* olgunlaştırma sistemlerinden kaynaklı olabilir.

Yüksek çevre sıcaklığı oosit gelişimi ve erken embriyonik dönemde doğrudan etkili olduğundan dolayı süt sığırlarında da fertilitiyi düşürmektedir (Rispoli vd, 2013). Dolayısıyla, sığır oositlerinin *in vitro* olgunlaştırmasında büyük etkisi olan ısı stresinin, hücresel etkilerinin aydınlatılması bu biyoteknolojik uygulamanın hayvansal üretim ve hayvan ıslahı üzerine etkilerinin tam olarak belirlenmesine yardımcı olabilir.

İlk kez 1962 yılında tanımlanan ısı şok proteinleri hücrelerin yüksek ısıya maruz kalmasıyla üretimi artan bir protein grubudur (Aufrecht, 2005). Isı şok proteinlerinin dramatik artışına yol açan olay çoğunlukla ısı şok faktörü tarafından düzenlenir ve ısı şok cevabı olarak adlandırılır (Morimoto ve Santoro, 1998; Sarge vd, 2009). Isı şok proteinlerinin artışına ısı dışında enfeksiyonlar, dehidrasyon, toksik etmenler ile muamele ve ultraviyole ışığı gibi birçok stres faktöründe neden olabilmektedir (Morimoto ve Santoro, 1998; Aufrecht, 2005; Petrof vd, 2004). Bu nedenle ısı şok proteinlerine stres proteinleri de denmekte ve stres cevabının bir göstergesi olarak da görülmektedirler.

Sıcaklık stresine maruz bırakılan oositlerde transkripsiyonel olarak gelişimi etkileyen birçok faktör bulunmaktadır (Abdoon, 2003). Farklı sıcaklığa maruz bırakılan oositler olabilecek hasarları onarmak veya önlemek için stres durumunda transkripsiyonel olarak HSP70'in yanıtı verebilir. Isı şok proteini 70 hücrelerin yüksek ısı maruziyetine karşı kendilerini korumak ve herhangi bir hücresel yapısını

veya sahip olduğu genetik materyale (DNA, RNA) zarar vermemesi için ürettiği bir proteindir. Bu sebeple bu proteinlerin yüksek miktarlardaki varlığı hücrenin stres altında olduğunun en büyük göstergelerindendir. Son zamanlarda günümüz *in vitro* embriyo üretiminin olgunlaştırma aşamasında oositin ve sonraki kültür ortamında embriyonun metabolik veya biyokimyasal aktivitesini değiştirebilecek sıcaklıkların kullanıldığı iddia edilmektedir. Çünkü yapılan çalışmalar ovaryum içerisinde bulunan foliküllerin vücut sıcaklığından yaklaşık 1,5-2 °C daha soğuk olduğunu ve yumurta kanalı boyunca sıcaklığın kademeli olarak (isthmus ampulladan yaklaşık 0,43 °C daha soğuk ve her ikisi rektal sıcaklıktan yaklaşık 1-1,5°C daha soğuk) vücut sıcaklığına yükseldiğini saptamıştır (Einer-Jensen ve Hunter, 2006; Ye vd, 2007). Fakat günümüz *in vitro* embriyo üretiminin olgunlaştırma aşamasında ve kültür aşamasında sadece vücut sıcaklığı kullanılmakta bu da oositin veya embriyonun metabolik veya biyokimyasal aktivitesini değiştirebilerek serbest oksijen radikallerin ortaya çıkmasına ve oosit ve embriyoda DNA hasarlarına ve bunun bir sonucu olarak ölüme varan vakalar ile karşılaşılmaktadır. Yapılan çalışmalar düşük kültür sıcaklığında olgunlaştırılan sığır oositlerinin geleneksel kültür sıcaklığında olgunlaştırma ile benzer oranda nükleer olgunlaşma sergilediğini göstermiştir (Ravindranatha vd, 2003; Sen ve Kuran, 2013a). Dahası düşük kültür sıcaklığında olgunlaştırılan sığır oositlerinin *in vitro* fertilizasyon sonrasında geleneksel kültür sıcaklığında olgunlaştırılanlar ile benzer embriyonik gelişim sergilediği bildirilmiştir (Sen ve Kuran, 2013 a, b).

Mevcut çalışmada farklı inkübasyon sıcaklıklarında olgunlaştırılan sığır oositlerinde, sıcaklık stresi sonucunda sentezi artan ısı şok proteini 70 belirlemek amacıyla western blot analizi yapılmıştır. Western blot analizi sonucunda farklı kültür sıcaklıklarında olgunlaştırılan sığır oositlerinde ısı şok 70 proteini tespit edilememiştir. Bu sonuç doğrultusunda farklı konsantrasyonlardaki protein örneklerinin SDS- PAGE jele yüklemesi gerçekleştirilmiş ve Western blot yöntemi ile membrana aktarımı gerçekleştirilmiştir. Ancak farklı konsantrasyonlardaki protein örneklerinde de ısı şok 70 proteini görüntüsü elde edilememiştir. Bu sonuç *in vitro* sığır oosit olgunlaşmasında uygulanan farklı inkübasyon sıcaklıklarının ısı şok 70 proteini üzerine herhangi bir etkisinin olmamasından kaynaklanmış olabilir. Dahası farklı inkübasyon sıcaklıklarında olgunlaştırılan sığır oositlerinden izole edilen proteinin membrana aktarma sürecinde kullanılan ısı şok 70 proteini

antibadisinin çalışmamasından ya da kullanılan horse radish peroksidase enzimin ilgili proteinini bağlamamasından kaynaklı ısı şok 70 proteini tespit edilememiş olabilir.





6. SONUÇ

Mevcut çalışmanın sonuçları düşük (36,5 °C) inkübasyon sıcaklığında olgunlaştırılan sığır oositlerinin olgunlaşma periyodu sonundaki kumulus hücre genişlemesinin geleneksel (38,5 °C) inkübasyon sıcaklığında olgunlaştırılan oositler ile benzer olduğunu göstermektedir. Çalışmada *in vitro* kültüre edilen oositlerin olgunlaştırma sonrasında protein izolasyonu için, kumulus hücreleri uzaklaştırıldıktan sonra zona pellucidanın yıkımının sağlanmasında 1X'lik lysis tamponu başarılı olmuştur. Ayrıca olgunlaştırma sonucunda her bir deneme grubundan elde edilen olgunlaşmış oositlerin SDS- PAGE yöntemi ile protein bant görüntüsünü elde edebilmek için en az 100 adet olgunlaşmış oositte protein izolasyonu yapılmalıdır. *In vitro* olgunlaştırılmış oositlerde SDS- PAGE yöntemi ile protein bant görüntüsünü elde edebilmek için protein konsantrasyonu en az 200 µg/ml olması gerekmektedir. Çalışmada farklı sıcaklıklarda *in vitro* olgunlaştırılan sığır oositlerinden izole edilen proteinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jelde yürütülmesi ardından western blot ile selülaz membrana aktarımı sonucu ısı şok 70 proteini görüntüsü elde edilemediğinden farklı inkübasyon sıcaklıklarının sığır oositlerinin ısı şok proteininin 70 üzerine olabilecek etkileri tespit edilememiştir.

KAYNAKLAR

- Abdoon A S S (2003). Factors affecting in vitro production of bovine embryos.
Erisim: (<http://esarf2.tripod.com/abdoon.htm>) (Erisim tarihi): 12.08.2003.
- Akyol N (2005). Sığırlarda *in vivo* ve *in vitro* fertilizasyon. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 452:53-62.
- Akyol N (2006). Sığırlarda *in vitro* oosit maturasyonu. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 46 (2): 47 - 51.
- Akyol N, Kızıl S H ve Karaşahin T (2005). *In vitro* sığır embriyosu üretim ve transferi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47: 1, 1-8.
- Akyol N ve Sulu N (2004). Östrustaki inek serumunda bulunan östradiol-17 β düzeylerinin inek oositlerinin *in vitro* maturasyon ve fertilizasyonuna etkisi doktora tezi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 44.2.33-39.
- Al-Katanani Y, Paula-Lopes F and Hansen P (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 85(2): 390-396.
- Ali A A, Bilodeau J F and Sirard M A (2003). Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59, 939–949.
- Ahmad N, Schick F N and Butcher R L (1995). Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biology of Reproduction*, 52: 1129-1135.
- Ambrosio L and Schedl P (1984). Gene expression during *Drosophila melanogaster* oogenesis: analysis by in situ hybridization to tissue sections. *Developmental Biology*, 105(1): 80-92.
- Aşkar T K, Ergün N ve Turunç V (2007). Isı şok proteinler ve fizyolojik rolleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 13.1.
- Alves M F, Gonçalves R F, Pavão D L, Palazzi E G, Souza F, Queiróz R K R, Magali D A and Marcos A A (2013). Effect of heat stress on the maturation, fertilization and development rates of *in vitro* produced bovine embryos. *Cell Biology Laboratory*, Vol.3, No.3, 174-178.

- Aygan A (2008). Haloalkalofil *Bacillus sp.* izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilenaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. <http://library.cu.edu.tr/tezler/6604.pdf>. sayfa.203. Adana.
- Aufricht C (2005).Heat shock protein 70: moleküler supertool. *Pediatric Nephrology*,6,707-713.
- Balkan B (2008). Katı substrat fermentasyonu ile ham nişastayı parçalayan yeni bir fungal amilaz üretimi, saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Sayfa 85. Doktora Tezi, Trakya.
- Badinga L, Collier R J, Thatcher W W and Wilcox C J (1985). Effects of climatic and management factors on conceptions rate of dairy cattle in subtropical environment. *Journal of Dairy Science*, 68. 78-85.
- Bae L H and Foote R H (1980). Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolality. *Journal of Reprduction Fertility*, 59, 11–13.
- Baumgartner A P and Chrisman C L (1981) Cytogenetic analysis of ovulated mouse oocytes following hyperthermic stress during meiotic maturation experimental cell research. 132 359-366 (Doi: 10.1016/0014-4827 (81) 90111-7).
- Bahat A, Eisenbach M and Tur–Kaspa I (2005). Perioovulatory increase in temperature difference within the rabbit oviduct. *Human Reproductive*, 20, 2118–2121.
- Bahat A, Tur–Kaspa I, Gakamsky A, Giojalas L C, Breitbart H and Eisenbach M (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nature Medical*, 9, 149–150.
- Baykalır Y (2017). Farklı yetiştirme sistemlerinin ve yaşın yumurtacı tavukların performans, yumurta özellikleri ve ısı şok proteini 70 sentezine etkileri. *Doktora tezi*, sy. 57-58. Elazığ.
- Bernardini C, Fantinati P, Castellani G, Forni M, Zannoni A, Seren E and Bacci M L (2003). Alteration of constitutive heat sok protein 70 (HSC70) production by *in vitro* culture of porcine preimplanted embryos. *Veterinary Research Communications*, 27(Suppl. 1), 575–578.

- Beere H M, Wolf B B, Cain K, Mosser D D, Mahboubi A, Kuwana T and Green D R (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature cell biology*, 2(8): 469.
- Bevers M M, Dieleman S J, Hurk R and İzadyar F (1997). Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, 47, 13–22.
- Birler S, Pabuççuoğlu S, İleri İ K, Alkan S ve Evecen M (1998). Effects of different maturation periods on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 22(6): 551-558.
- Biggers B G, Geisert R D, Wetteman R P and Buchanan D S (1987). Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *Journal of Animal Science*, 64: 1512-1518.
- Bracett B G, Younis A I and Fayrer R A H (1989). Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes mature *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertility and Sterility*, 52: 319-324.
- Brackett B G and Zuelke K A (1993). Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39(1): 43-64.
- Bucak M N, Satılmış M, Kızıl S H, Karaşahin T ve Akyol N (2010). Sığır embriyolarının *in vitro* gelişiminde kültür medyumlarına katılan antioksidanların etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16 (1): 69-74.
- Camargo L S A, Viana J H M, Sá W F, Ferreira A M, Ramos A A and Vale F V R (2006a). Factors influencing *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction*, 3, 19-28.
- Camargo L S A, Viana J H M, Sá W F, Ferreira A M and Vale F V . (2005). Developmental competence of oocytes from prepubertal (*Bos indicus* crossbred) cattle. *Animal Reproduction Science*, 85, 53-59.
- Camargo L S A, Viana J H M, Sá W F, Ferreira A M, Ramos A A, Freitas C and Vale F V R (2006b). Developmental competence of oocytes obtained from *Bos taurus* and *Bos indicus* dairy cows raised in tropical climate. *Reproduction Fertilization of Development*, 18: 243-244.

- Philips C, Cornelissen M and Carriel V (2018). Evaluation methods as quality control in the decellularized peripheral nerve allografts. *Journal of neural engineering*, 15 (2): 021003.
- Carcy B, Précigout E, Valentin A, Gorenflot A, Reese R T and Schrével J (1991). Heat shock response of *Babesia divergens* and identification of the hsp70 as an immunodominant early antigen during ox, gerbil and human babesiosis. *Biology of the Cell*, 72(1-2): 93-102.
- Choi Y K, Jo P G and Choi C Y (2008). Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 147(3): 286-292.
- Chauhan M S, Palta P, Das S K, Katiyar P K and Madan M L (1997). Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the in vitro maturation medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro. *Theriogenology*, 48: 461-469.
- Chmelíková L V, Sedmíková M, Petr J, Rajmon R, Jeseta M and Rozinek J (2006). Expression of heat shock protein 70 in pig oocytes: heat shock response during oocyte growth. *Animal Reproduction Science*, 96, 154-164. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.12.005>).
- Ciocca D R and Calderwood S K (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell stress and chaperones*, 10(2): 86-103.
- Curci A, Bevilacqua A and Mangia F (1987). Lack of heat shock response in preovulatory mouse oocytes. *Development Biology*, 123:154-160.
- Chandolia R K, Peltier M R, Tian W and Hansen P J (1999). Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. *Biological Reproduction*, 61, 1644-48.
- Christians E, Campion E, Thompson E M and Renard J P (1995). Expression of the HSP70.1 gene, a landmark of early zygotic activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription. *Development*, 121, 113-122.

- David A, Vilensky A and Nathan H (1971). Temperature changes in different parts of the rabbit oviduct. *Preliminary report. Harefuah*, 80, 180–182.
- Dix D J (1997). HSP 70 expression and function during gametogenesis. *Cell stress and chaperones*, 2(2): 73.
- Dobson C M and Ellis R J (1998). Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *The embryo journal*, 17(18): 5251-5254.
- Duby R, Damiani P, Looney C, Long C, Balise J and Robl J (1995). Cytological characterization of maturation and fertilization in prepubertal calf oocytes. *Theriogenology*, 43(1): 202.
- Dutt R H (1963). Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. *Journal of Animal Science*. 22 713-719.
- Eddy E, O'Brien D and Welch J (1991). Mammalian sperm development *in vivo* and *in vitro*. *Elements of mammalian fertilization*, 1: 1-28.
- Eisenbach M ve Giojalas L C (2006). Sperm guidance in mammals an unpaandd road to the egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 276–285.
- Edwards J L and Hansen P J (1996). Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biology and Reproduction*, 55, 341–346.
- Edwards J L and Hansen P L (1997). Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Molecular Reproduction and Development*, 46, 138-145.
- Einer-Jensen N and Hunter R H (2006). Reproductive health in domestic animals. *Journal of Family Planning Reproduction Health Care*, 32, 245–248.
- Ergene O (2009). İneklerde kromozomal, hormonal, beslenme sorunlarına ve ısı stresine bağlı erken embriyonik ölümler. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2 (1). 36-41.
- Ernst O and Zor T (2010). Linearization of the Bradford Protein Assay. *Journal of Visualize Experimenrs* .(38) e1918, (doi:10.3791/1918).

- Eyestone W H and Boer H A (1993). FSH Enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. (Abstract). *Theriogenology*, 39:216.
- Feder M E and Hofmann G E (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 61(1): 243-282.
- Fields P I, Swanson R V, Haidaris C G and Heffron F (1986). Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(14): 5189-5193.
- Feige U, Morimoto R I, Yahara I and Polla B (1996). Stress Inducible Cellular Responses, *Birkhauser Verlag*, 77.
- Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, Nishimura K, Yamada M and Utsumi K (1997). Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro produced bovine embryos. *Journal of Animal Science*, 75, 483-489.
- Fukui Y and Ono H (1989). Effects of sera, hormones and granulose cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *Journal Reproduction Fertilization*, 89, 501-506.
- Fukushima M and Fukui Y (1985). Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 9: 323-332.
- Gardner D K (1998). Changes requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, 49, 83-102.
- Galli C and Lazzari G (1996). Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal reproduction science*, 42(1-4): 371-379.
- Gething M J and Sambrook J (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, 355(6355): 33.
- Gething M and Sambrook J (1990). Transport and assembly processes in the endoplasmic reticulum. *Seminars in cell biology*, 65-72.

- Gordon I (2003). *Laboratory production of cattle embryos*. CABI, Biotechnology in Agriculture Series, N,27. pp. 176.
- Gordon I (1994). Aspiration techniques: old and new. laboratory production of cattle embryos. Wallingford: *CAB International*, UK. pp. 71-2.
- Gomez E and Diez C (2000). Effects of glukoz and protein sources on bovine embrio development *in vitro*. *Animinal Reproduction Science* 58: 23-37.
- Grinsted J, Blendstrup K, Andreasen MP and Byskov A G (1980). Temperature measurements of rabbit antral follicles. *Journal of Reproduction. Fertilization*, 60, 149–155.
- Grondahl C, Greand T, Schmidt M and Hunter R H (1996). Bovine preovulatory follicles are cooler than ovarian stroma and deep rectal temperature. *Theriogenology*, 45, 289.
- Guérin P, Mouatassim S E and Ménézo Y (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction, Update*, 7, 175-189.
- Hagemann L (1999). Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology*, 51(2): 449-459.
- Hansen P J (2007). To be or not to be – determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology*, 6, 40–48.
- Heikkila J J, Browder L, Gedamu L, Nickells R and Schultz G (1986). Heat-shock gene expression in animal embryonic systems. *Canadian journal of genetics and cytology*, 28(6): 1093-1105.
- Hoshi H (2003). *In vitro* production of bovine embrios and their application for embrio transfer. *Theriogenology*. 59: 675-685.
- Hunter R H, Grondahl C, Greand T and Schmidt M (1997). Graafian follicles are cooler than neighbouring ovarian tissues and deep rectal temperatures. *Human Reproduction*, 12, 95–100.
- Hunter R H F, Einer–Jensen N and Greand T (2006). Presence and significance of temperature gradients among different ovarian tissues. *Microscopy Research Technique*, 69, 501–507.

- Hunter R H F and Nichol R (1986). A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *Journal of Reproduction Fertilization*, 77, 599–606.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H and Greve T (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47, 23–32.
- Izadyar F, Zeinstra E and Bevers M M (1998). Follicle stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 51, 339–345.
- Jaattela M (1999). Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of medicine*, 31(4): 261-271.
- Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T and Egeblad M (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *The EMBO journal*, 17(21): 6124-6134.
- James P, Pfund C and Craig L A (1997). Functional specificity among HSP70 moleküler chaperones. *Science*, 275, 387–389.
- Johnson M H and Nasr-Esfahani M H (1994). Radical solutions and cultural problems: Could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioassays*, 16: 31-38.
- Kanagawa H, Shimohira I and Saitoh N (1995). Manual of bovine embryo transfer. *Japan Livestock Technology Association*, 1-44.
- Kang B H, Plescia J, Dohi T, Rosa J, Doxsey S J and Altieri D C (2007). Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network. *Cell*, 131(2): 257-270.
- Kaufmann S H (1990). Heat shock proteins and the immune response. *Immunology today*, 11: 129-136.
- Kawarsky S J and King W A (2001). Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. *Zygote*, 9(1): 39-50.

- Kruip T, Bevers M M And Kemp B (2000). Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology*, 53: 611-618.
- Kojima T (1999). Embryo Transfer (ET) in Cattle-Theory and Practice: Shirakawa, Japan: *National Livestock Breeding Center Press*.
- Komar A (1973). Parthenogenetic development of Mouse eggs activated by heat shock. *Journal of Reproduction Fertility*, 35: 433-443.
- Lee S J (1990). Expression of HSP86 in male germ cells. *Molecular and cellular biology*, 10(6): 3239-3242.
- Leese H J (2002). Quiet please, do not disturb. A hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays*, 24: 845–849.
- Leese H J, Sturmey R G, Baumann C G and McEvoy T G (2007). Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Human Reproduction*, 22: 3047–3050.
- Leese H J, Baumann C G, Brison D R, McEvoy T G and Sturmey R G (2008). Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Molecular Human Reproduction*. 14, 667–672.
- Lindquist S (1986). The heat-shock response. *Annual review of biochemistry*, 55(1): 1151-119.
- Liu Y X (2007). Interaction and signal transduction between oocyte and somatic cells in the ovary. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12: 2782-2796.
- Lojkić M, Uvodić S, Getz I, Samardžija M, Aladrović J, Maćešić N and Benić M (2016). The influence of follicle size on the developmental kinetics of bovine embryos. *Veterinarski arhiv*, 86(5): 613-622.
- Lyons C, Dowling V, Tedengren M, Gardeström J, Hartl M G, O'Brien N and Sheehan D (2003). Variability of heat shock proteins and glutathione S-transferase in gill and digestive gland of blue mussel, *Mytilus edulis*. *Marine environmental research*, 56(5): 585-597.
- Naughton L M, Lovell R and Madden L (2006). Heat shock proteins in exercise: a review department of sport, health and exercise science, University of Hull,

Cottingham Road, Hull HU6 7RX, England. *Journal of Exercise Science and Physiotherapy, Vol. 2: 13-26,*

- Mahmood T and Yang P C (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences, 4(9): 429.*
- Marquent B L and Humblot P (1998). Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. *Theriogenology.49: 3-11.*
- Martins A J, Sirisathien S and Brackett B (2001). Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in preimplantation bovine embryos. *Human Reproduction, 16, 893–901.*
- Matwee C, Kamaruddin M, Betts D H, Basrur P and King W A (2001). The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. *MHR: Basic science of reproductive medicine, 7(9): 829-837.*
- Mazur P and Schneider U (1986). Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophysic, 8, 259-284.*
- McEvoy T G, Sinclair K D, Young L E, Wilmut I and Robinson J J (2000). Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: relevance to blastocyst culture in human ART. *Human Fertility, 3, 238–246.*
- Mingoti G Z, Garcia J M, Rosa E and Silva A A M (1995). The effect of serum on *in vitro* maturation in *in vitro* fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes cultured with granulosa cells. *Brazilia J. OF Medical and Biological Researc., 28: 213-217.*
- Miller D, Brough S and Al Harbi O (1992). Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. *Human Reproduction, 7: 637-645.*
- Moor R M and Trounson A O (1977). Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *Journal of Reproduction Fertilization, 49: 101-109.*

- Morimoto R I and Santoro M G (1998). Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature biotechnology*, 16(9): 833.
- Morimoto R I, Hunt C, Huang S Y, Berg L and Banerji S (1986). Organization, nucleotide sequence, and transcription of the chicken HSP70 gene. *Journal Biology Chemical*, 261, 12692– 12699.
- Mortensen C J, Choi Y H, Ing N H, Kraemer D C, Vogelsang M M and Hinrichs K (2010). Heat shock protein 70 gene expression in equine blastocysts after exposure of oocytes to high temperatures *in vitro* or *in vivo* after exercise of donor mares. *Theriogenology* 74, 374–383.
- Nagai T (2001). The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55(6): 1291-1301.
- Nakada K, Moriyoshi M, Nakao T, Watanabe G and Taya K (2000). Changes in concentrations of plasma immuno reactive follicle stimulation hormone, luteinizing hormone, estradiol 17 β , testosterone, progesteron and inhibin in heifers from birth to puberty. *Domestic Animal Endocrinology*, 18: 57-69.
- Neuer A, Spandorfer S, Giraldo P, Jeremias J, Dieterle S, Korneeva I and Witkin S (1999). Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 7(1-2): 10-16.
- Otaka M, Odashima M and Watanabe S (2006). Role of heat shock proteins (molecular chaperones) in intestinal mucosal protection. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(1): 1-5.
- Ocana Q J M, Merlin M P, Ortega M M and Millan M M, (1999). The effect of different sera and bovine serum albumin fraction (BSA) on *in vitro* maturation of immature bovine oocytes. *Archivos de Zootecnia*, 48, 167–174.
- Oliveira A T, Lopes R F and Rodrigues J L (2006). Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* with different serum concentrations. *Reproduction Domestic Animal*, 41, 129–36.

- Paula-Lopes F. F. and Hansen P. J. (2002). Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology Reproduction*, 66:1169-1177.
- Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E and Garrido C (2003). Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, 304(3): 505-512.
- Petrof E O, Ciancio M J and Chang E B (2004). Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Journal of Digestive Diseases*, 5(2): 45-50.
- Pegoraro L M C, Thuard J M, Dellalleau N, Guerin B, Deschamps J C, Marquent B L G and Humblot P (1998). Comparisson of sex ratio and cell number of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization bovine blastocyst co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with vero cells. *Theriogenology*, 49: 1579-1590.
- Pockley A G (2001). Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert reviews in molecular medicine*, 3(23): 1-21.
- Ravindranatha B M, Nandi S, Raghu H M and Reddy S M (2003). *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes: effects of storage of ovaries, IVM temperatures, storage of processed sperm and fertilization media. *Reproduction Domestic Animal*, 38, 21–26.
- Rougvie A E and Lis J T (1988). The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell*, 54(6): 795-804.
- Ritossa F (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell stress chaperones*;1(2):97-8.
- Rispoli L A, Payton R R, Gondro C, Saxton A M, Nagle K A, Jenkins B W, Schrick F N and Edwards J L (2013). Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. *Brehm Animal Science*, 12: 1-48.

- Rivera R M and Hansen P J (2001). Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction*, 121 107-115.
- Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First N L, Parrish J J and Memili E (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal reproduction science*, 101(3-4): 225-240.
- Sarge K D, Kyong O and Sarge P (2009). Detection of proteins sumolated *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Endocrinology*, 265-27.
- Sakatani M, Kobayashi S I and Takahashi M (2004). Effect of heat shock on *in vitro* development and intracellular oxidative state of bovine embryos. *Moleküler Reproduction Development*, 67: 77-82.
- Samali A and Orrenius S (1998). Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell stress and chaperones*, 3(4): 228.
- Saeki K, Leibfried- Rutledg M L and First N L (1990) Are fetal calf serum and hormones necessary during *in vitro* maturation of cattle oocytes for subsequent development? *Theriongenology*. 33:316 (Abstr.).
- Schlesinger M J (1990). Heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 265(21): 12111-12114.
- Schellander K, Fuhrer F, Brackett B G, Korb H and Schleger W (1990). *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplement with estrous cow serum. *Theriongenology*. 33(2): 477-485.
- Shamsuddin M, Larsson B and Rodriguez M H (1993). Maturation related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Animimal Reproduction Science*, 31, 49–60.
- Schmitt E, Parcellier A, Gurbuxani S, Cande C, Hammann A, Morales M C and Giordanetto F (2003). Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer research*, 63(23): 8233-8240.
- Shi D S, Avery B and Greve T (1998). Effects of temperature gradients on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriongenology*, 50, 667–674.

- Semple E, Loskutoff N, Leibo S and Betteridge K (1993). Effects of culture medium and maturation time on *in vitro* development of bovine oocytes into blastocysts. *Theriogenology*, 39(1): 307.
- Shi Y and Thomas J (1992). The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Molecular and cellular biology*, 12(5): 2186-2192.
- Sirard M A, Desrosier S and Assidi M (2007). In vivo and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology*, 68: S71-S76.
- Simoncelli F, Morosi L, Rosa I D, Pascolini R and Fagotti A (2010). Molecular characterization and expression of a heat shock cognate 70 (Hsc70) and a heat shock protein 70 (HSP70) cDNAs in RNA (Pelophylax) lessonae embryos. *Comparative Biochemistry Physiology*, A 156, 552–560.
- Sharma G T, Nath A, Prasad S, Singhal S, Singh N, Gade N E, Dubey P K and Saikumar G (2012). Expression and characterization of constitutive heat shock protein 70.1 (HSPA-1A) Gene in *in vitro* produced and *in vivo* derived buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Domestic in Animal Reproduction*, (10.1111/j.1439-0531.2012.02002.x.)
- Sjoblom C, Roberts C T, Wikland M and Robertson S A (2005). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. *Endocrinology*, 146, 2142–2153.
- Sreedhar A S and Csermely P (2004). Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacology and therapeutics*, 101(3): 227-257.
- Stankiewicz A R, Lachapelle G, Foo C P, Radicioni S M and Mosser D D (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46): 38729-38739.

- Sturmeý R G, Hawkhead J A, Barker E A and Leese H J (2009). DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. *Human Reproduction*, 24, 81–91.
- Suzuki K, Sawa Y, Kaneda Y, Ichikawa H, Shirakura R and Matsuda H (1997). *In vivo* gene transfection with heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in rat. *The Journal of clinical investigation*, 99(7): 1645-1650.
- Suzuki H, Ju J C, Parks J E and Yang X (1998). Effect of heat shock on the surface ultrastructural characteristics of bovine oocytes. *Theriogenology*, 49: 234.
- Sen U ve Kuran M (2013a). Effect of culture temperature and oocyte quality on *in vitro* maturation of bovine oocytes. Book of Abstracts of 29th *Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association*, 29: 206.
- Şen U ve Kuran M (2013b). Farklı inkübasyon sıcaklığının sığır oositlerinin *in vitro* olgunlaşması üzerine etkisi. 8. *Ulusal Zootekni Bilim Kongresi*, 05–07 Eylül, Çanakkale, 8, 188–194.
- Şen U (2014) Sığırlarda *in vitro* embriyo üretiminde olgunlaştırma sıcaklığı ve antioksidan kullanımı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Doktora tezi.182. Samsun.
- Tissiéres A, Mitchell H K and Tracy U M (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of molecular biology*, 84(3): 389-398.
- Tavares A, Oliveira de D, Felix Lopes R F and Rodrigues L J (2005). Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* under varying embryo density conditions. *Theriogenology*, 64, 1559–1572.
- Trimarchi J R, Liu L, Porterfield D M, Smith P J and Keefe D L (2000). Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biology Reproduction*, 62: 1866-1874.

- Tseng J K, Tangj P C and Ju C (2006). *In vitro* thermal stress induces apoptosis and reduces development of porcine parthenotes.
(<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.003>).
- Van der Westerlaken L, de Wit A, van der Schans A, Eyestone W and de Boer H (1992). Relationship between kinetics of polar body extrusion and developmental potential of bovine oocytes. 12 th. *International. Congressyuum. on Animal. Reproduction*, 1: 384-386.
- Velazquez J M and Lindquist S (1984). hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell*, 36(3): 655-662.
- Verbeke P, Fonager J, Clark B F and Rattan S I (2001). Heat shock response and ageing: mechanisms and applications. *Cell biology international*, 25(9): 845-857.
- Walsh D, Li Z, Wu Y and Nagata K (1997). Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53.2): 198-211.
- Wang J Z, Hong S S, Miao D Q, Liu N, Zhou P, Tan J T and Ge L (2009). Effects of heat stress during *in vitro* maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. *Reproduction and Fertility*, Doi: 10.1530/Reproduction-08-0339.
- Welch W J (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological reviews*, 72(4): 1063-1081.
- Welch W J, Garrels J I, Thomas G, Lin J and Feramisco J R (1983). Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress proteins as glucose-and Ca²⁺-ionophore-regulated proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 258(11): 7102-7111.
- Werner A, Meinhardt A, Seitz J and Bergmann M (1997). Distribution of heat-shock protein 60 immunoreactivity in testes of infertile men. *Cell and tissue research*, 288(3): 539-544.

- Whitley D, Goldberg S P and Jordan W D (1999). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *Journal of Vascular Surgery*, 29 (4): 748-751.
- Whittingham D G (1980). Partenogenesis in mammals. Oxford reviews of reproductive biology, vollume 2.
- Wolfenson D, Roth Z and Meidan R (2000). Impaired Reproduction in heat- stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, 60-61 535-547.
- Wolfenson D, Lew B J and Thatcher W W (1997).Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Animal Reproduction*, 47: 9-19.
- Ye J, Coleman J, Hunter M G, Craigon J, Campbell K H and Luck M R (2007). Physiological temperature variants and culture media modify meiotic progression and developmental potential of pig oocytes *in vitro*. *Reproduction*, 133, 877–886.
- Yilmaz O, Öner Y, Ata A G N, Karaca O ve Cemal İ (2005). Develerde sıcaklık stres proteinleri ve sıcaklığa dayanıklılıkta etkili bazı morfolojik özellikler. *Fen Bilimleri Bildirileri*, 58.
- Younis A, Brackett B and Fayrer-Hosken R (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Molecular reproduction and development*, 23 (2): 189-201.
- Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D and Arav A (2001). Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*, 12, 447–454.
- Zhang X Y, Zhang M Z, Zheng C J, Liu J and Hu H J (2009). Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150 (4): 465-473.

Zuelke K A and Brackett B G (1990). Luteinizing hormone enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biology Reproduction*, 43(5), 784-787.





ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı	Leyla BENER
Doğum Yeri	Adıyaman
Doğum Tarihi	1984
Yabancı Dili	İngilizce
E-mail	leyla.bener022@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise	Erdemir Lisesi
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal
Yüksek Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yayımlar

Bener L, Yaşar R ve Kuran M (2018). Isı Şok Proteinleri ve *In Vitro* Embriyo. *Black Sea Journal of Agriculture*, 1(3): 89 – 93.