T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİKOPEN VE ASKORBİK ASİT'İN *İN VİTRO* SIĞIR EMBRİYO KÜLTÜR MEDYUMLARINA İLAVESİNİN EMBRİYO GELİŞİMİ VE KALİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Salih NARLIÇAY

DOKTORA TEZİ

DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN

KONYA-2025

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİKOPEN VE ASKORBİK ASİT'İN *İN VİTRO* SIĞIR EMBRİYO KÜLTÜR MEDYUMLARINA İLAVESİNİN EMBRİYO GELİŞİMİ VE KALİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Salih NARLIÇAY

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 22212025 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2025

ÖNSÖZ

Dünya nüfusunun hızla artmasıyla birlikte, hayvansal protein kaynaklarına duyulan ihtiyaç da giderek artmaktadır. Artan nüfusla birlikte gıda güvenliği ve sürdürülebilir üretim anlayışı daha da önem kazanmaktadır. Hayvansal üretimde verimliliği artırarak hem kaliteli hem de sağlıklı protein kaynaklarının sürdürülebilirliğini sağlamak, modern hayvancılığın temel hedeflerinden biri olmuştur. Bu noktada, hayvan ıslahı ve üreme biyoteknolojileri, geleceğin tarım ve hayvancılık politikalarının temel taşlarından biri haline gelmiştir.

İn vitro embriyo üretimi ve transferi, hayvancılık sektöründe genetik ilerlemeyi hızlandıran, verimliliği yükselten ve özellikle nesli tükenme riski taşıyan türlerin korunmasına katkı sağlayan önemli bir biyoteknolojik yöntemdir. Bu teknoloji sayesinde, üstün genetik potansiyele sahip bireylerin çoğaltılması mümkün olmakta, aynı zamanda üreme kapasitesi sınırlı ya da doğal yollarla üremekte güçlük çeken hayvanlardan sağlıklı yavrular elde edilebilmektedir.

Son yıllarda, *in vitro* embriyo üretimi süreçlerinde medyumlarım ve kültür koşullarının optimize edilmesiyle birlikte embriyo gelişim oranlarında kayda değer ilerlemeler sağlanmıştır. IVEP ortamlarına eklenen antibiyotikler, büyüme faktörleri ve antioksidanlar, embriyo gelişim sürecini doğrudan etkilemekte ve kaliteyi artırmaktadır. Özellikle antioksidanların önemi giderek daha fazla anlaşılmaktadır. Embriyonun gelişim sürecinde maruz kaldığı oksidatif stres, hücresel düzeyde hasara neden olabilmekte ve gelişim potansiyelini olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenle, kültür ortamlarına antioksidan eklenmesi, embriyo kalitesini artıran ve sağlıklı embriyo gelişimini destekleyen kritik bir faktördür.

Askorbik asit, likopen ve diğer doğal antioksidanların kullanımı, embriyo kalitesini artırmakta ve gelişim sürecini olumlu yönde etkilemektedir. Bu bileşikler, hücresel düzeyde serbest radikallerin etkisini azaltarak DNA hasarını önlemekte, mitokondriyal fonksiyonları desteklemekte ve embriyo gelişiminin daha sağlıklı ilerlemesine katkıda bulunmaktadır.

Bu bağlamda, *in vitro* embriyo üretimi üzerine yapılan bilimsel çalışmaların desteklenmesi, hayvancılık sektöründe sürdürülebilir üretim modellerinin geliştirilmesine büyük katkılar sağlayacaktır. Daha sağlıklı ve kaliteli embriyoların elde

edilmesi, hayvan yetiştiriciliğinde verimliliği artıracak ve genetik üstünlüklerin daha etkin bir şekilde yayılmasını sağlayacaktır.

Sunulan tez çalışmasında, *in vitro* embriyo üretiminin temel prensipleri, sürecin optimizasyonuna yönelik yapılan araştırmalar ve antioksidan kullanımının embriyo gelişimi üzerindeki etkileri detaylı olarak ele alınmıştır.

Tez çalışmam ve doktora eğitimimin her aşamasında hiçbir yardımını esirgemeyen hem saha çalışmaları hem de laboratuvar koşullarındaki bilimsel tecrübesini aktaran başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN'a canı gönülden teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince yardımı esirgemeyen, gelişimimde büyük katkısı bulunan ve mensubu olmaktan gurur duyduğum Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı başkanımız ve Dekanımız Sayın Prof. Dr. Barış Atalay USLU'ya teşekkür ederim.

Selçuk Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK'a, her zaman yanımda olduğu ve doktora eğitimim boyunca gelişimime sağladığı katkılar için içtenlikle teşekkür ederim. Sadece doktora eğitimim süresince değil her zaman yanımda olan, yeri geldiğinde evini açan, Konya ili'nde kendimi aile ortamımda hissettiren Dr. Öğr. Üyesi Mustafa BODU'ya ve ailesine teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Hasan ALKAN'a, Doç. Dr. Kübra KARAKAŞ ALKAN'a, Doç. Dr. Fatma SATILMIŞ'a ve doktora öğrencisi Vet. Hek. Yunus Emre DENİZ'e her çalışmamda yardım ettikleri ve ekip çalışmasını aşıladıkları için teşekkür ederim. Yine aynı ana bilim dalında görev yapmakta olan Doç. Dr. Sakine Ülküm ÇİZMECİ'ye başım sıkıştığında sunduğu imkân ve destekler için ayrıca teşekkür ederim.

Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı'na geçiş yapan Doç. Dr. Alper Koçyiğit'e, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ndeki görev süresi boyunca hem yüksek

lisans hem de doktora eğitimim sırasında gelişimime sağladığı katkılar için teşekkür ederim.

Necmettin Erbakan Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Dr. Ayşe SARI'ya embriyo üretimi üzerine çalışmamda verdiği bilgiler ve yardımları üzerine teşekkür ederim.

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mehmet Buğra KIVRAK'a tez çalışmamın istatistiksel analiz kısmında ve grafiklerinin oluşturulmasında verdiği emekler ve iyi bir bilim insanı olmamda yol gösterdiği için ayrıca teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının tamamlanmasında bana destek olan, yanımda olan ve sabır gösteren aileme en içten teşekkürlerimi sunarım. Öncelikle, beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olup sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen anneme ve babama minnettarım. Onların emekleri, fedakârlıkları ve duaları olmasaydı, bu noktaya ulaşmam mümkün olmazdı. Sevgili kardeşlerime, varlıklarıyla bana güç verdikleri, zor zamanlarımda yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Hayat arkadaşım, sevgili eşim Esra NARLIÇAY'ın, bu zorlu süreçte gösterdiği sabır, anlayış ve destek için sonsuz teşekkür ederim. Stresli anlarımda bana karşı gösterdiği tevazu, hoşgörü ve fedakârlık, bu süreci benim için çok daha anlamlı kıldı. Sevgili kızım Aybala'ya, varlığıyla hayatıma ışık kattığı, her anımda bana ilham olduğu için minnettarım. Onun masum gülümsemesi ve sınırsız sevgisi, en zorlu anlarda bile bana güç verip umudumu tazeledi. Onun varlığı, bu süreci yalnızca bir akademik yolculuk değil, aynı zamanda anlam dolu bir yaşam deneyimine dönüştürdü. Ailemin sevgisi ve desteği olmasaydı, bu yolculuğu tamamlamak çok daha zor olurdu. Hepinize minnettarım.

Bu tez çalışması Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 22212025 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR vi
ÖZET ix
SUMMARY x
1. GİRİŞ 1
1.1. Embriyo Keşfinin Tarihçesi 1
1.2. Dünya'da ve Türkiye'deki İlk Embriyo Transfer Çalışmaları 2
1.3. *İn Vitro* Fertilizasyonun Tanımı 4
1.4. *İn Vitro* Fertilizasyonun Avantajları 4
1.5. *İn Vitro* Fertilizasyonun Tarihçesi 6
1.6. Türkiye'de Yapılan *İn Vitro* Fertilizasyon çalışmaları 7
1.7. *İn Vitro* Fertilizasyon'da Güncel Durum 7
1.8. Oogenezis 7
1.9. Sığırlarda *İn Vitro* Embriyo Üretimi (IVEP) 10
1.9.1. Ovaryumlardan Oosit Elde Edilmesi 11
1.9.2. Oositlerin Kalitelerinin Değerlendirilmesi 14
1.9.3. Oositlerin *İn Vitro* Maturasyonu (IVM) 17
1.9.4. *İn Vitro* Fertilizasyon 27
1.9.5. Embriyoların Kültürü (IVC) 32
1.9.6. Embriyoların Değerlendirilmesi 35
1.9.7. Embriyoların Kalitelerine Göre Sınıflandırılması 36
1.9.8. Embriyoların Aşamalarına Göre Sınıflandırılması 37
1.10. Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri (ROS) 37
1.11. Antioksidanlar 39
1.11.1. *İn Vitro* Embriyo Üretimi ve Oksidatif Streste Antioksidanların Önemi 41
1.11.2. Likopen 42
1.11.3. Askorbik asit (Vitamin C) 45
2. GEREÇ VE YÖNTEM 47
2.1. Gereç 47
2.2. Yöntem 47
2.2.1. Antioksidanların Hazırlanması 47
2.2.2. Ovaryumların Eldesi ve Laboratuvara Nakli 48
2.2.3. Oositlerin Taranması ve Değerlendirilmesi 50

2.2.4.Oositlerin *İn Vitro* Maturasyonu (IVM) 51
2.2.5.Spermanın Hazırlanması ve *İn vitro* Fertilizasyon 52
2.2.6.Embriyoların *İn vitro* Kültürü (IVC) 53
2.2.7.*İn Vitro* Kültür Sonrası Embriyoların Değerlendirilmesi 54
2.2.8.Embriyoların Tunel Kiti ile Boyanması ve Hücre Sayılarının Belirlenmesi 54
2.2.9.İstatistiksel Analiz..... 56
3. BULGULAR..... 57
3.1. *İn Vitro* Maturasyon Bulguları 57
3.2. *İn Vitro* Fertilizasyon Bulgular 59
3.3. *İn Vitro* Kültür Bulguları.....60
4. TARTIŞMA..... 69
5. SONUÇ ve ÖNERİLER. 82
6. KAYNAKLAR 84
7. EKLER 114
EK-A. Etik Kurul Onayı 102
EK- B. Turnitin Raporu 103
8. ÖZGEÇMİŞ 105

SİMGELER ve KISALTMALAR

% Yüzde

˚C Santigrat derece

< Küçüktür

> Büyüktür

± Artı-Eksi

µL Mikrolitre

µM Mikromolar

ACN Apoptotik hücre sayısı

ATP Adenozin trifosfat

BO Brackett ve oliphant medyumu

BOEC Sığır ovidukt epitel hücre kültürü

BSA Sığır serum albümini

BWW Biggers Whitten Whittingham Medyumu

Ca^{+2} Kalsiyum iyonu

cAMP Siklik adenozin monofosfat

CAT Katalaz

CDK1 Siklik bağımlı kinaz 1

Cl^{-} Klor

CO_2 Karbondioksit

CPE Sitoplazmik poliadenilasyon elemanı

CPEB4 Sitoplazmik poliadenilasyon elemanı bağlayıcı protein 4

CR1aa Charles rosenkrans 1aa

DMSO Dimetilsülfoksit

DNA Deoksiriboz nükleik asit

ECS Östrustaki sığır serumu

EGF Epidermal büyüme faktörü

FCS Fötal buzağı serumu

Fe^{2+} Ferröz

Fe^{3+} Ferrik

FSH Folikül uyarıcı hormon

GPx Glutatyon peroksidaz

GSH Glutatyon

GV Germinal vezikül

GVBD Germinal vezikül yıkımlanması

H_2O_2 Hidrojen peroksit

$HCO3^-$ Bikarbonat

HECM-6 Hamster embriyo kültür medyumu-6

HSA İnsan serum albümini

ICM İç hücre kümesi

ICSI İntra sitoplazmik sperm enjeksiyonu

IETS Uluslararası embriyo teknolojileri topluluğu

IGF-1 İnsülin benzeri büyüme faktörü

IVC *İn vitro* kültür

IVF *İn vitro* fertilizasyon

IVM *İn vitro* maturasyon

IVEP *İn vitro* embriyo üretimi

KOK Kumulus oosit kompleksi

KRB Krebs medyumu

KSOM Potasyum simpleks optimizasyon medyumu

LDL Lipoprotein

LH Luteinleştirici hormon

MDA Malondialdehit

mDM Modifiye defined (içeriği belli) medyum

Mean±SD Ortalama standart sapma

mg Miligram

Mg Magnezyum

mL Mililitre

mm Milimetre

mM Milimolar

mmHg Milimetre civa

MOET Çoklu ovulasyon ve embriyo transfer

mOsm Miliosmol

MPF Olgunlaşmayı destekleyici faktör

mRNA Mesajcı ribonükleik asit

Na^+ Sodyum

OPU Ovum pick up (Ovum Toplanması)

OS Oksidatif stres

PBS Fosfat tampon solüsyonu

Pen. Penisilin

pH Hidrojen iyonunun gücü

PN Pronükleus

QAM Quinn's advantage medyumu

RNA Ribonükleik asit

ROS Reaktif oksijen türleri

SNP Tek nükleotid polimorfizmi

SOD Süperoksit dismutaz

SOF Sentetik ovidukt sıvısı

Spz. Spermatozoon

Strept. Streptomisin

TALP Tirode'nin albümin laktat piruvat solüsyonu

TCM-199 Doku kültür medyumu

TCN Toplam hücre sayısı

TE Trofektoderm

UFO Fertilize olmayan oosit (Unfertilized Oocytes)

YÜT Yardımcı üreme teknikleri

ZP Zona pellusida

µmol/L Mikromolar/Litre

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Likopen ve Askorbik Asitin *İn Vitro* Sığır Embriyo Kültür Medyumlarına İlavesinin Embriyo Gelişimi ve Kalitesi Üzerine Etkisi

Salih NARLIÇAY

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2025

Sunulan tez çalışmasında, enzimatik nitelikte olmayan Likopen ve Askorbik asit antioksidanlarının ayrı veya kombine gruplarının embriyo kültür medyumuna ilavesiyle oksidatif stresin azaltılıp elde edilen embriyo sayısı ve kalitesinin artırılması amaçlanmıştır.

Çalışmanın materyalini, mezbahadan uygun koşullar altında laboratuvara getirilen 424 ovaryum oluşturdu. Ovaryum üzerindeki 2-8 mm çaptaki foliküller aspire edilerek oositler toplandı. Toplanan oositler kalitelerine göre sınıflandırıldı ve çalışmaya sadece A kalite immature oositler dahil edildi. Oositlerin maturasyon, fertilizasyon ve kültür süreçleri için IVF Bioscience firmasına ait ticari solüsyonlar kullanıldı. Oositlerin maturasyonu ve fertilizasyonu, 38,5˚C, %5,5 CO_2 ve yüksek oranda nemli ortam sağlayan inkübatörde gerçekleştirildi. Maturasyonunu tamamlayan oositler fertilizasyon sürecine bırakıldı Fertilizasyon işlemi tamamlanan muhtemel zigotlar kültür ortamına alındıktan sonra, iki farklı antioksidanın ayrı ve kombine dozları ilave edilerek gruplara ayrıldı. Kültür işlemi %6 CO_2, %6 O_2, 38,5˚C ısı ve yüksek oranda nem içeren inkübatörde 6-9 gün süresince gerçekleştirildi. Fertilizasyon 0. gün kabul edilerek 6. günden itibaren IVC ortamında blastosist varlığı kontrol edildi. Gruplar arasındaki blastosist sayılarındaki farklılıklar istatistiksel olarak analiz edildi. Genel olarak kombine gruplardan elde blastosist ve blastosiste ulaşma oranları, kontrol ve likopen grubunun farklı dozlarından yüksek olduğu istatistiki olarak saptandı ($P<0,05$). Sunulan tez çalışmasında likopen ve askorbik asit ilave edilen gruplar arasında istatistiki olarak farklılık elde edilmedi ($P>0,05$).

Çalışmada elde edilen blastosistlerden, her grupta en az 10'ar tane olacak şekilde TUNEL boyaması uygulandı. Blastosistteki hücre (iç hücre kümesi, trofektoderm, toplam hücre sayıları) ve apoptotik hücre sayıları belirlendi. Blastosistlerdeki hücre sayıları, kombine gruplarında, kontrol ve likopen gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu belirlendi ($P<0,05$). Apoptotik hücre sayıları incelendiğinde istatistiki olarak en düşük likopen 0,2 µM ve askorbik asit 2 mM (Lik0.2+AA2) grubunda olduğu saptandı ($P<0,05$).

Sonuç olarak, likopen ve askorbik asit gibi bazı antioksidanların tek başına veya kombinasyon halinde kültür ortamına eklenmesinin gelişim oranları üzerinde olumlu etkisi olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan; Askorbik Asit; Blastosist; *İn Vitro* Kültür; Likopen

SUMMARY

REPUBLIC of TÜRKİYE

SELCUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effects of Lycopene and Ascorbic Acid Supplementation in *In Vitro* Bovine Embryo Culture Medium on Embryo Development and Quality

Salih NARLIÇAY

Department of Reproduction and Artificial Insemination

PhD Thesis / KONYA-2025

In this thesis study, the aim was to reduce oxidative stress and improve both the quantity and quality of embryos by supplementing the embryo culture medium with non-enzymatic antioxidants, Lycopene and Ascorbic acid, either separately or in combination.

The material of the study consisted of 424 ovaries, which were transported to the laboratory under appropriate conditions from a slaughterhouse. Follicles with 2–8 mm diameters on the ovaries were aspirated to collect oocytes. The collected oocytes were classified based on their quality, and only A-grade immature oocytes were included in the study. Commercial solutions from the IVF Bioscience company were used for the maturation, fertilization, and culture processes of the oocytes. Oocyte maturation and fertilization were carried out in an incubator providing a temperature of 38.5°C, 5.5% CO_2, and a highly humid environment. The oocytes that completed maturation were subjected to the fertilization process. After the fertilization process was completed, the presumptive zygotes were transferred to the culture medium, and they were divided into groups with the addition of different doses of two separate antioxidants, both individually and in combination. The culture process was conducted in an incubator with 6% CO_2, 6% O_2, a temperature of 38.5°C, and high humidity for 6–9 days. Regarding fertilization as day 0, blastocysts in the IVC medium were examined starting from day 6. The differences in blastocyst numbers among the groups were statistically analyzed. Overall, it was statistically determined that the number of blastocysts and the blastocyst formation rates obtained from the combined groups were higher than those of the control and lycopene groups at different doses ($P<0.05$). However, no statistically significant difference was observed among the groups supplemented with lycopene and ascorbic acid ($P>0.05$).

From the blastocysts obtained in the study, at least ten blastocysts per group were subjected to TUNEL staining. The number of cells in the blastocysts (inner cell mass, trophectoderm, and total cell numbers) and apoptotic cell counts were determined. The total cell numbers in the blastocysts were found to be significantly higher in the combined groups compared to the control and lycopene groups ($P<0.05$). When the number of apoptotic cells was examined, it was statistically determined that the lowest apoptotic cell count was found in the lycopene 0.2 µM and ascorbic acid 2 mM (Lik0.2+AA2) group ($P<0.05$).

In conclusion, the addition of some antioxidants to the culture medium, either alone or in combination such as lycopene and ascorbic acid had a positive effect on development rates

Keywords: Antioxidant; Ascorbic Acid; Blastocyst; *In Vitro* Culture; Lycopene

1. GİRİŞ

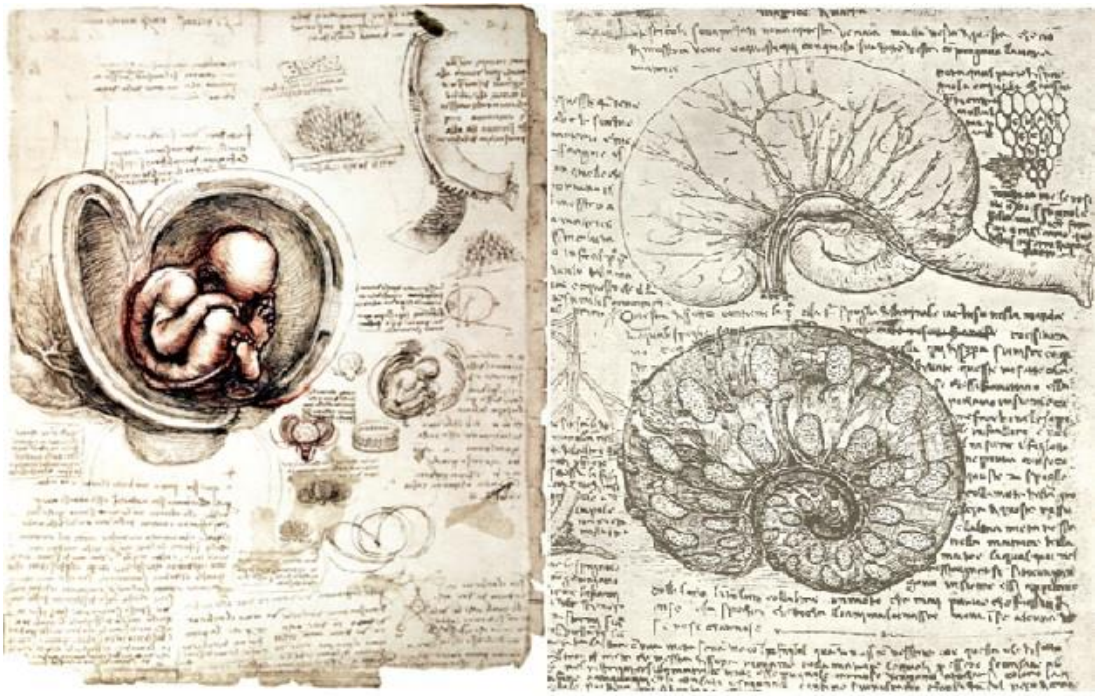
1.1. Embriyo Keşfinin Tarihçesi

Embriyonik keşfin tarihçesi, insanlık tarihine uzanan bir süreçtir. İnsanlar, binlerce yıl boyunca embriyonik gelişim sürecini gözlemlemiş, anlamaya çalışmış ve kayda almışlardır. Embriyonik gelişimin tarihçesindeki önemli kilometre taşları aşağıda belirtilmiştir.

Antik Çağ: Eski Mısır ve Eski Yunan döneminde, embriyonik gelişim konusunda bazı bilgilere rastlanmaktadır. Herodotus yazılarında, anne karnındaki bebeklerin büyüdüğünü ve belli bir süre sonra hareket etmeye başladığını belirtmiştir (Jöchle 1999).

Orta çağ: Orta çağ döneminde, embriyonik gelişim hakkında bilgi ve anlayış sınırlı kalmış ve literatür olarak bilgiye rastlanılmamıştır.

Rönesans Dönemi: 15. ve 16. yüzyıllarda Rönesans dönemiyle birlikte bilimsel gözlem ve keşiflerde büyük ilerlemeler kaydedildi. İtalyan anatomist Leonardo da Vinci, embriyonik gelişim üzerine ayrıntılı çalışmalar yapmış ve fötusu çizimlerle belgelemiştir (Şekil 1.1) (Leonardo 2016a, 2016b).



Şekil 1.1. Leonardo da Vinci'nin embriyonik oluşum ve gelişimin ayrıntılı olarak çizdiği belgeleri(Leonardo 2016a, 2016b)

18. yüzyıl: Embriyonik gelişim, 18. yüzyılda biyolojinin önemli bir alanı haline gelmiştir. Alman doğa bilimci Caspar Friedrich Wolff, embriyonik gelişimin preformasyon ve epigenetik prensipleri üzerine çalışmalar yapmış ve embriyologlar için temel bir teori oluşturmuştur (Aulie 1961).

19. yüzyıl: Mikroskobun gelişmesi, embriyologların embriyonik gelişim sürecini daha detaylı incelemelerini sağlamıştır. Almanya'da Karl Ernst von Baer, embriyonik gelişimin belirli aşamalarını tanımlayarak embriyolojiye önemli katkılarda bulunmuştur (Brauckman 2012).

20. yüzyıl: Embriyolojiye yönelik araştırmalar ve teknolojik ilerlemelerin hız kazandığı bir dönemdir. *İn vitro* fertilizasyon (IVF) gibi üreme teknolojilerinin geliştirilmesi, embriyo manipülasyonu ve incelemeleri için yeni olanaklar sunmuştur. Günümüzde, genetik bilgi ve moleküler tekniklerin ilerlemesiyle embriyonik gelişim daha detaylı bir şekilde anlaşılmaya başlanmıştır. Bugün, embriyonik gelişim üzerine çalışmalar devam etmekte ve bilim insanları embriyo oluşumunu, organ gelişimini ve genetik düzenlemeleri daha kapsamlı bir şekilde araştırmaktadır. Embriyonik gelişim, temel bir biyolojik süreç olup, tıp, biyoloji ve genetik alanlarında önemli katkılar sağlamaktadır (Wolf ve Quigley 1984, Sarıözkan 2004).

1.2. Dünya'da ve Türkiye'deki İlk Embriyo Transfer Çalışmaları

Karl Ernst von Baer 1825 yılında, embriyonik gelişim süreçlerine dair birçok temel araştırma yapmış ve embriyolojiyi bilimsel bir disiplin haline getiren ilk bilim insanı olması sebebiyle modern embriyolojinin babası olarak kabul edilmiştir (Brauckman 2012). Sonraki yıllarda ise Schenk (1880) tavşan ve kobay oositlerini *in vitro* olarak incelemiş, tek hücreli halde bulunan embriyonun bölünmesini tanımlamıştır. Bu bilgiler ışığında ise Walter Heape 1891-1897 yılları arasında embriyo çalışmalarına devam ederek Angora tavşanından elde ettiği embriyoları Belçika tavşanına naklederek ilk defa tavşan yavrularını elde etmiştir (New 1978). Daha sonra Warwick ve arkadaşları tarafından 1934 yılında koyun ve keçilerde yapılan ilk embriyo transfer çalışmasının başarılıyla sonuçlandığı bildirilmiştir. Bu çalışma çiftlik hayvanlarında yapılan ilk çalışma olarak tarihe geçmiştir (Sarıözkan 2004). 1951 yılında Willet ve arkadaşlarının sığırlarda *in vitro* embriyo üretimi yaptığı

bildirilmiş, bu çalışmanın sonucunda sağlıklı bir buzağı elde edilmiş ve kayıtlara geçmiştir (Tablo 1.1) (Akyol ve Ertem 2019).

Tablo 1.1. Dünya'da farklı türlerde gerçekleştirilen ilk başarılı embriyo transfer çalışmaları (Akyol ve Ertem 2019)

Yıl	Tür	Araştırmacı(lar)
1890	Tavşan	Heape
1933	Rat	Nicholas
1934	Koyun	Warwick ve ark
1942	Fare	Fekete ve Little
1951	Domuz	Kvansnickii
1951	İnek	Willet ve ark
1964	Hamster	Blaha
1974	At	Oguri ve Tsutsumi
1976	Maymun	Kraemer ve ark
1978	Kedi	Schriver ve Kraemer
1978	İnsan	Steptoe ve Edwards
1979	Köpek	Kinney ve ark

Ülkemizdeki ilk embriyo transfer çalışması 1981 yılında Kılıçoğlu ve Tekeli tarafından tavşanlar üzerinde gerçekleşmiştir. 1983 yılında ise fareler üzerine bazı çalışmalar yürütüldüğü belirtilmiştir. İneklerde süperovulasyon ve embriyo transferi üzerine bazı çalışmalar yürütülmüş olsa da bu teknik yeterince kullanım alanı bulamamıştır. 2000 yılında o günkü adı ile "Orman Bakanlığı" Holstein ve Montofon ırkları üzerinde ıslah çalışmalarını sürdürebilmek için embriyo transfer yönelik bazı çalışmalar başlatmıştır. Araştırmacılar Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET) yöntemi ile embriyonun üretimi, dondurulması ve cinsiyet tayini gibi konularda Ar-Ge çalışmalarına yönelmişlerdir. Ancak sığır yetiştiricilerinin ilgisi ve tutumu bu çalışmanın rafa kalkmasına neden olmuştur. Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde 2005 yılında Akyol ve ark tarafından yapılan çalışmalarla ilk *in vitro* üretimi ile transferi gerçekleştirilen bir sağlıklı buzağı elde edilmiştir (Tablo 1.2) (Sarıözkan 2004, Akyol ve Ertem 2019).

Tablo 1.2. Ülkemizde farklı türlerde gerçekleştirilen ilk başarılı embriyo transfer çalışmaları (Sarıözkan 2004, Akyol ve Ertem 2019)

Yıl	Tür	Araştırmacılar
1981	Tavşan	Kılıçoğlu ve Tekeli
1984	Koyun	Kılıçoğlu ve ark
1986	İnek	İleri ve Sayın
1989	İnek*	Sungur ve ark
1997	Ankara Keçisi	Kılıçarslan ve Şenüver
1997	At	Ekici
2001	Koyun**	Birler ve ark
2005	İnek**	Akyol ve ark
2006	İnek***	Akyol ve ark

**Dondurulmuş embriyo **IVF ***Ovum Pick Up (OPU)*

1.3. *İn Vitro* Fertilizasyonun Tanımı

İn vitro fertilizasyon, bazı tekniksel yöntemler ışığında, embriyonun elde edilmesine olanak sağlayan metottur. Bu süreç, fertilizasyon işleminin dişi üreme kanalı dışında, diğer bir deyişle laboratuvar ortamında gerçekleştiği bir yöntemdir. *İn vitro* fertilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için öncelikle kaliteli oositlerin elde edilmesi ve bu oositlerin kapasitasyona uğratılmış spermatozoonlar ile bir araya getirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda IVF öncesi, mezbahadan kesim esnasında toplanan veya ovum pick-up (OPU) yöntemi ile ovaryumlardan elde edilen olgunlaşmamış oositlerin uygun laboratuvar şartlarında mature edilmesi ve kapasite edilen spermatozoonlarla fertilizasyon işlemine hazır hale getirilmesi işlemine dayanmaktadır (Satılmış 2019).

1.4. *İn Vitro* Fertilizasyonun Avantajları

Hayvanlarda *in vitro* fertilizasyon, reprodüktif biyoteknoloji ve hayvan ıslahı alanında çeşitli avantajlar sunmaktadır. En önemli avantajlarından biri, memelilerde fertilizasyonun moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına yol açan, gen manipülasyonu yapılmış hayvanlar kullanılarak reprodüksiyon ile ilgili çalışmalar yapılabilmesidir (Ikawa ve ark 2010). Ek olarak, IVF sistemleri başarılı implantasyon ve sağlıklı yavruların doğumu için en kaliteli embriyoların seçilmesinde faydalı olmuştur ve böylece reprodüktif sonuçlarının iyileşmesine katkıda bulunmuştur

(Kropp ve ark 2014). Ayrıca IVF kullanımı, suni tohumlama gibi yardımcı üreme tekniklerinin başarılı bir şekilde uygulanmasını kolaylaştırmış ve böylece dünya çapında evcil hayvanların genetik potansiyelini arttırmıştır (Iqbal ve ark 2022). İn *vitro fertilizasyon,* aday genlerdeki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'lerin) sığırlarda fertilizasyon oranı ve embriyonik hayatta kalma ile ilişkilendirilmesine olanak sağlamıştır. Böylelikle embriyonik gelişime genetik katkıların anlaşılmasına yönelik ilerlemeleri belirlemeye yardımcı olmuştur (Khatib ve ark 2009).

Bunlara ek olarak, lizozomal enzimler sınıfına dahil olan proteazlardan katepsinlerin, proteinlerin parçalanmasından sorumlu olduğu, IVF ve embriyonik gelişim sırasında önemli roller oynadığı vurgulanmıştır. Katepsinlerin farklı tipleri (katepsin B, D, K, L), hücresel yeniden düzenlenme, apoptoz ve trofoblastın farklılaşması gibi süreçlerde etkili olarak, fertilizasyon ve embriyogenezdeki kritik rollerini ortaya koymaktadır (Afonso ve ark 1997, Varanou ve ark 2006, Zuzarte-Luis ve ark 2007, Balboula ve ark 2013, Li ve ark 2020). *İn vitro* fertilizasyon aynı zamanda deney hayvanlarının çoğaltılması açısından da değerli olup, hayvan yetiştiriciliğinde genetik kaynakların korunmasına ve kullanılmasına katkıda bulunmaktadır (Aoto ve ark 2011, Kikuchi ve ark 2011). *İn vitro* fertilizasyon, transgenik hayvanlar üretmek için kullanılmış ve toksisite testi için değerli bir araç olmuş, araştırma ve biyoteknolojideki uygulamalarını daha da genişletmiştir (Brackett 1978, Yong ve ark 2006, Zhang ve Yu 2008).

Ayrıca IVF, büyük hayvanlarda *in vitro* elde edilen oositlerin fertilizasyon yeteneğinin araştırılmasında, oosit maturasyon tekniklerine ve bunların fertilizasyon üzerindeki potansiyel etkilerine ışık tutmada çok önemli olmuştur (Makita ve ark 2016, Wieczorek ve ark 2020). Bu teknik aynı zamanda stresin oosit kalitesi ve mayoz üzerindeki etkilerini değerlendirmek için de kullanılmış ve stresin fertilizasyon ve embriyo gelişimi üzerindeki etkisine dair öngörü sağlamıştır (Tsuji ve ark 2021).

Hayvanlarda IVF, fertilizasyonun moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında ilerlemeler, embriyonik gelişime genetik katkılar, genetik kaynakların korunması ve fertilizasyon ve embriyonik gelişimi etkileyen çeşitli faktörlerin araştırılması dahil olmak üzere çok sayıda avantaj sağlamıştır. Bu avantajlar, reprodüktif biyoteknoloji ve hayvan yetiştiriciliğinin geliştirilmesinde *in vitro* embriyo üretimin (IVEP) önemini vurgulamaktadır.

1.5. *İn Vitro* Fertilizasyonun Tarihçesi

Hayvanlarda ilk başarılı *in vitro* fertilizasyon, 1930'ların ortalarında deneysel araştırmaların yayınlanmasıyla gerçekleşmiştir (Asplund 2020). Bu, yeni bir organizmanın oluşumunun gerçekleştiği ortamda çığır açan bir değişikliği temsil ettiğinden reprodüktif biyoloji alanında önemli bir dönüm noktasına işaret ediyordu (Ventura-Juncá ve ark 2015). Hayvanlarda IVF'nin başarısı, alanda daha fazla ilerlemenin yolunu açmış ve 1981 yılında IVF'den üretilen ilk buzağı gibi, IVF teknikleri kullanılarak çeşitli hayvanların doğmasına yol açmıştır (Choudhary ve ark 2016). Hayvanlarda *in vitro* ortamda üretilen ilk yavrunun tavşanlarda 1959 yılında Chang tarafından yapıldığı bilinmektedir (Chang 1959). 1973'e kadar çeşitli hayvan türlerinde, *in vitro* ortamda kapasitasyona uğratılmış spermatozoon ile fertilizasyonun başarılı bir şekilde sonuçlandırıldığına dair kapsamlı araştırmalar yapıldığı bildirilmiştir (Comizzoli ve ark 2018). Ruminantlar için ilk başarılı IVF uygulamasının 1977 yılında Iritani ve Niwa tarafından gerçekleştirildiği belirtilmiştir (Iritani ve Niwa 1977). *İn vitro* fertilizasyon yöntemi kullanılarak ilk canlı buzağı Brackett ve ark tarafından 1982 yılında elde edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada önem arz eden konu ise sadece laboratuvar ortamı kullanılarak *in vitro* maturasyon, *in vitro* fertilizasyon ve *in vitro* kültür aşamaları gerçekleştirilerek ilk canlı buzağı elde edilmesi olmuştur (Lu ve ark 1988). 2000'li yıllardan itibaren OPU ile IVF çalışmalarına yön verilmiş ve çalışmalar genetik düzeyde incelemeler yapılarak desteklenmiştir (Hasler 2014). Memeli canlılar üzerinde yapılan IVF temelli çalışmalar Tablo 1.3'te belirtilmiştir.

Tablo 1.3. Memelilerde gerçekleştirilen IVF çalışmaları (Gordon 2004).

	Uygulama	**Araştırmacı(lar)**
1959	Tavşanlarda	Chang
1963	Spermatozoon kapasitasyonu ile IVF	Yanagimachi ve Chang
1969	İnsan IVF'i	Bavister ve ark., Edwards ve ark
1977	Sığır IVF'i	Iritani ve Niwa
1978	IVEP ile ilk insan doğdu	Stepteo ve Edwards
1982	IVEP ile ilk buzağı doğdu	Brackett ve ark
1986	IVM ile ilk buzağı doğdu (IVEP)	Hanada ve ark
1988	IVEP ile ilk ikizler doğdu	Lu ve ark

1.6. Türkiye'de Yapılan *İn Vitro* Fertilizasyon çalışmaları

Ülkemizde hayvanlar üzerinde yapılan ilk IVF çalışmaları 80'li yıllardan başlayarak günümüze kadar devam etmiştir. Bu alandaki ilk çalışmayı Tekeli (1984) tavşanlar üzerinde gerçekleştirerek başarılı olmuştur. Devam eden yıllarda fareler üzerinde de IVF çalışmaları yapılmıştır (Kılıçoğlu 1985, Tekeli ve ark 1990, Tekeli 1992). Ruminantlar üzerindeki ilk çalışmalar ise 90'lı yıllardan başlayarak devam etmiştir (Birler ve ark 1997, Birler ve 1998) Birler ve ark. (2002) 2000'li yıllarda çalışmalarını koyunlar üzerine yaparak devam ettirmişlerdir. Sığırlarda IVF yöntemini kullanarak ilk sağlıklı buzağı doğumu Akyol ve ark (2007) tarafından gerçekleştirilmiştir.

1.7. *İn Vitro* Fertilizasyon'da Güncel Durum

Uluslararası Embriyo Teknolojileri Topluluğu'nun (IETS) verileri gözden geçirildiğinde son 20 yılda *in vitro* fertilizasyon çalışmaları tüm dünya da hız kesmeden giderek artmaktadır. Özellikle çalışmalara son 10 yılda daha da fazla önem verildiği görülmektedir. IETS'nin son güncel paylaşımı olan 2023 verileri incelendiğinde sığırlarda elde edilen embriyo sayıları ve yapılan transfer uygulamalarının sayıları aşağıdaki Tablo 1.4'te belirtilmiştir (Viana 2024).

Tablo 1.4. IETS 2023 verilerine göre, sığırlarda *in vitro* yöntemle elde edilen transfere hazır embriyo sayıları ve transfer edilen embriyo sayıları

Bölge	**Sığırlardan *in vitro* yöntemle elde edilen transfere hazır embriyo sayıları**	***İn vitro* yöntemle elde edilen embriyoların transfer sayıları**
Afrika	7368	7343
Asya	40328	32287
Avrupa	53824	27144
Kuzey Amerika	1093376	551344
Avusturalya	38691	39149
Güney Amerika	643004	625897
Toplam 2021	1521018	1166034
Toplam 2023	1876591	1283164
Artış oranı	+%23,37	+%10,04

1.8. Oogenezis

Oogenezis, dişi üreme hücresi olan oositlerin oluşum sürecidir. Oogenezis, tüm memelilerde fötal dönemde başlar ve puberta dönemiyle tamamlanır. İnsanlarda ve

diğer memelilerde oogenezis, birkaç aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar sırasıyla Şekil 1.2'de gösterilmektedir (Novita ve ark 2024).

Primer folikül aşaması: Embriyonik gelişimin erken döneminde, indifferent dönem sonrasında cinsiyet farklılaşması gerçekleştikten sonra dişi primordial germ hücreleri mitoz bölünme geçirerek oogoniumları oluşturmaktadır. Bu sayede oogoniumların sayısı artmaktadır. Foliküller içinde yer alan oositler, büyümeye başlar. Bu aşamada, primordial folikül oositleri, bir tek katlı skuamöz granüloza hücre tabakasıyla çevrilidir (Nilsson ve ark 2007, Dole ve ark 2008).

Primer oosit aşaması: Pubertas öncesindeki dönemde, bazı primordial foliküller büyüyerek primer folikül haline gelir. Primer folikül aşamasındaki oosit, büyüme sürecine girer ve sitoplazmik organeller ile hücresel yapıların miktarında artış meydana gelmektedir. Bununla birlikte, primer oositlerin bölünmesi tamamlanmaz ve birinci mayoz bölünme aşamasında durmaktadır. Diktiyat evresi olarak da adlandırılan bu dönemde, primer oositler, fötal gelişim sırasında mayoz bölünmeye başlayarak profaz I evresinin diploten aşamasına kadar ilerler ve bu evrede pubertasa kadar bekleme durumunda kalır. Bu süreçteki oositlerde, kromozomların düzenlendiği ve genetik materyalin korunarak metabolik olarak aktif olduğu bir duraklama dönemi geçirir. Pubertasa ulaşan dişi bireylerde, hormonal uyarılar sayesinde ovaryumda bulunan primer oositler, mayoz bölünmeye kaldıkları yerden devam eder. Foliküler gelişim sürecine paralel olarak, bu oositler önce germinal vezikül (GV) aşamasından çıkar, ardından metafaz I'i tamamlar ve ikinci duraklama evresi olan metafaz -II aşamasına ulaşır (McKim ve ark 1993, Nilsson ve ark 2007).

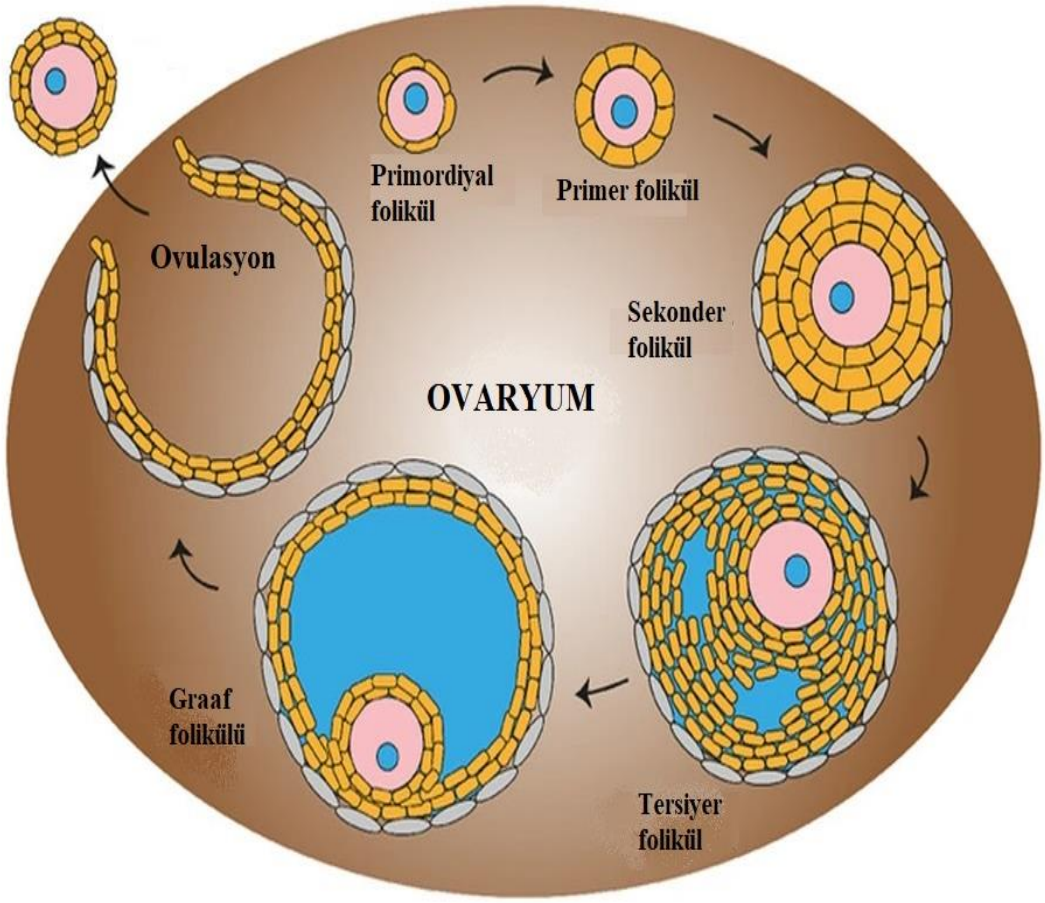
Sekonder folikül aşaması: Pubertas döneminde, primer oositlerden bazıları büyüme sürecine devam eder ve sekonder folikül haline gelir. Bu aşamada, granüloza hücreleri oositin çevresinde daha kalın bir katman oluşturacak şekilde çoğalmaktadır (Yang ve Fortune 2006).

Tersiyer folikül aşaması: Tersiyer folikül, ovaryumlarda antral faz aşamasında bulunan bir folikül türüdür ve sıvı dolu bir boşluk olan antrumu içermektedir. Bu yapısal özellik, folikülün oositin olgunlaşması için uygun bir ortam oluşturmasını sağlamaktadır. Tersiyer folikül, oositin yanı sıra granüloza hücreleri ve teka hücreleri gibi destekleyici hücre tabakalarını barındırmaktadır. Granüloza hücreleri, oositin

beslenmesi ve korunması için gerekli olan hormonları ve büyüme faktörlerini üretirken, teka hücreleri steroid hormonların sentezinde görev almaktadır (Campbell ve ark 2012, Semacan ve ark 2015).

Graaf folikül aşaması: Sekonder foliküllerden biri, önce tersiyer foliküle daha sonra graaf folikülü olarak adlandırılan büyük bir folikül haline gelmektedir. Graaf folikülü, ovaryumlardaki foliküler gelişimin son aşamasını temsil etmektedir. Bu aşamada folikül, antrum adı verilen sıvı dolu boşluğu belirgin şekilde genişlemiş ve oositi çevreleyen hücrelerle birlikte ovulasyon için tamamen hazır hale gelmiştir. Graaf folikülü, oositin serbest bırakıldığı aşamaya kadar genişlemeye devam etmektedir (Candelaria ve ark 2020).

Ovulasyon: Olgun oosit, ovaryumda graaf folikülünden serbest bırakılmaktadır. Fertilizasyon için spermatozonla buluşabileceği, ampulla ovidukt bölgesine ilerleyebilmesini sağlamaktadır (Candelaria ve ark 2020).



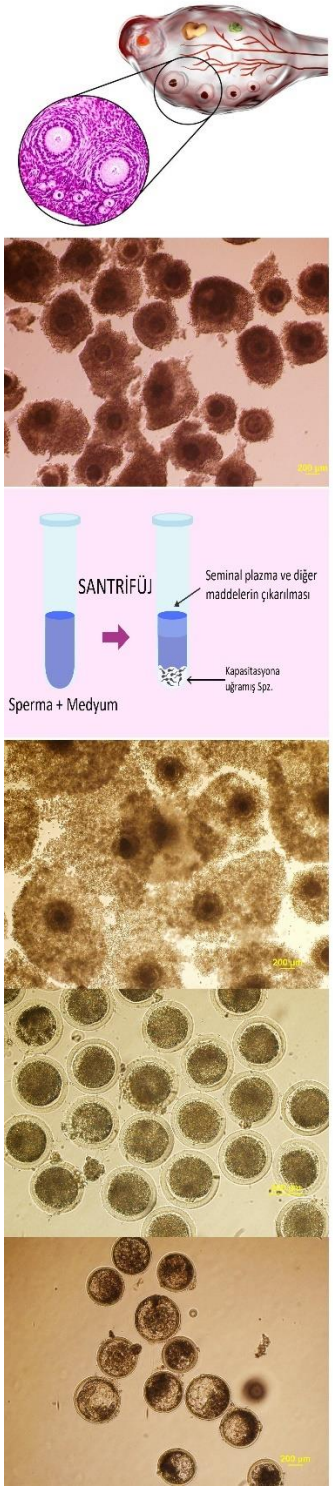
Şekil 1.2. Foliküler gelişim aşamaları (Chan ve ark 2021).

1.9. Sığırlarda *İn Vitro* Embriyo Üretimi (IVEP)

İn vitro fertilizasyon yöntemi bir yardımcı üreme teknolojisidir. Embriyo üretiminin bütün aşamaları laboratuvar ortamında gerçekleştirilmektedir (Şekil 1.3). Bu aşamalar sırasıyla;

Ovaryumlardan oosit elde edilmesi	Mezbahadan getirilen ovaryumlardan oosit toplanması	Aspirasyon yöntemi Dilimleme yöntemi Diseksiyon yöntemi
	Canlı hayvandan OPU ile oosit toplanması	
Oositlerin kalite değerlendirilmesi	Kumulus hücre kompleksinin dağılımına göre oositlerin sınıflandırılması	
Oositlerin *in vitro* maturasyonu (IVM)		
İn vitro Fertilizasyon aşaması (IVF)		
İn vitro kültür ortamında blastosist eldesi (IVC)		

(Satılmış 2019)



Folikül aspirasyonu ile oositlerin toplanması

***İn vitro* maturasyon ortamına alınacak oositler**

Spermanın seperasyonu ve Kapasitasyon

Kapasitasyon işlemi tamamlanmış spermatozoonlar ile mature olmuş oositlerin bir araya getirilmesi

İn vitro fertilizasyon işlemi tamamlanmış muhtemel zigotlar

Embriyo transferine hazır 6-8 günlük embriyolar

Şekil 1.3. IVEP üretim aşamaları (Gordon 2003).

1.9.1. Ovaryumlardan Oosit Elde Edilmesi

Ovaryumlardan olgunlaşmamış oosit elde edilebilmesi için birden fazla yöntem mevcut olsa da günümüzde genellikle ikisi tercih edilmektedir. Bunlardan ilki mezbahanede kesilmiş olan dişi hayvanların ovaryumlarından, ikincisi ise canlı

hayvanların ovaryumlarından OPU yöntemi ile oosit elde edilebilmesidir (Satılmış 2019).

Mezbahadan Toplanan Ovaryumlardan Oosit Elde Edilmesi

Mezbahadan toplanan ovaryumlardan oosit elde edebilmek için üç yöntem kullanılabilmektedir. Bu yöntemler folikül aspirasyon tekniği, dilimleme tekniği ve diseksiyon tekniğidir. Ancak araştırmalar incelendiğinde günümüzde en çok kullanılan yöntem folikül aspirasyon tekniğidir (Hammad ve ark 2014, Marques ve ark 2015).

- **Folikül aspirasyon tekniği**

İn vitro embriyo üretiminde, oosit eldesinde en çok tercih edilen ve kullanılan yöntemdir. Ovaryum üzerinde yer alan preantral ve antral foliküller aspirasyon iğnesi, pipet veya enjektör yardımı ile aspire edilmektedir. Folikülleri aspire etme tekniğinin avantajı hem hızlı hem de kolay uygulanabilir olmasıdır. Ayrıca ticari embriyo üretimi için çok önemli olabilmektedir. Ovaryumlardan oositleri aspire etmek için genellikle 18-21 G'lik enjektör uçları kullanılarak 2-8 mm çaptaki veziküler karakterdeki foliküllerden oositler toplanabilmektedir (Alkan ve ark 2025). Sirard ve Blondin (1996) yaptığı bir çalışmada 2 mm'den küçük oositlerin mitoz karakteri kazanmadığı, 8 mm'den büyük foliküllerin ise atreziye dalgası görüldüğünü ve bu aralık dışındaki (2-8 mm) foliküllerin maturasyon başarısının düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Aspirasyon yönteminde contasız 10-20 mL'lik enjektörlerin kullanılması tavsiye edilmektedir. Fry ve ark (1998), 17 G'lik enjektör ucu ve 55/mmHg basınç ile toplanan primer oositlerin sayısını ve kalitesini inceledikleri, çalışmalarında en iyi oosit eldesinin 55/mmHg basınç ile gerçekleştiğini bildirmektedirler. Ancak vakum artışına bağlı olarak kumulus oosit kompleksine zarar vermekte ve kalitesiz oosit sayısının arttığı bildirilmektedir. Hashimoto ve ark (2000), aspirasyon yöntemi üzerine yaptıkları çalışmada, en iyi sonuçların 18-G enjektör ve 40 mmHg basınç kullanılarak elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Bu teknikle, her bir ovaryumdan ortalama 13,9 ± 2,3 oosit toplanmış ve bu oositlerin %45-50'sinin kullanılabilir kalitede olduğunu bildirmişlerdir.

- **Dilimleme tekniği**

Mezbahadan getirilen ovaryumlardan oosit elde etmenin diğer bir yöntemi ise dilimleme tekniğidir. Bir forseps yardımı ile ovaryum sabitlenmekte ve foliküllerin

bulunduğu alanlardan steril bir bistüri ile kesitler atılmaktadır. Bu işlem önceden hazırlanmış, içerisinde yıkama solüsyonu bulunan petriye ovaryumların aktarılmasıyla gerçekleştirilmektedir (Satılmış 2019). Ovaryumlardan oosit elde edilmesinde dilimleme tekniğinin oldukça etkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Khan ve ark 1997, Vincenti ve ark 1998, Wang ve ark 2007a, Hoque ve ark 2011, Hammad ve ark 2014, Deka ve ark 2015, Saleh 2017, Borges ve ark 2018, Dorice ve ark 2019, Al-Shammari ve Almeeni 2022, Gwaid ve ark 2023). Yapılan bazı araştırmalar aspirasyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında dilimleme yöntemi ile ovaryum başına hem daha kaliteli hem de daha fazla oosit elde edildiğini bildirmişlerdir (Wang ve ark 2007a, Saleh 2017, Al-Shammari ve Almeeni 2022). Bu teknik sayesinde ovaryumların medulla ve korteksinde yer alan oositlerin toplanabildiği saptanmıştır (Dorice ve ark 2019). Dilimleme tekniği, ovaryum korteksinin daha derin kısımlarında bulunanlar da dahil olmak üzere tüm foliküllerden oositlerin alınmasına olanak tanımaktadır (Deka ve ark 2015). Gwaid ve ark (2023), oositleri etkili bir şekilde toplamak için ovaryumların steril bir bistüri ile dilimlenmesinin oosit kalitesini etkilediğini vurgulamışlardır. Üstelik dilimleme tekniğinin, sınırlı sayıdaki ovaryumlardan maksimum sayıda oosit elde edilmesinde faydalı bir yöntem olduğu kaydedilmiştir (Borges ve ark 2018). Manda ovaryumlarından aspirasyona kıyasla dilimleme tekniği ile daha fazla sayıda oosit kazanım oranı sağlandığı ifade edilmektedir (Khan ve ark 1997, Hammad ve ark 2014).

Dilimleme tekniğinin farklı hayvan türlerinde de etkili olduğu gösterilmiştir. Wang ve ark (2007b), dilimleme tekniği kullanarak keçilerden ovaryum başına yüksek sayıda oosit topladıklarını bildirmişlerdir. Ancak yapılan bir çalışmada, bu yöntemde ovaryum başına daha fazla oosit elde edilmesine rağmen, IVF sonrası blastosist aşamasına ulaşan embriyo sayısının aspirasyon yöntemine kıyasla daha az olduğu vurgulanmaktadır (Marques ve ark 2015).

Genel olarak dilimleme tekniği ile oosit elde edilmesi güvenilir bir yöntem olarak önümüze çıkmaktadır. Bu teknik ovaryumlardan daha fazla sayıda kaliteli oosit elde edilmesi gibi avantajlar sunmaktadır. Bu teknik diğer tekniklerle kıyaslandığında, kullanılabilir kalitede oosit elde etmek için tercih edilebilecek en iyi yöntem olduğu bildirilmektedir (Gordon 2003).

- **Diseksiyon Yöntemi**

Sığırlardan oosit elde edilmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise diseksiyon tekniğidir. Bu teknik mezbahaya sevk edilmiş hasta veya yaşlı dişi hayvanların kesiminden sonra ovaryumların diseke edilerek oosit toplama yöntemine dayanmaktadır (Kochan ve ark 2020). Oositler diseksiyonla elde edildiğinde folikül membranı ve germinal veziküller sağlam kalmaktadır (Liu ve ark 2019). Bu yöntem ile kumulus-oosit kompleksinin daha az zarar gördüğü bildirilmiştir. Yapılan araştırmalara göre bir ovaryumdan yaklaşık 32-44 oosit elde edilebildiği rapor edilmiştir. Diseksiyon yöntemi ile atretik ve atretik olmayan foliküller çok daha kolay tanımlanabilmektedir. Bu yöntemde işlemi gerçekleştirecek olan kişinin alanında uzman ve tecrübeli olması gerekmektedir (Gordon 2004).

Canlı hayvandan ovum pick-up (OPU) yöntemi oosit elde edilmesi

Ovum pick-up (OPU), canlı hayvanların ovaryumlarında bulunan foliküllerden oositleri aspire etmeye olanak sağlayan bir yöntemdir. Dişi sığırların ovaryumlarından ultrasonografi ile oositleri elde etmek için (OPU); transvaginal yoldan girilerek, özel bir ekipman içerisine yerleştirilmiş olan konveks prob ve aspirasyon iğnesi vasıtasıyla ovaryum üzerinde bulunan foliküllerden immature oositlerin aspirasyonla toplanmasını ifade etmektedir (Sasamoto ve ark 2004). OPU'nun siklik ve siklik olmayan hayvanlarda, gebeliğin erken dönemlerinde (3 aya kadar), hormonal uyarıya yanıt vermeyen hayvanlarda, reprodüktif bozukluğu olan yaşlı ineklerde, genç buzağılarda ve prepubertal düvelerde yapılabildiği bildirilmiştir. OPU teknolojisi ile yılda bir inekten yaklaşık olarak 1000 oosit ya da 300 embriyo elde edilebildiği ifade edilmektedir. OPU tekniğinin bir diğer avantajı ise hayvanlar kesime gitmeden de oosit elde edilebilmesidir. Hindistan'ın sığır ırkları arasında yer alan Sahiwal sığırı, hastalık direnci, parazit direnci, ısı toleransı ve yüksek laktasyon verimi gibi benzersiz özellikleriyle tanınmaktadır. Dini nedenler ile kesimi yasak olan bu sığırdan sadece bu yöntem ile oosit elde edilebildiği vurgulanmıştır (Vennapureddy ve ark 2024).

1.9.2. Oositlerin Kalitelerinin Değerlendirilmesi

Oositlerde kalite değerlendirmesi, *in vitro* fertilizasyon prosedürlerinin kritik bir bileşenidir. Embriyonun gelişimini ve implantasyonun başarısını doğrudan etkilemektedir. Oosit kalitesini ve bunun embriyo gelişimi ile ilişkisini değerlendirmek

için *in vitro* maturasyon işlemi öncesi oositler stereo mikroskop altında bir dizi seçilim işlemine tabii tutulmaktadır. Morfolojik değerlendirmeye alınan oositlerde, sitoplazma yoğunluğuna ve dağılımına, kumulus oosit kompleksine ve görülebilir bazı yapısal formlara dikkat edilmektedir (Tablo 1.5 ve Tablo 1.6) (Gordon 2003, Ciftci ve Dinc 2023).

Tablo 1.5. Sığır oosit kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan kriterler (Gordon 2003)

Sınıflandırma	**Kumulus oosit kompleksi (KOK)**
Belirteçler	
1	Kompakt yapıda, çok katmanlı kumulus hücreleri varlığı, ooplazması homojen olarak dağılmış, KOK açık ve şeffat
2	Çok katmanlı kumulus, ooplazması homojen dağılmış, Zona pellucida'da koyulaşma ve kalın görünüm, ayrıca KOK daha koyu görünüme sahip ve 1 numaraya göre daha az şeffaf
3	Kumulus hücre katmanı daha ince, koyu renkli düzensiz ooplazma dağılımı mevcut, 1 ve 2 numaraya göre daha koyu KOK görünümü vardır.
4	Kumulus hücreleri açılmış ve dağılmış durumda veya jölemsi kıvamda kumulus hücre katmanı görüntüsü mevcut, düzensiz kümelenmiş koyulaşmış ooplazma, genel KOK görüntüsü kararmış ve düzensizdir.

Tablo 1.6. Beltsville'ye göre sığır oosit seçilim ölçütleri (Gordon, 2003)

Oosit'in kategorisi	**KOK yapısı**	**Sitoplazma yapısı**
İyi kalite	Tüm kumulus hücre katmanına sahip ya da yoğun kumulus hücre katmanına sahip oosit. Sitoplazma şeffaf ve açık olarak görülür.	Yoğun, eşit dağılmış, ince granüllü sitoplazma
Orta veya düşük kalite	Oosit'in tamamını ya da bir kısmını çevreleyen kumulus hücre katmanına sahip olması. Sitoplazmanın ise net olarak görülememesi.	Yoğun, eşit dağılmış ince ve orta granüllü sitoplazma
Kalitesiz	Kumulus hücre katmanının tamamı veya büyük kısmının açılmış ya da dağılmış olması, kumulus hücresi olmayan, iri ya da küçük oositlerden oluşur.	İri taneli eşit dağılım göstermeyen karışık açık kahve veya siyah sitoplazma yoğunluğu, düzensiz oosit görünümü

Kumulus hücre kompleksinin dağılımına göre oositlerin sınıflandırılması

Oositlerin sınıflandırılması (A, B, C, D), oosit kalitesinin değerlendirilmesinde temel hususlardan bir tanesidir.

A kalite oositler yoğun kumulus hücreleri kaplı (en az 5 katman) ve homojen sitoplazma gibi özelliklerle karakterize edilen ve optimal gelişim potansiyelini gösteren en yüksek kaliteye sahip oositler olarak kabul edilir (Silvestri ve ark 2021).

B kalite oositler biraz daha az optimal olmasına rağmen kumulus hücreleri çevrelenmiş (2-3 kat) ya da oositin çevresinin bir kısmında kumulus hücresine rastlanılmaması ifade edilebilmektedir (Al-Shammari ve Almeeni 2022).

C kalite oositler kumulus hücre yoğunluğu ve sitoplazma yapısında tutarsızlıklar gösterir. Hatta genellikle oositlerin kumulus hücrelerinden tamamen yoksun olduğu bildirilmektedir (Al-Shammari ve Almeeni 2022)

D kalite oositler ise onları diğer sınıflardan ayıran belirli özelliklerle karakterize edilir. Bu oositler tipik olarak kumulus hücrelerinden yoksun olma veya jöle benzeri bir ağ ile aşırı genişlemiş kumulus hücrelerine sahip olma gibi özellikler sergilemektedir (Chauhan ve ark 1999).

Literatür referanslarına dayanarak, A, B, C ve D kalitelerine göre oositlerin germinal vezikül yıkımlanması ve mayotik olgunlaşması şu şekilde özetlenmektedir:

A kalite oositlerin germinal vezikül yıkımlanması (GVBD) %10, mayotik olgunlaşma oranı %90'dır (Fagbohun ve Downs 1992, Aroca ve ark 2000).

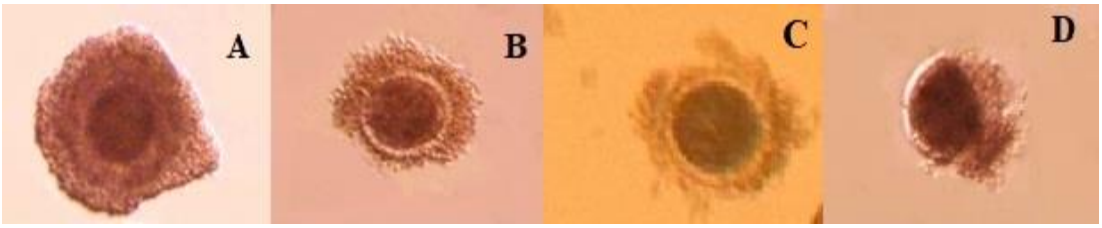
B kalite oositlerin GVBD'si %20, mayotik olgunlaşma oranı %80'dir (Motlik ve ark 1984, Lohka ve Maller 1985).

C kalite oositlerin GVBD'si %30, mayotik olgunlaşma oranı %70'tir (Han ve Conti 2006).

D kalite oositlerin GVBD'si %40, mayotik olgunlaşma oranı ise %60'tır (Kishimoto ve Kanatani 1980, Lonergan ve ark 1997).

Bu değerlendirme verileri göz önünde bulundurulduğunda IVF çalışmalarındaki A ve B kalite oositlerin *in vitro* maturasyona alınmasının daha olumlu sonuç vereceği anlaşılmaktadır. Bu kapsamda C ve D kalite oositlerin ise neden kullanılmaması gerektiği bildirilmektedir (Şekil 1.4).

Ayrıca oositin maturasyon kalitesini, aspire edilen oositin büyüklüğünün de etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda ovaryum üzerinde 2-8 mm çap aralığında olan foliküllerden oosit toplanması önerilmektedir (Gordon 2003). Hatta bazı çalışmalar bu aralığı 3-6 mm olarak kabul etmektedir (Zhang ve ark 2017, Mansor 2019). Daha büyük veya daha küçük çapta olan oositlerden embriyo kazanım oranı azaldığı, kalitesinin düştüğü bildirilmiştir (Read ve ark 2018).



Şekil 1.4. Hasler ve Barfield'a göre A, B, C ve D kategorisindeki oositler (2021)

1.9.3. Oositlerin *İn Vitro* Maturasyonu (IVM)

Stereo mikroskop altında oositin maturasyon işlemi incelendiğinde, mayoz bölünmenin tekrar başlamasına yönelik ilk belirti germinal vezikül yıkımlanması olarak söylenebilir. Membranın yıkımlanmasını takiben birinci kutup cisimciği atılmaktadır ve sonrasında ikinci mayoz iğ iplikçilerinin oluşumu ile maturasyon işlemi tamamlanmaktadır (Gordon 2017).

Maturasyon işlemi tamamlanan oositlerde nükleer değişiklikler belirgin olarak görülmesine rağmen, ooplazmada tam olarak belirlenemeyen bazı değişiklikler meydana gelmektedir. *İn vitro* maturasyon işlemi boyunca oosit içerisinde organellerin yeniden dağılımı ya da diğer bir tabirle yer değiştirmesi söz konusudur. Bu yönelim incelendiğinde mitokondrinin perinükleer bölgeye, kortikal granüllerin ise vitellin membranın (oolemma) altına doğru kaydığı gözlemlenmiştir (Gordon 2017).

Oosit maturasyon sürecinin iki ana unsur altında gerçekleştiği söylenebilir. Bunlar indükleyici ve sentetik fazlar olarak bildirilmektedir. İndükleyici faz yaklaşık olarak 6-8 saat sürmektedir. Oositin içinde bulunduğu foliküler ortam, çevresindeki kumulus hücreleri tarafından sürekli olarak desteklenmektedir. Bu hücreler, oositin gelişimini yönlendirir, ona besin ve sinyaller sağlayarak mature olmasına yardımcı olmaktadır. Sentetik faz işlemi ise yaklaşık olarak 18 saat sürmektedir. Nükleer ve

sitoplazmik yapıların tamamının yeniden düzenlenmesini içermektedir (Üstüner 2020).

Oositin Nükleer Maturasyon Evresi

Oositin nükleer maturasyonu gametlerin gelişiminde önemli bir süreçtir. Oosit nükleusunun çeşitli aşamalardan geçmesini içerir ve nihayetinde fertilizasyona hazır olgunlaşmış bir oositin oluşumu ile tamamlanır. Bu süreç, başarılı embriyonik gelişimi sağlamak için sitoplazmik olgunlaşma ile sıkı bir şekilde düzenlenir ve koordine edilir. Bu aşamada, germinal vezikülün yıkımlanması, kromozom yoğunlaşması, homolog kromozonların ayrılması, profaz I'den metafaz II'ye geçiş, birinci kutup cisimciğinin atılması ve metafaz II'deki duraklama sürecini kapsamaktadır (Loutradis ve ark 2006). Nükleer maturasyonun başlaması için lutenleştirici hormonun (LH) dalgalı salınımına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak nükleer maturasyonun devamlılığı için başta östrojen olmak üzere siklik adenozin monofosfat (cAMP), purinler, steroidler, inositol 1,4,5-trifosfat (IP3), Ca^{2+} ve diğer birçok faktörün rol oynadığı bilinmektedir. (Loutradis ve ark 2006, Gordon 2017). Nükleer maturasyonun aşamaları bazı fazlardan oluşmaktadır. Bu fazlar;

Sentez fazı (S): Nükleer maturasyon sürecinde belirgin bir "S" fazı yoktur çünkü oosit zaten mayoz I'in profazında duraklatılmış durumda olup, DNA replikasyonu tamamlanmıştır. Ancak, biyomoleküllerin sentezi, oositin maturasyonu ve mayozun devamı için kritik önem taşımaktadır (Eppig 1996, Conti ve Franciosi 2018). Bu biyomoleküllerin sentezi aşağıdaki şekillerde gerçekleşir:

RNA ve Protein Sentezi: Oositin büyümesi sırasında, önemli miktarda mRNA ve protein sentezlenir. Bu mRNA ve proteinler, mayozun devamı ve erken embriyo gelişimi için gereklidir. Bu süreç, oositin çevresindeki granüloza hücreleri ve folikül ortamı tarafından desteklenmektedir (Mehlmann 2005).

Siklin ve Diğer Düzenleyici Proteinlerin Sentezi: Oositin maturasyonu sırasında, özellikle siklin B gibi hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin sentezi artar. Siklin B ve siklin bağımlı kinaz 1'in (CDK1) birleşmesiyle oluşan olgunlaşmayı destekleyici faktör (MPF), mayozun yeniden başlamasını tetiklemektedir (Mehlmann 2005, Adhikari ve Liu 2009).

Histon ve Kromatin İlişkili Proteinlerin Sentezi: Kromatin yapılarını düzenlemek ve kromozomların doğru bir şekilde yoğunlaşmasını sağlamak için histonların ve diğer kromatin ilişkili proteinlerin sentezi gereklidir. Bu proteinler, kromozomların metafaz aşamasında düzgün bir şekilde hizalanmasına ve bölünme sırasında doğru dağılımına yardımcı olmaktadır (Bouniol-Baly ve ark 1999, La Fuente ve Eppig 2001).

Mitoz ya da Mayoz faz (M): Bu bölümde sitoplazma ve kromozomlar ikiye ayrılarak dişi gamet hücrelerine dağılmaktadırlar (Gordon 2003).

Gelişim ya da GAP fazı (G): *İn vitro* maturasyon süreci, oositlerin laboratuvar koşullarında olgunlaştırılmasını içerir ve bu süreçte hücre döngüsünün çeşitli evreleri kritik bir rol oynar. Bu faz "S" ve "M" fazları arasında yapılanmaktadır. Hücre döngüsünün GAP fazları, yani G1 ve G2 fazları, hücrelerin büyümesi ve olgunlaşması için hayati önem taşımaktadır. Bu fazda birbirini takip eden iki sentez fazı şekillenmekte ve faz sonucu diploit hücreler oluşmaktadır (Sha ve ark 2010). Premiyotik bir fazdan önce şekillenen miyotik bölünme sonucu nükleer materyal kopyalanmaktır. Bu kopyalanma sonucunda tüm hücreler diploit hale gelir (Arroyo ve ark 2020). Sonrasında ise mayoz bölünmeler iki kez olacak şekilde birbirini takip etmektedir. Ancak bu bölünmeler interkinezis olarak adlandırılan bir bölüm ile ayrılmaktadır. Mayoz ve mitoz bölünme aşamaları aynı şekilde adlandırılmaktadır (Denomme ve ark 2012, Alam ve ark 2018). Bu sıralama ve isimlendirme profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olacak şekildedir. *Diploten*, mayoz-I'in ilk aşamasıdır ve bu aşamada kromozomlar çift halde bulunur. Kromozomlar, önceki profaz-I aşamasında eşlenmiş ve genetik materyal karşılıklı olarak değiş tokuş yapmıştır. Bu süreç sırasında kromozomlar despiralize olur ve germinal vezikül (GV) mevcuttur. *Diakinezis* ise mayoz-I'in son profaz aşamasıdır. Bu aşamada kromozomlar daha da sıkılaşır ve dört kopya haline gelir. Germinal vezikülde yıkımlanma (GVBD) meydana gelmektedir. Bu olay sırasında nükleer membran katlanmakta ve nükleer gözenekler kaybolmaktadır. Diakinezis ayrıca kromozomların kutuplara doğru hareket ettiği anafaz-I'i takip etmektedir. Bu süreç, sığırlarda LH salınımından sonra gerçekleşir ve oosit etrafındaki kumulus hücrelerinin ve bağlantılarının parçalanmasıyla karakterizedir (Quetglas ve ark 2010, Dalton ve ark 2014). *Metafaz-I*; mayoz-I'in ikinci aşamasıdır ve genellikle mayozun en uzun süren evresidir. Bu aşamada, kromozomlar

hücrenin ekvator düzleminde hizalanmaktadır. Kromozomlar, önceki diploten ve diakinezis aşamalarında despiralize olmuş ve sıkılaşmıştır. Her kromozom, iki kromatitli formunda ve homolog kromozomlarıyla birleşmiş halde bulunmaktadır. Bu birleşme, genetik materyalin eşlenmesini ve karşılıklı olarak değiş tokuşunu (krossing-over) sağlamıştır, bu da genetik çeşitliliği artırmaktadır. Metafaz-I sırasında, kromozomlar mikrotübüller aracılığıyla hücrenin karşı kutuplarına bağlanmakta ve ekvatorda maksimum yoğunlukta lokalize olmaktadır. Bu düzenlenme, kromozomların doğru bir şekilde ayrılmasını ve gamet hücrelerinin genetik bütünlüğünün korunmasını sağlamaktadır. *Anafaz-I;* mayoz-I'in üçüncü aşamasıdır ve homolog kromozomların ayrılma evresidir. Bu aşamada mikrotübüller, homolog kromozomların üzerinde bulunan protein yapıdaki kinetokorlara bağlanarak zıt kutuplara doğru çekilirler. Bu hareket, homolog kromozomların ayrılmasını ve her bir hücreye birer set homolog kromozomun gitmesini sağlamaktadır (Yamamoto ve ark 2010, Yang ve ark 2010, Zhang ve ark 2017a). Anafaz-I sırasında, mikrotübüllerin dinamik olarak kısalması ve uzaması, kromozomların çekilmesini ve hücreler arası genetik materyalin eşit bir şekilde dağıtılmasını sağlar (Kleinschnitz ve ark 2020). *Telofaz-I*; mayoz-I'in son aşamasıdır ve hücre bölünmesinin son adımını oluşturmaktadır. Bu aşamada, homolog kromozomlar karşı kutuplara ulaşmakta ve nükleer membran yeniden oluşmaktadır. Nükleer membran yeniden oluşmasıyla birlikte çekirdekler yeniden yapılanmakta ve hücre içindeki genetik materyal tekrar çevresel olarak kapsüllenmektedir. Oosit ile perivitellin boşluk arasında birinci kutup cisimciği şekillenmektedir. Telofaz-I ise, sitokinezin başlangıcı ile neredeyse eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir. Sitokinez evresi, hücrenin fiziksel olarak iki yeni hücreye bölünmesini sağlamaktadır. Bu süreç, genetik materyalin homolog kromozomlar arasında doğru bir şekilde bölünmesini ve iki hücreye eşit olarak dağıtılmasını sağlamaktadır. Bunda sonraki süreçte ikinci mayoz bölünmenin aşamalar halinde başlayacağı bildirilmektedir (Hattersley ve ark 2016, Haraguchi ve ark 2022, Snyers ve ark 2022). *Profaz-II,* ikinci mayoz bölünmesinin başlama evresidir. Bu aşamadaki, her bir oositteki kromozomlar tekrar yoğunlaşmakta ve nükleer zar çözülmektedir. *Metafaz-II'de;* kromozomlar hücrenin ekvator düzleminde sıralanmakta ve mikrotübüller tarafından karşı kutuplara bağlanmaktadır. *Anafaz-II'de;* kromatitler, karşı kutuplara doğru hareket etmekte ve her bir kromatit artık bir kromozom haline gelmektedir. *Telofaz-II ve Sitokinez-II* evresinde*;* kromozomların kutuplara ulaşmakta, nükleer zarlar yeniden oluşmakta ve hücre bölünmesi (sitokinez-

II) başlamaktadır. Sonuç olarak, bir primer oositin ikinci mayoz bölünmesi sonucunda bir oosit ve bir kutup cisimciği (küçük hücre) oluşmaktadır. (Crocomo ve ark 2020, Üstüner 2020).

Oositin Sitoplazmik Maturasyon Evresi

Oositin sitoplazmik maturasyonu, oositin fertlizasyon sonrası embriyonik gelişimini desteklemek için gereken gelişimsel yetenekleri kazanmasını içeren karmaşık bir dizi olgunun bir araya geldiği süreç olarak tanımlamaktadır. Bu süreç, nükleer maturasyon ile birlikte gerçekleşmekte ve hücresel, biyokimyasal ve moleküler değişiklikleri içermektedir. Sitoplazmik maturasyon, oositin fertilizasyonunu için gerekli olan mRNA'ların, proteinlerin, substratların birikimini, spermatozoonun oosit içerisine penetrasyonunu, pronükleus oluşumunu ve daha sonraki erken embriyonik gelişim gibi önemli olayların tümünde rol oynamaktadır (Üstüner 2020).

Folikül büyümesi ve oosit mayozunun yeniden başlamasıyla, oosit içindeki transkripsiyon, kromatin aglütinasyonu nedeniyle durmakta, oosit içinde depolanan maternal mRNA'lar parçalanmakta ve bu sistemik olay kademeli olarak bir şekilde gerçekleşmektedir. mRNA 3'-UTR (3'-Untranslated Region), mRNA'nın 3' ucunda yer alan, protein kodlamayan bir bölgedir. 3'-UTR, protein sentezi sürecinde düzenleyici bir rol oynar ve mRNA'nın stabilitesi, translasyonu ve hücre içindeki taşınması gibi kritik işlevlere sahiptir. Belirli bir mRNA'nın 3'-UTR'sinde bulunan sitoplazmik poliadenilasyon elemanı (CPE) ile ilişkili olan sitoplazmik poliadenilasyon elemanı bağlayıcı protein 4 (CPEB4), sitoplazmik poliadenilasyon yoluyla hedef mRNA'nın çevirisini destekleyen bir aktivatör kompleksi oluşturmaktadır. (Reyes ve Ross 2016, Poetz ve ark 2022). Bunlara ek olarak, organellerin maturasyonu (örn. mitokondri, endoplazmik retikulum) ve sitoskeleton üretimi ve dağıtımı, oosit olgunlaşması için gerekmektedir. Sitoskeleton mikrofilament ve mikrotubul içeren sitoplazmaların, nükleer maturasyonda kromozomların ayrılmasına büyük ölçüde yardımcı olduğu bilinmektedir. Sitoplazma içerisinde yer alan ribozomların ise oositin maturasyonundan zigot oluşumuna kadar gerekli olan peptit üretiminden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Oositlerde, mitokondriler GV etrafında birikmekte ve GVBD sırasında perinükleer bölgeden uzaklaşmaktadır. Mayoz I ve Mayoz II oositlerindeki mitokondriler sayıca çoğalır ve oositin sitoplazması içinde dağılmaktadır (Mao ve ark

2014). Mitokondriler, adenozin 5′-trifosfat (ATP) üretiminin ana yerleridir ve oositler için enerji kaynağı sağlamaktadır. Azalmış ATP seviyelerinin, hücrelerdeki kromozom sayısını değiştirebileceği ve genetik veya yapısal bozukluklara yol açabileceğine, bunun da mayoz bölünme ile ilgili sorunlara yol açtığına dair bilgiler verilmektedir. Sitoplazmik maturasyon evresi; oositlerin, ATP, mRNA, protein ile gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve depolanmasında görev almaktadır (Kirillova ve ark 2021, Jiang ve ark 2023).

Folikül içerisinde yer alan oosit büyümeli ve gelişmelidir. Buna yardımcı olan ise kumulus ve granuloza katmanının etrafında bulanan somatik hücrelerdir. Somatik hücreler, gap birleşimleri ile bağlantı kurarak bu etkileşimi sağlamaktadır. Bu hücreler, oosit etrafında besleyici faktörler sağlayarak, oositin maturasyon sürecini düzenlemekte ve desteklemektedir. Kumulus hücreleri, oositin maturasyonunu ve gelişimsel yeteneklerini kazanmasını sağlayan çeşitli büyüme faktörleri ve hormonlar aracılığıyla oosit ile etkileşimde bulunmaktadır. Ayrıca, kumulus hücreleri, oositin maturasyonu sırasında önemli olan kalsiyum homoeostazını ve sinyalizasyonunu da düzenlemektedir. Bu bağlantılarda herhangi bir hata ya da eksiklik olursa oositin uygun boyutlara ulaşmasını, olgunlaşmasını ve fertilizasyonunu olumsuz etkileyebilmektedir (Hutt ve Albertini 2007, Sirard 2016, Satılmış 2019).

İn vitro Maturasyonu Etkileyen Faktörler ve Maturasyon Ortamı

İn vitro maturasyon, oositlerin laboratuvar ortamında olgunlaştırılması sürecidir. Bu süreç, fertilite tedavilerinde önemli bir rol oynamakta ve çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. IVM'nin başarısı, oositlerin uygun şekilde maturasyonunu sağlayan çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik koşullara bağlıdır. Bu başarıda göz önünde bulundurulması gereken bazı önemli etkenler ise folikül çapı ve oositin boyutu, oositi elde etme yöntemi, oosit elde edilen hayvanın fizyolojik ve çevresel faktörleri, maturasyon için kullanılan medyumlar ve oosit maturasyon ortamı etkilemektedir (Gordon 2003).

Oosit Vericisinin Fizyolojik Durumu

Pubertasa ulaşmış ve ovaryumlarında antral foliküller bulunan dişiler, oosit elde edilmesi amacıyla kullanılabilmektedir. Ancak, doğumu yakın olan veya postpartum dönemdeki hayvanlar verici olarak uygun görülmemektedir. Donör

hayvanların genetik yapısı, bakım ve beslenme koşulları, elde edilen oositlerin sayısını ve kalitesini etkilemektedir (Akyol 2006). Yaz mevsiminde sıcaklık stresi, oosit kalitesini düşürerek maturasyon oranını olumsuz yönde etkilemektedir (Al-Katanani ve ark 2002).

Folikül Çapı ve Oosit Büyüklüğü

Büyük foliküllerden elde edilen oositlerin embriyo gelişim potansiyellerinin daha yüksek olduğu sıkça belirtilmektedir. Küçük foliküllerden elde edilen oositlerin nükleer olarak uygun yapıda olsalar bile sitoplazmik olarak yeterli düzeyde gelişim gösteremedikleri ifade edilmiştir. Bu nedenle, IVF çalışmalarında genellikle 6 mm ve daha büyük çaptaki foliküllerden elde edilen oositler tercih edilmiştir (Barnes ve ark 1991). Folikül çapı veya boyutu her zaman oositin kaliteli bir embriyo haline gelmesi için tek kriter olmaması yönünde uyarılar yapılmıştır. Büyük bir folikülden alınan bazı oositlerden embriyo gelişmeyebilirken, orta büyüklükteki bir folikülden elde edilen oositler bu kapasiteye sahip olabilmektedir (First 1988). Gordon'a göre (2003), embriyo için en kaliteli oositleri, 2-8 mm çaptaki foliküller içermektedir.

Maturasyon Süresi

İmmatur sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonu sırasında, belirli saat aralıklarında farklı gelişim aşamaları gözlemlenmiştir. GV oluşumu ilk 0-6.6 saatlerde gerçekleşmekte, bunu takiben, 6.6-8.0 saatler arasında GVBD meydana gelmektedir. 8.0-10.3 saatler arasında kromozom dekondenzasyonu gözlenirken, 10.3-15.4 saatler arasında birinci metafaz aşaması şekillenmektedir. Son olarak, 18-24 saatler arasında ikinci metafaz aşaması gerçekleşmektedir (Sirard 1989). GVBD ve ilk kutup cisimciğinin atılmasının, kumulus hücrelerinin ekspansiyonu ile yakından ilişkili olduğunu bildirilmektedir. Bir sığırda IVM süresi ortalama 24-26 saat, koyun ve keçide ise 24-27 saat olduğu ifade edilmektedir (Monaghan ve ark 1993, Birler ve ark 1998, Paramio ve Izquierdo 2014).

Sıcaklık, Nem, Çevresel Gaz Bileşenleri

Oosit maturasyon sürecinin en hassas olduğu dönem, GVBD ve birinci metafazın son aşamaları olduğu söylenmektedir. Bu aşamalarda yetersiz ısı ortamı veya sıcaklık dalgalanmaları, mayoz iğ iplikçiklerinin oluşumunu durdurarak oosit organelleri üzerinde etkili olmaktadır. IVM sürecinde, 39°C'ye yakın sıcaklıklarda iğ

iplikçiklerinin morfolojisi korunmakta ve maturasyon oranı en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. İnkübatör ortamında, ortamın yoğunlaşmasını ve pH değişimlerini önlemek için nem oranının %95'in üzerinde olması gerekmektedir (Nakagawa ve Leibo 1997, Mehta 2013). Yüksek oksijen seviyeleri süper oksit radikallerinin oluşumuna neden olmakta ve %5 oksijen ortamında blastosist sayısının daha fazla olduğu bildirilmektedir (Mehta 2013). IVF laboratuvarlarında yüksek blastosist oranı ve implantasyon başarısı için genellikle %5 CO_2, %5 O_2 ve %90 N_2 kullanılması tavsiye edilmektedir. CO_2 seviyeleri haftada bir, O_2 seviyeleri ise günlük olarak kontrol edilmelidir (Nagai 2001, Nagina ve ark 2016).

Maturasyon Ortamının Ozmotik Değeri

İn vitro oosit kültürü için önemli bir diğer parametre, maturasyon ortamının ozmotik basıncıdır. Bu basıncın 300-310 mOsm olarak ayarlanması gerekmektedir. Yüksek ozmotik basınç, oosit dejenerasyonunu artırır. Düşük ozmotik basınç ise ikinci kutup cisimciğin oluşumunu engelleyebilmekte ve ilk bölünmeyi geciktirebilmektedir (Wang ve ark 2011).

***İn Vitro* Maturasyon Vasatları ve Kullanılan Katkı Maddeleri**

Maturasyon için kullanılan medyumlar, oositlerin metafaz II aşamasına ulaşmasını ve fertilizasyon yeteneği kazanmasını sağlamanın yanı sıra, gelişim yeteneği olan embriyoların oluşumunu da desteklemektedir. Bu medyumlar basit ve kompleks olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Basit medyumlar, bikarbonat tampon sistemleri ile zenginleştirilmiş temel fizyolojik tuz çözeltileridir. Piruvat, laktat ve glukoz eklenerek besleyici özellikleri artırılır. Ayrıca az miktarda antibiyotik (penisilin, streptomisin, gentamisin), serum veya albümin ilave edilir. Kompleks medyumlar ise vitaminler, amino asitler gibi ek maddeler içerir ve Ham's F-10, Ham's F-12, Brister BMCO-3, Dulbecco's B2, KRB (Krebs Medium), MEM (Minimum Essential Medium), Waymouth, TALP (Tyrode's Albumin-Lactate Pyruvate Medium) ve TCM-199 (Tissue Culture Medium-199) gibi formülasyonlar bu gruba girer (Vijayakumar ve ark 1987, Los Santos ve ark 1996, Murakami ve ark 2002, Han ve ark 2019). Sığır, koyun ve keçi oositleri üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda TCM-199 en yaygın kullanılan medyumdur (Cantanhêde ve ark 2021).

Medyumların hazırlanmasında su en kritik bileşendir ve her türlü kontaminasyondan ve yabancı maddelerden arındırılmış olmalıdır. Bu amaçla ultra saf su kullanılması gereklidir. *İn vitro* ortamda mature edilen oositlerin gelişim potansiyelini artırmak için medyumlara serumlar, büyüme faktörleri, hormonlar ve diğer destekleyici maddeler eklenir (Gordon 2003).

Hormonlar

Oositlerin *in vivo* maturasyonunu başlatan spesifik stimulan, preovulatör gonadotropin salınımıdır. Günümüzde çoğu IVM protokolünde LH ve FSH kombinasyonu kullanılmaktadır. LH'nın IVM ortamlarında belirli düzeyde kullanımı, IVF sonrası ve IVC sırasında embriyo üretimini artırmaktadır. LH'nın, oosit maturasyonundan çok IVF sonrası erken embriyonik gelişim üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Kültür ortamlarına eklenen LH, oositin KOK yardımıyla glikoz kullanımını artırarak pirüvik asit üretimini hızlandırmakta ve hücrelerde glikolizis uyarılmaktadır (Yoshimura ve ark 1991).

IVM ortamına eklenen FSH, kumulus hücrelerinin genişlemesine neden olarak spermatozoon kapasitasyonu ve fertilizasyon aşamalarında etkili olmaktadır. Manda oositlerinde yapılan çalışmalarda, deney grubu medyumuna, FSH eklenmesinin embriyo bölünme oranını ve blastosist sayısını kontrol grubuna göre artırdığını göstermektedir (Maksura ve ark 2021). Sığır oositlerinde, kromatin kondensasyonunun karmaşık mekanizmasında ve mayozun tekrar başlamasına neden olan MPF (Maturation Promoting Factor) aktivasyonunda, FSH uyarımını takiben kumulus hücreleri tarafından regüle edilen cAMP bağımlı protein kinaz aktivitesi rol oynamaktadır (Laufer ve ark 1984, Makita ve ark 2016).

Östradiol 17-β (E2), *in vitro* fertilizasyon ve fertilizasyon sonrası erken embriyonik gelişim için gerekli olan sitoplazmik maturasyonu desteklemektedir. Ancak, yüksek dozlarda kullanımı iğ iplikçiklerinin oluşumunu ve birinci kutup cisimciğinin atılmasını olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Mittal ve ark 2014). Prolaktin ise, oositin sitoplazmik ve nükleer maturasyonu senkronize ederek embriyonik gelişimi artırmaktadır (Prima ve ark 2022).

Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, sığır oositlerinin IVM üzerindeki teşvik edici etkisi net bir şekilde bilinmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1'in (IGF-1) oosit maturasyonunda kritik rol oynadığını göstermektedir. EGF'nin, oosit maturasyonu sırasında sentezlenmeyen proteinlerin oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, EGF'nin foliküler gelişmeyi parakrin/otokrin yollarla düzenleyici bir rol üstlendiği ya da oositlerde mayozun yeniden başlamasını sağlayan uyarıcı faktörlerden biri olduğu görülmektedir. Parakrin ve otokrin yollar, hücreler arası iletişimde kullanılan mekanizmalardır. Parakrin yol, hücreler arasında kısa mesafeli iletişimde etkili olurken, otokrin yol bir hücrenin kendi kendini düzenlemesini sağlamaktadır. Bu yollar, hücrelerin büyüme, farklılaşma, olgunlaşma ve hayatta kalma süreçlerinde kritik roller oynamaktadır. Özellikle reprodüktif biyolojide, oosit ve çevresindeki hücreler arasındaki parakrin ve otokrin etkileşimler, oositin gelişimi ve fertilizasyon yeteneği için hayati öneme sahiptir (Albertini ve ark 2001, Takahashi ve ark 2006, Kidder ve Vanderhyden 2010). IGF-1 ise, birçok türde oosit maturasyonunu teşvik eden ve sonrasında embriyo gelişimini destekleyen bir faktör olarak bilinmektedir. EGF ve IGF-1'in birlikte kullanılması, mayoz bölünmenin ilerlemesini hızlandırmakta ve nükleer maturasyon üzerinde olumlu etkiler yaratmaktadır (Kobayashi ve ark 1994, Goff ve ark 2001, Zhao ve ark 2005, Kocyigit ve Cevik 2015).

Protein (Albumin ve Serum) Katkıları

İn vitro embriyo üretiminde kullanılan kültür ortamları genellikle çeşitli protein kaynaklarıyla zenginleştirilir. Bu proteinlerin eklenmesinin ana nedenleri arasında;

1) Kültür ortamındaki katkı maddeleri ve embriyo metabolizma atıklarının embriyotoksik etkilerini azaltmak,

2) Erken embriyo döneminde gerekli olan temel besin ihtiyaçlarını karşılamak,

3) Doğrudan veya kumulus hücre proliferasyonu yoluyla embriyonik gelişmeyi destekleyen büyüme faktörlerini sağlamak bulunmaktadır (Üstüner 2020).

Hem sığır serum albümini (BSA) hem de serum, *in vitro* kültürde embriyo büyümesini destekleyen bileşenler olarak bilinmektedir. Serum ve BSA, kompleks ve tanımlanamayan çeşitli proteinlerin karışımları olduğundan, embriyonik gelişim

üzerindeki etkileri değişkenlik gösterebilmektedir. Oositlerin *in vitro* maturasyonunu desteklemek ve embriyolar için gerekli büyüme ve besin faktörlerini sağlamak amacıyla, kültür ortamlarına fötal buzağı serumu (FCS), östrustaki sığır serumu (ECS) veya BSA gibi çeşitli serumlar eklenmektedir. FCS, bazı olumlu embriyotrofik faktörler içermekte ve serbest radikaller, ağır metaller gibi embriyotoksik ajanların inaktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Imai ve ark 2002, Russell ve ark 2006, Sreenivas ve ark 2014). BSA ise, ağır metalleri albumin şelatlarına dönüştürerek pH tamponu olarak görev yapmakta ve genellikle V-fraksiyon formunda kullanılmaktadır (Ali ve Sirard 2002). Ancak saflaştırılmış veya yağ asitlerinden arındırılmış BSA formları da mevcuttur. Son yıllarda, insan embriyo üretim merkezlerinde, sığır türevi serumlar veya proteinlerin kullanımı, sığır spongioform ensefalopatisi (BSE) ve viral kontaminasyon riskleri nedeniyle tercih edilmemektedir. Bu sebeple, FCS ve ECS yerine, içeriği daha iyi bilinen insan serum albümini (HSA) ve sentetik serum preparatları tercih edilmektedir (Sağırkaya ve Üstüner 2010).

1.9.4. *İn Vitro* Fertilizasyon

Maturasyon sürecini takiben, oositler fertilizasyona hazırdır. Bu işlem, oositlerin spermatozoon ile inkübasyonunu kapsamakta ve IVF olarak adlandırılmaktadır. Fertilizasyon işlemi, kapasitasyonu tamamlanmış spermatozoon ile maturasyon sürecini geçirmiş oositlerin uygun şartlarda bir araya getirilip inkübe edilmesiyle tamamlanır. Bu süreç çift yönlüdür; oosit hem aktive olur hem de erkek germ hücresinin genetik materyalini almaktadır (Gordon 2003).

Spermatozoonlar ejakülasyon sonrası veya dondurulup-çözdürüldükten sonra hareketlidir ancak bir oositi dölleyebilme yeteneğine sahip değildirler. Bir spermatozoonun bir oositi fertilize edebilmesi için geçirmesi gereken değişimlerin tümüne kapasitasyon denmektedir. Bu süreç, Chang tarafından 1951 yılında keşfedilmiştir (Chang 1951). Rekapasitasyon genellikle oviduktun isthmusunda tamamlanır, ancak kapasitasyonun servikste başladığı ve burada servikal mukusun spermatozoon yüzey proteinlerinin uzaklaştırılmasını kolaylaştırdığı gözlemlenmiştir (Stival ve ark 2016). IVF aşamasında, spermatozoonun kapasitasyonunu destekleyen bir ortam sağlayarak bu koşulları taklit etmenin zorluğudur. (Lottero-Leconte ve ark 2017). Spermatozoonlar fertilizasyon süreci öncesinde oositin plazma membranı ile birleşmesi için gerekli bir dizi hücre dışı olaylara maruz kalmakta, böylelikle

spermatozoonlar kapasite olmaktadırlar. Kapasitasyonu takiben akrozom reaksiyonu oluşmaktadır. Kapasitasyon sırasındaki temel olaylar arasında spermatozoon membranındaki değişiklikler, hücre içi kalsiyum seviyelerinin yükselmesi, cAMP konsantrasyonunda artış, hücre içi pH değişiklikleri ve protein tirozin fosforilasyonunun uyarılması yer alır (Thomas ve ark 2006, Navarrete ve ark 2015). Spermatozoon membranından kolesterolün uzaklaştırılması, fosfolipitlerde görülen değişiklikler, iyon akışları ve artan tirozin fosforilasyon, kapasitasyon sırasında meydana gelen temel moleküler değişikliklerdir (Hernández-González ve ark 2006). Ayrıca, bikarbonatın sperm kapasitasyonundaki rolü vurgulanmış ve kapasitasyon sırasında protein tirozin fosforilasyonunda ve spermatozoon başı içindeki spesifik proteinlerin göçündeki önemi gösterilmiştir (Ros ve ark 2004). Spermatozoon kapasitasyonu sırasında fonksiyonel proteinlerin asetilasyonunun da gerekli olduğu gözlemlenmiştir ve bu süreçte translasyon sonrası şekillenen modifikasyonların rol oynadığı ifade edilmektedir (Yu ve ark 2015). Spermatozoonun kapasitasyonu yaklaşık 6 saat içerisinde tamamlanmaktadır (Moawad ve ark 2017). Kapasitasyon aşamasını tamamladıktan sonra, spermatozoon, oosit ve onun diğer bağımlı yapılarından (KOK, zona pellucida) gelen uyarımları tanıyabilecek durumdadır. Ardından spermatozoonlarda akrozom reaksiyonu aktif hale gelmektedir. (Fraser 1998).

Akrozom, spermatozoonun baş kısmını çevreleyen ve birçok hidrolitik enzim içeren plazma membran ile sarılı bir yapıdır. Akrozom, spermatozoon üretimi esnasında golgi aygıtından oluşan ve nükleusun neredeyse %50'sini kaplayan bir organeldir (Wang ve ark 2014). İçerisinde hidrolitik enzimler; akrozin, aril sülfataz, asit fosfataz, fosfolipaz A, hyaluronidaz, β-glukuronidaz, β-N-asetilglukozaminidaz ve proteolitik enzimler; akrolizin, aril aminidaz, katepsin D, kollagenaz ve nöraminidaz bulunmaktadır (Toshimori 1998). Normal bir fertilizasyonun ilk aşaması olarak, akrozom reaksiyonu sırasında, akrozom içeriği kumulus hücreleri ve zona pellucida ile etkileşime girmeye başladığında serbest bırakılmaktadır (Rubinstein ve Breitbart 1991). Fertilizasyon ortamında bulunan Ca^{+2} iyonu yardımıyla akrozom reaksiyonu başlatılmaktadır. Akrozom içine alınan Ca^{+2} iyonu, proakrozin adı verilen enzim prekürsörünü aktif formu olan akrozine dönüştürmektedir. Akrozin, plazma membranı ve dış akrozomal membranın çeşitli noktalardan eriyip parçalanmasına neden olmakta ve akrozomal enzimler serbest ortama salınmaktadır. Akrozomun posterior kısmındaki

plazma membranı, ekvatoryal segment dışındaki dış akrozomal membranla birçok noktada kesişimler oluşturarak küçük veziküller meydana getirmektedir. Ortaya çıkan veziküller arasındaki boşluklu alanlardan akrozomal enzimler sızarak dışarı çıkmaktadır. Reaksiyon işleminin sonuna doğru akrozom tamamen parçalanmakta ve spermatozoonun baş kısmı sadece iç akrozomal membranla kaplanmış olarak kalmaktadır (Kallajoki ve ark 1986, Kuroda ve ark 1998). Reaksiyon sonucunda ortaya çıkan enzimler kumulus ooforus hücrelerini birbirine bağlayan hyaluronik asit bağlarını eriterek spermatozoon hücrelerin geçişini sağlamaktadır (Kawakami ve ark 2002). Aynı zamanda, motil spermatozoonun aktif kuyruk hareketleri de KOK'un geçilmesine yardımcı olmaktadır (Brewis ve Wong 1999, Çevik 2020).

Akrozomdan enzimler serbest bırakıldıktan sonra, ilk olarak spermatozoonun zona pellusidaya temasıyla penetrasyonunun gerçekleşmesi beklenmektedir. Zona pellusida, birçok memeli türünde üç farklı glikoproteinden oluşmaktadır. Bunlar Zona Pellusida glikoproteinleri 1, 2 ve 3 (ZP1, ZP2 ve ZP3) şeklinde adlandırılmaktadır. ZP3'ün, spermatozoon ve zona arasındaki bağın oluşmasında diğerlerine göre daha etkin olduğu kabul edilmektedir (Hunter 1996, Brewis ve Wong 1999, Akyol 2005). Spermatozoon ve oositin plazma membranlarının birleşmesi devam ederken, aktif kuyruk hareketleri ile kuyruğun tamamı perivitellin boşluğa girmektedir Perivitellin boşluğu da hızla geçerek ovuma ulaşmakta ve ovum yüzeyindeki mikrovilluslar tarafından yakalanıp etrafı sarılmaktadır. (Yanagimachi 1966). Oolemma ile temas ve penetrasyon, oositte ikinci mayoz bölünmeyi tetiklemektedir. İkinci kutup cisimciğini de atarak tam olarak fertilizasyona hazır hale gelmektedir. Spermatozoonun ooplazma içine girmesinin ardından, pronükleer oluşum ve singami başlamaktadır. Spermatozoonun ooplazmaya girişiyle birlikte, nükleusu çevreleyen membran parçalanmakta ve kromozomların dekondenzasyon süreci başlamaktadır. Bu süreçte, spermatozoonun boyun kısmından ayrılmaktadır. Baş kısmı, ovum sitoplazmasından köken alan yeni bir membranla çevrilerek "erkek pronükleus'u" oluşturmaktadır (Chamberlin ve Dean 1990, Machatkova ve ark 2008). Aynı zamanda, ikinci kutup cisimciğini atan ovumda da kromozomlar sitoplazmik bir membranla çevrilerek "dişi pronükleus'u" oluşturmaktadır. Erkek ve dişi pronükleusların oluşumundan sonra, her iki pronükleus oositin sitoplazması içinde merkeze doğru hareket etmeye başlayarak fertilizasyon işleminin aktivasyonunu uyarmaktadır. Bu uyaran olmadan, oosit pronükleusu (PN) oluşturamamakta ve bu nedenle zigot haline geçememektedir. Oosit

aktive olduktan sonra vitellusun hacmi azalmakta ve sıvı perivitellin boşluğa salınmaktadır. Aynı zamanda, vitellusta bulunan spermatoozonun baş kısmı şişmekte ve jel kıvamını kazanarak erkek PN'yu oluşturmaktadır. Pronükleusların merkezde buluşmasıyla birlikte membranlar parçalanmakta, erkek ve dişi kromozomlar birleşerek "singami"yi oluşturmaktadır. Singaminin oluşumu, fertilizasyon işleminin son noktasıdır ve bu değişimle fertilizasyon aşaması tamamlanmaktadır (Oegema ve Hyman 2006, Athale ve ark 2014, Namgoong ve Kim 2016, Baratas ve ark 2022).

IVF Medyumları

Fertilizasyon işlemlerinin optimal koşullarda sağlanabilmesi için inkübasyon ortam sıcaklığının 38.5-39˚C'de olması, %5'lik CO_2 gazı içermesi ve yüksek oranda nem bulundurması tavsiye edilmektedir. IVF ortamını desteklemek için çeşitli temel medyumlar kullanılmaktadır (Funahashi 2013, Vettical 2016). En çok kullanılan medyumlar ise; Tirode'nin Albümin Laktat Piruvat Solüsyonu (TALP), Sentetik Ovidukt Sıvısı (SOF), Brackett ve Oliphant Medyum (BO), Potasyum Simpleks Optimizasyon Medyum (KSOM), Modifiye Defined Medyum (mDM), Biggers-Whitten-Whittingham Medyumu (BWW), ve Krebs Ringer Bikarbonat Medyumu (KRB) olarak bildirilmektedir (Hasler ve Stokes 2012, Kang ve ark 2015, Rahman ve ark 2020). Bu medyumlar, oosit ve spermatozoon için gerekli olan besinler, iyonlar ve diğer bileşenleri sağlayarak optimal bir ortam oluşturmaktadır. Bu medyumlara, fertilizasyonu desteklemek amacıyla belirli miktarlarda heparin, hipotaurin, oviduktal sıvı, folikül sıvısı, kafein ve kalsiyum iyonları da eklenebilmektedir (Hasler ve Stokes 2012, García-Álvarez ve ark 2015, Vettical 2016, Asano ve ark 2018).

Sperma Seperasyon Yöntemleri

IVF'de spermatozoonlara fertilizasyon yeteneğini kazandırmak için ejekülatın çeşitli uygulamalara tabii tutulması ve hazırlanması gerekmektedir. Bu işleme seperasyon adı verilmektedir. Uygulamada ejekülat içerisinden en yüksek motiliteye sahip spermatozoonlar seçilmektedir. IVF başarısını olumsuz etkileyecek, ortam vasatının kalitesini düşürecek (enzimler, anormal spermatozoonlar, dondurulma sırasında kullanılmış kimyasallar) maddeler uzaklaştırılmalıdır (Kaymaz 2015). Bunun için günümüzde kullanılan sperma hazırlama tekniklerini arasında yıkama ve santrifüj, yıkama ve swim-up, temiz sperm ile swim-up (tabakalandırma), self migrasyon sedimentasyon, glass-wool column filtrasyonu, glass-bead separasyonu,

albumin sütunlarına doğru swim-down, percoll-saf sperm-isolate gradient (çöktürme), mini-percoll gradient, nycodenz gradient, ficoll ile sperm seçimi, parafin altında sedimentasyon, transmembran migrasyon, nikel mesh karşısında migrasyon ve sephadex sütunları yer almaktadır. Taze ve dondurulmuş sperma için en sık kullanılan yöntemler ise swim-up, percoll dansite gradient ve son yıllarda geliştirilen mikro çip yöntemleridir (Amiri ve ark 2012, Volpes ve ark 2016, Alçay 2020, Guler ve ark 2021, Alkan ve ark 2023).

IVF için Sperma Dozu

Sığır oositlerinin IVF'i için, genellikle laboratuvar ortamında, yüksek yoğunlukta spermatozoonun ($1x10^6$) 20-24 saat süreyle inkübasyonu tercih edilmektedir (Gordon 2003). *İn vitro* ortamda başarılı bir fertilizasyonun şekillenebilmesi için oosit başına en az 5000 motil spermatozoon bulunması gerekmektedir (Xu ve ark 2006). İnkübasyon süresi, spermatozoon yoğunluğu ve kapasitör ajanların dozları fertilizasyon başarısı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. IVF laboratuvarlarında, oosit başına genellikle $10x10^3$ ile $20x10^3$ arasında spermatozoon yoğunluğu içeren fertilizasyon ortamlarının hazırlanması önerilmektedir (Yang ve ark 1993). Spermatozoonun farklı yoğunlukları ile yapılmış bir çalışmada en yüksek fertilizasyon oranının ise $1x10^6$ spz/mL konsantrasyonunda elde edildiği bildirilmiştir (Saeki ve ark 1995).

IVF'de Başarı Kriterleri

Fertilizasyon işleminin şekillendiğini anlamak amacıyla, dikkate alınan ve kabul gören bazı önemli kriterler vardır. Bunlar; spermatozoon başının ooplazma içinde görülmesi, oosit sitoplazması içerisinde spermatozoon kuyruğunun varlığı, ooplazma içinde erkek ve dişi germ hücrelerine ait pronükleusların tespiti, perivitellin boşlukta birinci ve ikinci kutup cisimciğinin saptanması, zona pellusida veya perivitellin boşlukta spermatozoonların görülmesi, ikinci mayoz bölünmenin telofaz aşamasında oosit aktivasyonunun tespit edilmesi ve embriyonik bölünmelerin (cleavage) başlaması ile kortikal granüllerin kaybolması olarak sayılabilmektedir. Bu kriterler, fertilizasyonun gerçekleştiğini gösteren temel belirtiler olarak kabul edilmektedir (Kocyigit ve Cevik 2015, Satılmış 2019, Çevik 2020, Biçici 2022).

1.9.5. Embriyoların Kültürü (IVC)

İn vitro fertilizasyondan sonra elde edilen zigotların blastosist evresine ulaşıncaya kadar uygun kültür medyumu, ısı, nem ve gaz ortamında yaklaşık 6-8 gün inkübasyona alınmaları gerekmektedir. Yapılan bu işleme, embriyo kültürü adı verilmektedir (Takahashi ve Kanagawa 1998, Gordon 2003, Şen ve Kuran 2018). Başarılı bir fertilizasyon işleminden sonra zigotlar embriyo kültür ortamına aktarılmadan önce ortamın yapısını bozabilecek veya kirletebilecek kalıntılardan arındırılması gerekmektedir. Bu işlemin embriyo gelişimi üzerine oldukça önemli etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Embriyo elde edilmesinde en kritik noktalardan biri ise embriyo kültür medyumunun seçilmesidir (Feugang ve ark 2009, Suthar ve Shah 2009).

Günümüze kadar embriyo kültür ortamı için birçok farklı sistem denenmiştir. Bunlar; sığır ovidukt epitel hücre kültürü (BOEC), kumulus hücre kültürü, trofoblastik veziküllerden elde edilen kültürler ve rat karaciğer hücreleri ile yapılan ko-kültürler vb. olarak sıralanabilir. Ancak, günümüzde hazır embriyo kültür medyumları tercih edilmiyorsa, onların yerine TCM-199, CR1aa (Charles Rosenkrans), SOF, CZB (Chatot Ziomek Bavister Medyum), hamster embriyo kültür medyumu-6 (HECM-6) ve G1.1/G2.2 gibi kimyasal olarak hazırlanmış medyumlar kullanılabilmektedir (Cooke ve ark 2002, Gordon 2003, Suthar ve Shah 2009). Bu medyumlar arasında en çok tercih edilenler, düşük oksijen konsantrasyonu (%5) ile blastosist verimi en fazla olan TCM-199, SOF ve CR1aa'dır (Imai ve ark 2002, Suthar ve Shah 2009, Macías-García ve ark 2017).

İn vivo Embriyo Kültürü: Senkronize edilmiş aynı ya da farklı yakın türden hayvanların oviduktlarına zigotlar bırakılır. Embriyoların gelişim süreleri türden türe farklılık göstermekle birlikte 4-8 gün arasında sürebilmektedir. Bu süreler sonucunda transfere uygun hale gelen embriyolar taze olarak nakledilir veya dondurulup saklanabilmektedir. Bu yöntem artık çok sık kullanılmamaktadır (Gordon 2003).

Kültür medyumları tanımlı (defined), yarı tanımlı (semi-defined) ve tanımsız (non-defined) olarak üç kategoriye ayrılmaktadır. Tanımlı medyumlar, laboratuvar koşullarında hazırlanan, ozmotik basınç ve pH dengesi sağlanan medyumlardır. Bu medyumların laboratuvar ortamında hazırlanması nedeniyle, kontaminasyon, oksidatif stres ve toksik madde birikme riski yüksektir. CR1aa, CR2aa, SOF ve KSOM gibi

medyumlar tanımlı medyumlara örnek olarak verilebilmektedir. Yarı tanımlı medyumlar ise serum yerine albümin kullanılarak hazırlanmaktadır. Ticari olarak üretilen ve içeriği tam olarak bilinmeyen medyumlar tanımsız medyumlar olarak sınıflandırılmaktadır. Bu medyumların ana bileşenlerinden biri serumdur ve ozmotik basınç ile pH dengesi sağlanmış olup ek bir düzenleme gerektirmezler. Ayrıca, embriyo gelişimini destekleyen büyüme faktörleri, vitaminler, amino asitler ve enerji substratları gibi çeşitli katkı maddeleri içerebilmektedirler (Harkness ve ark 2019, Çizmeci 2022, Ochiai ve ark 2022).

İn vitro fertilizasyon yoluyla elde edilen embriyoların kültür vasatıyla gelişiminin sağlanabilmesi için bazı *in vitro* kültür sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler aslında embriyonun oviduktan uterusa göçü sırasında meydan gelen fizyolojik değişiklikleri taklit etmeye yönelik girişimlerdir. Kullanılan kültür sistemleri; standart (tekli) kültür, sıralı (ikili) kültür, ko-kültür, mikro akışkan, mikrokültür ve perfüzyon sistemi olarak sayılabilir (Cooke ve ark 2002, Gordon 2003, Feugang ve ark 2009, Suthar ve Shah 2009).

Standart (Tekli) Kültür: Bu kültür yöntemi, bileşenleri bilinen medyumlarla kültür yöntemidir. Bu yöntemde medyum değişimine gerek duyulmamaktadır. Kültür medyumlarının içeriğine çeşitli konsantrasyonlarda mineral tuzlar, enerji kaynakları, antibiyotikler ve bazı hormonlar eklenerek hazırlanmaktadır (CR1aa, CR2aa, SOFaa, KSOM gibi). Ayrıca, ticari olarak temin edilebilen medyumlar da (Quinn's Advantage Medium, QAM) bu yöntemde kullanılabilmektedir (Cooke ve ark 2002, Gordon 2003, Feugang ve ark 2009, Suthar ve Shah 2009).

Sıralı (İkili) Kültür Sistemi: Standart kültür medyumlarında, embriyoların toksik metabolit birikiminden olumsuz etkilenmesini önlemek amacıyla, kültür medyumunun 72. saatte değiştirilmesi önerilmektedir. Canlı materyalde embriyonun oviduktan uterusa geçişi sırasında, bu iki dokunun bileşimi ve gaz ortamlarının farklı olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, embriyonun ihtiyaçlarına göre iki farklı medyum geliştirilmiştir (Feugang ve ark 2009). Örneğin, embriyonun erken gelişim döneminde piruvat kullanırken, morula aşamasından sonra glikoz kullanılmaktadır. Glikoz, blastulasyon, farklılaşma ve büyüme aşamalarında embriyonun enerji ihtiyacını karşılamaktadır (Leese ve ark 1993, Jansen ve ark 2006). Ayrıca, erken embriyonik gelişim aşamasında amino asitlerin sınırlı miktarda kullanılması gerektiği belirtilmiştir

(Ohashi ve ark 2000). İkili kültür sistemlerine G1/G2, KSOM/SOF, SOF1/SOF2 ve SOF-A/SOF-B medyumları örnek olarak verilebilir (Cooke ve ark 2002, Gordon 2003, Suthar ve Shah 2009).

Ko-Kültür Sistemi: Ko-kültür yöntemi, çok kullanılmasa da etkili bir tekniktir. Bu yöntemde embriyolar, granüloza, ovidukt epiteli ve fibroblast gibi farklı hücre tipleri ile birlikte kültüre edilmektedir. Amacı ise, bu hücrelerin salgıladıkları büyüme faktörlerinin, embriyotrofik etkilerinden embriyoların faydalanmasını sağlamaktır. (Gandolfi ve Moor 1987, Gordon 2003, Kelly ve ark 2007)

Mikro Akışkan Sistemler: Kültür ortamının kademeli olarak değiştirilmesi sistemine dayanmaktadır. Bu sayede embriyo üzerindeki stres etkenlerini ortadan kaldırarak daha iyi sonuçlar elde etmeyi amaçlayan bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Bu sistemde embriyonun yerini değiştirmeden, kontrollü bir sıvı akışı sağlanmaktadır. Standart sistemlerde embriyoyu çevreleyen ortamın hacmi 50 µL iken, bu sistemde yalnızca 0,125 µL'dir (Raty ve ark 2004, Kim ve ark 2009).

Mikrokültür Sistemleri: Embriyoyu çevreleyen az miktardaki kültür medyumunu, daha büyük hacimli bir sıvı ortamıyla birleştirmektedir. Bu sistemde embriyo, embriyotrofik büyüme faktörlerini korumak için kendine bir mikro çevre oluşturmakta ve dıştaki yüksek hacimli ortamdan küçük moleküllerin geçişine de izin vermektedir. Bir petri kabına uygun bir cihaz ile ısı uygulanmasıyla kuyucuklar açılır ve her embriyo için ayrı bir mikro sistem oluşturulmaktadır. Bu yöntem, 2000 yılında Gabor Vajta tarafından Well of the Well (WOW) sistemi adıyla geliştirilmiştir (Vajta ve ark 2008).

Perfüzyon Sistemi: Bu sistem sürekli sıvı akışı prensibi göre hazırlanmıştır. Diğer sistemlerin aksine, inkübasyon sırasında medyumun üzerini örten mineral yağ kullanılmamaktadır. Bu sistemin avantajları arasında medyum ile gaz ortamının temasının azalması, aynı zamanda bazı maddelerin kültür medyumundan kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi ve ölçülebilmesidir. İnsan ve fare embriyo kültürlerinde yaygın olarak kullanılırken, maliyeti ve özel malzeme gereksinimi nedeniyle sığır embriyo kültürlerinde henüz sınırlı bir kullanım alanına sahiptir (Feugang ve ark 2009).

Başarılı bir embriyo kültür ortamı oluşturabilmek için, ovidukt biyokimyasının detaylı bir şekilde analiz edilip taklit edilmesi ve belirli parametreler için en uygun

koşulların sağlanması gerekmektedir. İn vivo ortamda ovidukt sıvısının osmolaritesi yaklaşık olarak 290-300 mOsm/kg aralığında olup, pH değeri ise 7,2-7,6 arasında değişmektedir. *İn vitro* kültür ortamında oksijen seviyesinin %10'un altında olması arzu edilmektedir. Embriyo gelişimi için kültür ortamının %90 N_2, %5 O_2 ve %5 CO_2 içermesi, en ideal ortam olarak kabul edilmektedir. Kültür ortamındaki ısının ise 38,5˚-39˚C olması istenmektedir (Gordon 2003). Ovidukt sıvısının içeriğinde Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} ve Cl^- iyonik maddeler yoğunluğu düşükken, potasyum (K) ve bikarbonat ($HCO3^-$) maddelerinin seviyeleri yüksektir. *İn vitro* ortamda ise, zigot aşamasından morula aşamasına kadar enerji kaynağı olarak laktat, piruvat ve glutamin tercih edilmekte, morula aşamasında sonra ise glikoz kullanılmaktadır. Protein kaynağı olarak da aminoasitler ve makromoleküller kullanılmaktadır (Gilchrist ve ark 2015, Kaymaz 2015).

Embriyoların IVP aşamaları sırasında güneş ışığı veya yapay ışığa maruz kalmalarının, embriyo gelişimi üzerinde olumsuz etkilere sebep olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, mümkün olduğunca karanlık bir ortamda çalışılması gerektiği önemle vurgulanmaktadır (Li ve ark 2015, Lv ve ark 2019, Gödöny ve ark 2024).

1.9.6. Embriyoların Değerlendirilmesi

Embriyoların kalitesini değerlendirmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Elde edilen gebelik oranları esas alındığında, bu yöntemlerin tamamının eşit derecede güvenilir olduğu anlaşılmaktadır. Embriyoların değerlendirilmesi için morfolojik ve hücresel ölçümlere dayanan birçok skorlama yöntemi geliştirilmiştir (Balboula ve ark 2020, Suwik ve ark 2020). Embriyo kalitesini değerlendirirken yaygın olarak kullanılan parametreler; embriyonun şekli, rengi, hücre sayısı ve bütünlüğü, perivitellin boşluğunun genişliği, apoptotik ve dejenere hücre sayısı, vezikül sayısı ve hacmidir. Sığır embriyolarının çapı, zona pellusida ile birlikte yaklaşık 150-190 µm arasında değişmektedir (Yao ve ark 2018). Sığır embriyolarının kalitesini değerlendirmede en yaygın kullanılan kriter, embriyoların uygun gelişim aşamalarına ulaşıp ulaşmadığını kontrol etmektir (Racowsky ve ark 2010).

Fertilizasyon işlemini tamamlamış zigotlar, iki hücreli, dört hücreli ve 16 hücreli aşamalarına kadar mevcut hücre sayılarıyla tanımlanabilmektedir. Ancak, 16 hücreden daha fazla hücreye (blastomere) sahip embriyoların mikroskobik incelemesi ile hücre

sayısı yalnızca tahmin edilebilmektedir. Bu nedenle, embriyo değerlendirilmesinde bazı morfolojik kriterlerin kullanılması gerekmektedir. Bu kriterler ise;

I. Hücresel fragmentlerin varlığı ya da yokluğu; embriyonal gelişimin ilk aşamalarında kolayca değerlendirilebilmektedir. Ancak, ilerleyen aşamalarda bu değerlendirme daha zor hale gelmektedir. Bunun nedeni ise bölünen hücrelerin çoğalmasıyla birlikte zona pellusidaya dayanmakta ve perivitellin boşluk görülememektedir.
II. Kompaktlaşma derecesi; genellikle morulanın dış çevresinin yuvarlaklığı ve keskinliği ile değerlendirilmektedir.
III. Blastomerlerin renk ve dokusu açıktan koyuya kadar değişmektedir. Bu değişime birçok faktör etki etmektedir. *İn vitro* ile elde edilen embriyoların rengi, *in vivo* yoldan elde edilen embriyolara göre daha koyu renkte olmaktadır.
IV. Düzensiz bölünme, hücrelerin senkronize olmayan bölünmeleri nedeniyle oluşmaktadır (Hardy ve ark 1993).

1.9.7. Embriyoların Kalitelerine Göre Sınıflandırılması

Uluslararası embriyo teknolojileri topluluğunun belirlemiş olduğu bir standart skala ile embriyoların kaliteleri sınıflandırılır ve kalitelerine göre 1 ile 4 arasında değerlendirilmektedir.

Kalite-I: Mükemmel ya da iyi olarak nitelendirilen bu embriyoların, %85'ten fazlası canlı hücrelerden oluşur. Gelişim aşamalarının zaman çizelgesiyle uyumlu olduğu bildirilmektedir. Hücre dağılımı düzgün ve zona pellusidası mevcuttur. Hücre içindeki düzensizlikler minimum seviyededir. Mükemmel ve iyi kaliteli embriyolar yüksek gebelik oranları sağlar ve dondurma işlemi için en uygun sınıf olduğu belirtilmiştir.

Kalite-II: Orta kalitedeki embriyoların %50'sinden fazlası ya da en az %50'si canlı hücrelerden oluşur. Renkleri biraz daha açıktır ve kısmen düzensiz bir hücre kütlesine sahiptirler. Bu embriyolar dondurma-çözme işlemi sırasında yaşama kabiliyetlerini kaybettikleri için dondurma işlemine uygun olmadığı bildirilmektedir. Ancak, uygun bir taşıyıcı bulunduğunda taze transfer için kullanılması önerilmektedir.

Kalite-III: Zayıf veya vasat olarak değerlendirilen embriyoların en fazla %25'i canlı hücrelerden oluşur ve daha düzensiz bir yapıya sahiptirler. Dondurma için uygun olmadığı gibi taze transferlerde de yaşama şansları oldukça düşüktür.

Kalite-IV: Dejenere embriyolar veya fertilize olmamış oositler olarak bilinirler ve bu nedenle embriyo transferi için uygun değildirler (Bó ve Mapletoft 2018, Karasahin ve ark 2021).

1.9.8. Embriyoların Aşamalarına Göre Sınıflandırılması

Embriyoların gelişim aşamaları IETS'nin belirlemiş olduğu bir standart skala ile açıklanmıştır. Embriyolar gelişim derecelerine göre 1 ile 9 arasında değerlendirilmektedir. Bunlar Tablo 1.7'de gösterilmektedir.

Tablo 1.7. Embriyonun gelişim aşamalarının tanımlanması (Makarevich 2012).

Skala	Aşama	Morfolojik belirteç
1	Tek hücre	Fertilize olmayan oosit (UFO), dejenere olan zigot
2	2-12 hücre	2-12 hücre içermektedir
3	Erken morula	16-32 adet hücreden oluşur, kompakt olmayan büyük blastomer kümesi.
4	Morula	32-64 hücre içerirler, kompakt küçük blastomer kümesi.
5	Erken blastosist	Blastosöl < %50
6	Blastosist	Blastosöl > %50
7	Genişlemiş (Expanded) blastosist	Embriyonun büyüklüğü artar ve zona pellusida duvarı incelir.
8	Sarkmış (Hatching) blastosist	Zona pellusida rupturu sonucu embriyo kısmen atılır.
9	Expanded Hatched blastosist	Embriyo tamamen atılır ve büyüklüğü artar, zona pellusida boştur.

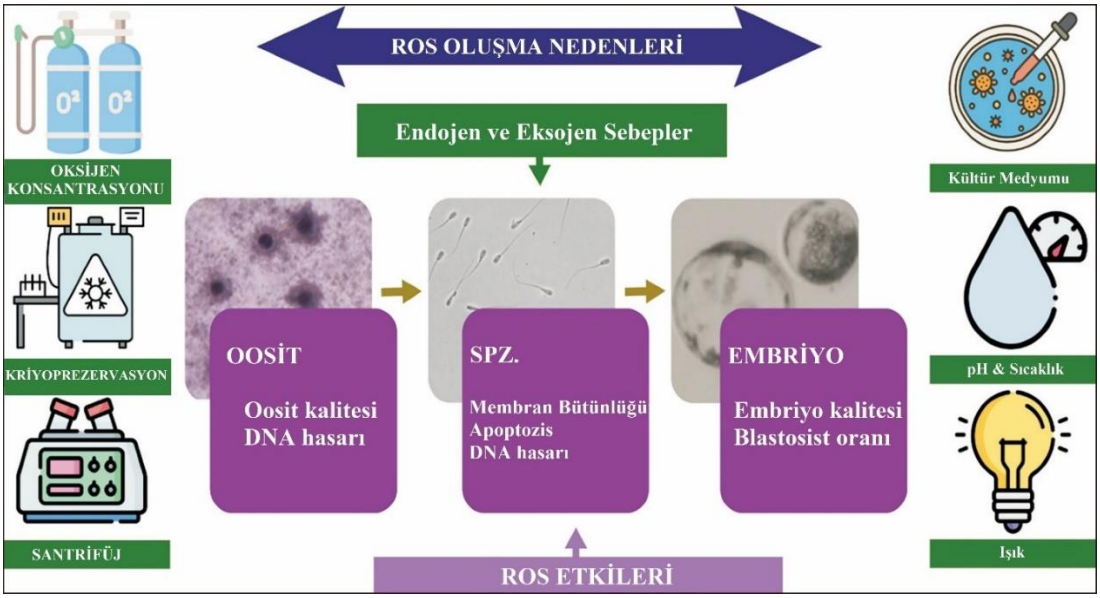
1.10. Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri (ROS)

Oksidatif stres (OS), reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ile toplam antioksidan miktarı arasındaki denge bozulduğunda ortaya çıkar (Pizzino ve ark 2017). Düşük konsantrasyonlarda ROS, çeşitli fizyolojik süreçlerde sinyal molekülleri gibi davranmaktadır. Erkek üreme sisteminde, bu redoks mekanizmaları spermatogenezis

sürecinde, kromatin yoğunlaşması evresinde, epididimiste taşınma sırasında, spermatozoon olgunlaşması, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve spermatozoon-oosit etkileşimlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Fisher ve Aitken 1997, Bardaweel ve ark 2018). Dişi üreme sisteminde ise redoks homeostazının folikülogenezis, implantasyon ve plasentasyon süreçlerinde kritik olduğu bildirilmektedir (Sharma ve Agarwal 2004, Agarwal ve ark 2005). Öte yandan, yüksek ROS seviyeleri hücresel lipitlere, hücre zarlarına, organellere ve DNA'ya zarar verebilir, enzimatik işlevi değiştirebilir ve apoptozu tetikleyebilir (Birben ve ark 2012, Redza-Dutordoir ve Averill-Bates 2016). ROS kaynaklı lipit peroksidasyonu, oksidatif stresin dolaylı bir moleküler belirteci olan malondialdehit (MDA) gibi oldukça reaktif ve mutajenik ürünler üretmektedir (Marnett 1999).

Serbest radikaller, nükleik asitler, proteinler, lipitler ve karbonhidratlar gibi moleküllerden elektron alarak kararlı hale gelen, hücresel hasara ve bozulmaya neden olan kararsız ve oldukça reaktif türlerdir. Reaktif oksijen türleri, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip serbest radikaller olup, yüksek reaktiviteye sahip moleküllerdir. ROS'ların en yaygın formları süperoksit radikali (O_2-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleridir (OH-) (Torres-Osorio ve ark 2019). Reaktif oksijen türleri üretiminin artmasına çeşitli faktörler katkıda bulunabilir ve bu durum optimum olmayan sonuçlara yol açabilir. Reaktif oksijen türleri, spermatozoon, oosit ve embriyo hücreleri tarafından üretilebilmektedir. Ayrıca, uygulanan işlemler sırasında birçok dış faktör de OS'e neden olabilir (Şekil 1.5). Bu bağlamda, atmosferik oksijen seviyesinin (%20) embriyolar üzerindeki etkisi araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Yuan ve ark 2003, Kitagawa ve ark 2004, Bodu ve ark 2024a). Vücut dokularının çoğunun, %4 ile %10 oksijen konsantrasyonlarında işlev gördüğü bildirilmektedir. Ancak, laboratuvar koşulları, IVM sırasında oositlere ve spermatozoonlara bazı manipülasyonlar gerekmekte ve bu da ROS üretimine yol açabilmektedir (Torres-Osorio ve ark 2019). Laboratuvar ortamı, kullanılan gazlar ve kültür ortamının kalitesi de OS'ye yönelimi artırabilmektedir Ek olarak, santrifüj işlemi, ışık, sıcaklık ve nem gibi faktörler doğrudan veya dolaylı olarak OS'yi tetikleyebilmektedir (Guerin ve ark 2001, Agarwal ve ark 2014). Ayrıca, gametlerin veya embriyoların dondurulması ve çözülmesi işlemleri sırasında ROS üretimi artar ve bu da ROS kaynaklı kriyo-hasar riskini artırır (Bansal ve Bilaspuri 2011, Agarwal ve ark 2022). Bu faktörler, gamet hazırlama, fertilizasyon, embriyo gelişimi ve blastosist aşamasına kadar sürecin her

aşamasında etkili olabilmektedir. Bu nedenle, OS riskini azaltmaya yönelik stratejiler arasında laboratuvar ortamının optimizasyonu, sperm hazırlama teknikleri, embriyo kültür ortamı ve kriyoprezervasyon prosedürleri yer alır. *İn vitro* embriyo üretimi sırasında ROS'un yan etkilerini azaltmak için iki önemli yaklaşım kullanılmaktadır: Bunlar embriyo kültüründe oksijen konsantrasyonunun %5'e düşürülmesi ve çeşitli antioksidan bileşiklerin ilave edilmesidir (Agarwal ve ark 2014).



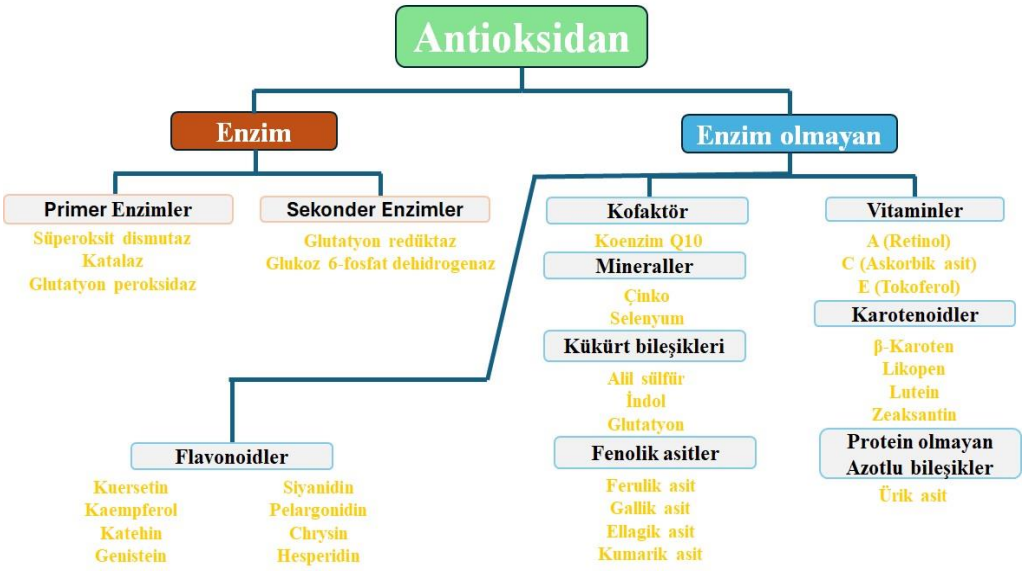
Şekil 1.5. Reaktif oksijen türlerinin oluşmasına sebep olan etkenler (Torres-Osorio ve ark 2019)

1.11. Antioksidanlar

Antioksidanlar, canlı hücrelerde oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı savunma sağlayan bileşiklerdir. İki ana gruba ayrılmaktadırlar. *Enzimatik antioksidanlar,* vücudun oksidatif strese karşı doğal savunmasını oluşturan ve hücre içinde üretilen enzimlerdir. Bu enzimler, serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini (ROS) nötralize ederek hücre hasarını önler. İşlevleri, bu zararlı molekülleri daha az reaktif bileşiklere dönüştürmek ve onları zararsız hale getirmek üzere sistemlerden temizlemektir. Enzimatik antioksidanlar, hücresel seviyede oksidatif hasarı önleyerek yaşlanma, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli sağlık sorunlarının gelişimini engellemektedir. Ayrıca hücrelerin enerji metabolizması sırasında oluşan serbest radikalleri etkisiz hale getirerek enerji dengesini sağlamaktadırlar. *Enzimatik olmayan antioksidanlar,* vücutta doğal olarak üretilmeyen, genellikle dışarıdan beslenme yoluyla alınan ve serbest radikalleri

nötralize eden moleküller olarak bilinmektedir. Bu antioksidanlar enzimatik reaksiyonlar gerçekleştirmez, ancak hücrelerdeki oksidatif stresin zararlı etkilerini azaltmada önemli bir rol oynamaktadır. Vücutta serbest radikalleri doğrudan bağlayarak oksidatif hasarı önlemektedir (Şekil 1.6) (Mehta ve Gowder 2015, Nimse ve Pal 2015, Meulmeester ve ark 2022).

Antioksidanlar, serbest radikallerin ve oksidanların etkilerini engelleyen, azaltan, geciktiren veya tamamen ortadan kaldıran ve vücudu oksidatif hasardan koruyan moleküller olarak tanımlanmıştır (Lobo ve ark 2010). Antioksidan savunma mekanizmalarının, türleri ve/veya konsantrasyonları değişse de hem bitkilerin hem de hayvanların hücre ve dokularında her zaman görev yaptığı ifade edilmektedir. Antioksidanlar, "oksitlenebilir substratlarla karşılaştırıldığında, düşük konsantrasyonlarda mevcut olduğunda, o substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen herhangi bir madde" olarak tanımlamıştır (Halliwell ve Gutteridge 1995). Bu tanım daha sonra, oksidatif hasarı onaran molekülleri de kapsayacak şekilde "hedef moleküle oksidatif hasarı geciktiren, engelleyen veya ortadan kaldıran herhangi bir madde" olarak genişletilmiştir (Halliwell 1995a, Halliwell 1995b, Halliwell ve Gutteridge 1995). Böylece, antioksidanlar oksidasyon reaksiyonunu geciktirme, serbest radikallerin gelişimini engelleme veya serbest radikaller/oksidanlar üreten otoksidasyon zincir reaksiyonunu kırma yeteneğine sahiptirler. Ayrıca, hidroperoksitleri kararlı bileşiklere dönüştüren indirgeyici ajanlar ve metal şelatlayıcılar olarak da işlev görmektedirler. Bazı antioksidanlar, metal pro-oksidanları kararlı forma dönüştüren metal şelatlayıcılar olarak hareket etmektedir. Oksidatif stres, reaktif oksijen ve/veya reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretiminin artmasıyla, oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar lehine bozulmasından kaynaklandığı ifade edilmektedir (Kurutas 2015). Vücudun oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları iki ana sistemde çalışır. Birincisi, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimler tarafından serbest radikallerin ve reaktif türlerin uzaklaştırılmasıyla yapılmaktadır. İkincisi ise, glutatyon (GSH), tokoferoller, askorbik asit, tiyoredoksin gibi elektron donörleri tarafından serbest radikallerin temizlenmesi ile şekillenmektedir (Devasagayam ve ark 2004).



Şekil 1.6. Antioksidan maddelerin türlerine göre dağılımı (Ali ve ark 2020).

1.11.1. *İn Vitro* Embriyo Üretimi ve Oksidatif Streste Antioksidanların Önemi

İn vitro embriyo kültürü, oositin fertilizasyon sürecini tamamlayarak embriyo gelişimini kapsayan uzun bir süreçtir. Ancak, *in vivo* koşullara kıyasla düşük performansı nedeniyle klinik uygulamada hala yaygın olarak kullanılamamaktadır. IVM sistemi, kültür ortamı ve oksidatif stres gibi etki eden faktörler, IVC'nin sonuçları üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir (Sovernigo ve ark 2017, Cao ve ark 2020, Yang ve ark 2021, Bodu ve ark 2024b). *İn vitro* embriyo üretimini optimize etmek ve oksidatif stresin olumsuz etkilerini azaltmak ya da yok edebilmek için çok sayıda çalışmada antioksidan ilavesi denenmiştir. *İn vitro* maturasyon çalışmalarında kuersetin, sisteamin ve C vitamini kullanımının, sığır oositlerinde ROS seviyelerini azaltmak veya glutatyon seviyelerini artırmak suretiyle oksidatif stresi azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca, antioksidan etkili β-merkaptoetanol ve E vitamininin H_2O_2 içeriğini azalttığı, oksidatif hasarı baskıladığı ve buna bağlı olarak DNA parçalanmasını azaltarak *in vitro* kültürlenmiş domuz embriyolarında gelişim yeteneğini iyileştirdiği gözlemlenmiştir (Kitagawa ve ark 2004). Sığırlarda, sistein eklenmesi embriyoların gelişimini iyileştirirken, asetilsistein, CAT ve süperoksit dismutaz'ın (SOD) embriyonik gelişim üzerinde sistein kadar olumlu bir etkiye sahip olmadığı bildirilmektedir (Ali ve ark 2003). Araştırmacılar ayrıca *in vitro* fertilizasyon aşamasında antioksidan eklenmesinin embriyonun blastosist aşamasına kadar olan gelişim hızını azalttığını, IVM ve IVC sırasında takviye edilen antioksidanların ise embriyo gelişimini artırdığını belirtmişlerdir (Karasahin ve ark 2021). Antioksidan takviyesinin türü ve

fazının sonuç üzerinde önemli bir etkisi olduğu öne sürülmektedir. Öte yandan, IVP besiyerine yüksek konsantrasyonlarda antioksidan eklenmesi, düşük konsantrasyonlu uygulamaya kıyasla blastosist oluşum oranını azaltmıştır (Boquest ve ark 1999, Kang ve ark 2016). Bu durum da yalnızca uygun dozda antioksidan ilavesinin embriyo kalitesini iyileştirmeye katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Canlı hücrelerin antioksidan savunma sistemi, üç önemli hattan oluşur:

1. Serbest radikallerin temizlenmesi,

2. Antioksidan enzimlerin sentezi ve aktivasyonu

3. Oksidatif hasarın onarımıdır. (Beyer 1994)

1.11.2. Likopen

Bitkisel ürünlerden elde edilen doğal renkli pigmentler dünya çapında büyük ilgi görmüştür. Bu pigmentler çeşitli renkler gösterir ve turuncu (β-karoten), sarımsı-yeşil (lutein), yeşil (klorofil) ve mavi-mor (antosiyanin) gibi gıda matrisinde yaygın olarak bulunan farklı fitokimyasallardan oluşmaktadır (Mortensen 2006). Likopenler, domates, papaya, pembe greyfurt, pembe guava ve karpuz gibi kırmızı renkli meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan kırmızı renkli pigmentlerdir. Bu kırmızı renkli pigment ilk olarak 1876'da Millardet tarafından domateste keşfedilmiştir. Daha sonra Schunck tarafından likopen olarak adlandırılmıştır (Vogele 1937). Yalnızca bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmektedir. İnsanlar veya hayvanlar tarafından sentezlenemezler. Meyve ve sebze tüketimi, insanların ve hayvanların karotenoidleri almasının tek yoludur. Karotenoidler, yalnızca A vitamini kaynakları oldukları için değil, aynı zamanda antioksidan özelliklere sahip oldukları için de insan ve hayvan diyetinin bir bileşenidir (Rao ve ark 2006, Rao ve Rao 2007, Atasoy 2012).

Likopen, bir karotenoid hidrokarbondur (aynı zamanda karoten olarak da adlandırılır). Çoğu karotenoid, oksidatif modifikasyona ve *cis- trans* izomerizasyonuna duyarlı bir dizi konjuge çift bağ içerir. İnsan plazmasında ve dokularında rutin olarak bulunabilen altı ana karotenoid (β-karoten, α-karoten, likopen, β-kriptoksantin, lutein ve zeaksantin) vardır. Bunlar arasında β-karoten en kapsamlı şekilde çalışılan ajandır. Son zamanlarda likopen, kanserler de dahil olmak üzere bir dizi kronik hastalık riskini azaltmasıyla ilişkisi nedeniyle önemli ilgi

görmüştür. Biyolojik ve fiziko-kimyasal özelliklerini belirlemek için önemli çabalar harcanmıştır. β-karoten ile karşılaştırıldığında likopen aynı moleküler kütleye (536,87 g) ve kimyasal formüle sahiptir, ancak likopen, β-ionon halka yapısından yoksun açık bir polien zinciridir. β-karotenin metabolizması kapsamlı olarak incelenmiş olmasına karşın, likopenin metabolizması hala yeterince anlaşılmamıştır (Mein ve ark 2008). Bu bileşiklerin geniş konjuge çift bağ sistemi, ışığı emen kromofor oluşturduğu için çekici renklerinden sorumlu olan karotenoidlerde önemli bir özelliktir. Bu bileşiklerde görülebilir renk varlığı, en az yedi konjuge çift bağ gerektirir. Konjuge çift bağ sayısı arttıkça, maksimum emilim için gözlemlenen dalga boyu değeri de o kadar yüksek olur (Ma ve ark 2019).

Likopen, en güçlü antioksidanlardan biri olarak kabul edilmektedir ve DNA, proteinler, lipitler ve düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL'ler) gibi kritik biyomolekülleri koruyarak kanser ve aterosklerozu önlemeye yardımcı olur. Likopenin, yüksek sayıda konjuge çift bağ içermesi nedeniyle β-karoten veya α-tokoferol ile karşılaştırıldığında daha yüksek singlet oksijen bastırma yeteneği vardır (Pool-Zobel ve ark 1997, Agarwal ve Rao 1998, Rao ve Agarwal 1998).

Likopenin prostat dokularında yüksek konsantrasyonlarda bulunması, cis-izomerlerinin olası faydaları ve doku izomerazlarının tüm trans'tan cis forma dönüşümde rol oynadığını göstermektedir (Clinton ve ark 1996). Ancak, 9-cis β-karotenin antioksidan etkisi gösterilmiş olmasına rağmen, likopen izomerlerinin böyle bir mekanik verisi yoktur (Levin ve ark 1997).

Yapılan bir çalışmada, 1 haftalık likopen kısıtlı diyetin ardından 5-cis likopen konsantrasyonlarında artış ve sonrasında azalma olduğu bildirilmiştir. Domates ürünleriyle yapılan diyet uygulama sonrasında ise diğer cis-likopen izomerlerinde eş zamanlı artış gözlemlenmiştir. Ancak likopen izomerlerinin bireysel antioksidan rolü ve dönüşümleri tam olarak anlaşılamamıştır (Hadley ve ark 2003).

Likopenin fizyolojik konsantrasyonlarında (0,3 μmol/L), iyi huylu prostat hiperplazisini önlemede hücre döngüsü durması yoluyla insan prostat epitel hücrelerinin büyümesini engellediği tespit edilmiştir (Obermüller-Jevic ve ark 2003). Ayrıca, likopenin LNCaP insan prostat kanseri hücre sağkalımını azalttığı ve bu etkinin yüksek likopen konsantrasyonlarında DNA hasarına bağlı olduğu

gözlemlenmiştir (Hwang ve Bowen 2005). Daha düşük likopen seviyelerinde ise DNA üzerinde etkisi olmadan malondialdehit oluşumunu azalttığı belirlenmiştir. Likopenin, LNCaP hücrelerinde mitokondriyal apoptozu indüklediği de gösterilmiştir (Hantz ve ark 2005).

Hayvan çalışmalarında hem domates tozu hem de saf likopen takviyesinin antineoplastik etkileri olduğu belirlenmiştir. Boileau ve ark (2003), domates tozunun testosteron kaynaklı karsinogenezi inhibe ettiğini, ancak saf likopenin tek başına etkili olmadığını vurgulamaktadır. Bu durum, likopenin domateslerdeki diğer antioksidanlarla sinerjistik etkiler gösterdiğini düşündürmektedir. Başka bir çalışmada ise yüksek konsantrasyonda likopenin prostat tümör dokusunda büyümeyi azalttığı belirlenmiştir (Siler ve ark 2004). Likopen, androjen metabolizmasını etkileyerek ve büyüme faktörleri ile sitokin aktivitesini inhibe ederek prostat ve meme kanseri büyümesini engelleyebilmektedir (Karas ve ark 2000). Ayrıca, likopenin mide kanserine karşı koruyucu etkilere sahip olduğu da gösterilmiştir (Liu ve ark 2006). Likopenin lipid metabolizmasına müdahale ederek ateroskleroz gelişimini de önlediği bilinmektedir. Likopen tedavisinin hücresel kolesterol sentezini baskıladığı ve LDL reseptörlerinin aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Fuhrman ve ark 1997). Likopen, diğer doğal antioksidanlarla birlikte oksidatif stresi azaltmada sinerjik etkiler göstermektedir (Balestrieri ve ark 2004). Bu antioksidan kombinasyonları, likopenin tek başına kullanımına göre daha etkili olabilmektedir (Basu ve Imrhan 2007). *İn vitro* kültür sırasında likopen takviyesinin domuz IVF embriyolarında gelişimsel yeterliliği iyileştirdiğini ve mitokondriye bağlı apoptozu azalttığını göstermiştir. Likopen, hücre içi ROS üretimini azaltmış, mitokondriyal membran potansiyelini iyileştirmiş, sitokrom c salınımını ve kaspaz 3 aktivasyonunu azaltmış ve sonuç olarak apoptozun azalmasına yol açmıştır. Bu sonuçlar, likopenin *in vitro* oksidatif stresle indüklenen mitokondriye bağlı apoptozu düzenleyerek domuz IVF embriyolarının gelişimsel yeterliliğini artırdığını göstermektedir (Kang ve ark 2021). Yapılan başka bir çalışmada IVM sırasında likopen takviyesinin embriyo gelişimini, blastosist kalitesini ve kriyo-toleransı önemli ölçüde iyileştirdiği ve ROS oluşumunu azalttığı görülmüştür. Dahası, likopen takviyesinin hücresel fonksiyon, metabolizma, DNA onarımı ve anti-apoptozis ile ilişkili yolları pozitif yönde etkileyerek elde edilen embriyoların transkriptomik görünümünü değiştirdiği bildirilmiştir. Oositler menadion ile birlikte inkübe edildiğinde, ROS'un zararlı etkileri açıkça görünürken; likopen bu tür etkileri

dengelemek için kullanıldığında, embriyoların kalitesinin iyileşme eğiliminde olduğu anlaşılmıştır (Sidi ve ark 2022).

1.11.3. Askorbik asit (Vitamin C)

İlk kez 1928'de, Macar biyokimyacı Albert Szent-Györgyi tarafından tanımlanmış ve izole edilmiştir. 'Askorbik asit' adı, iskorbüt (scorbutus) hastalığına atıfta bulunur, çünkü bu bileşiğin eksikliği başlangıçta yalnızca bu hastalığın gelişimiyle ilişkilendirilmiştir (Gęgotek ve Skrzydlewska 2022). Askorbik asit, diğer adıyla C vitamini, suda çözünebilen bir vitamindir ve birçok biyolojik süreçte önemli rol oynamaktadır Taze meyve ve sebzeler, özellikle turunçgiller, çilek, kivi, biber, brokoli gibi gıdalarda bulunmaktadır (Mulukutla ve ark 2015). Askorbik asit, vücuttaki karbonhidratlar, lipitler ve nükleik asitler (DNA ve RNA) gibi çeşitli moleküllerin toksinlere, kimyasal maddelere (ilaç, sigara ve vb.) maruz kalması sonucu hücresel metabolizma sırasında üretilen reaktif oksijen türlerinden ve serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyabilmektedir (Awala ve ark 2017, Agwu ve ark 2023).

Askorbik asidin antioksidan olarak etki mekanizması incelendiğinde ise, süperoksit, hidroksil, singlet oksijen, hidroperoksil, lipid peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek onları ortamdan uzaklaştırmaktadır (Beyer 1994).

Askorbat (askorbik asitin anyonu) molekülü, bu süreçlerin her birinde kritik bir rol oynar. Antioksidan özellikleri, özellikle serbest radikalleri temizleme yeteneği ile ilişkilidir; bu durum, stabilize edilmiş bir radikal oluşturma kapasitesinden kaynaklanmaktadır. Bu özellik, askorbatın hidroksil radikali veya süperoksit radikal anyonu gibi daha reaktif moleküllerle etkileşebilmesine ve bu radikallerin hücredeki önemli biyomoleküllerle reaksiyonlarını engellemesine olanak tanımaktadır. Askorbatın güçlü antioksidan özellikleri arasında, Fe^{3+}'i Fe^{2+}'ye hem indirgeyebilme hem de tam zıttını yaparak yükseltgenme yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte, askorbat Fe^{2+} kompleksi, Fenton reaksiyonu aracılığıyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu katalize edebilir (Tariq 2007, Du ve ark 2010). Bu durumda, askorbat antioksidan olarak işlev gösterirken, bazı koşullarda oksijen varlığında ise pro-oksidan olarak etkiler sergileyebilmektedir (Yen ve ark 2002).

Dalvit ve ark (2005), tarafından yapılan çalışmada, maturasyon ortamına alfa-tokoferol ve askorbik asit eklenmesinin, *in vitro* koşullarda üretilen blastosist oranını

kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir. Bu azalmanın, yalnızca kontrol değil, aynı zamanda alfa-tokoferol veya askorbik asit ile desteklenen ortamlara göre de anlamlı olduğu görülmüştür. Askorbik asidin veya alfa-tokoferolün tek başına eklenmesi, *in vitro* üretilen blastosist oranını değiştirmediği için, etkinin alfa-tokoferolün antioksidan kapasitesinin askorbik asidin varlığıyla sürdürülmesine bağlı olduğu ifade edilmektedir. Her iki doğal antioksidanın kombinasyonu, maturasyon sırasında gerçekleşen sitoplazmik ve/veya membranla ilgili olayları etkileyebilmektedir. Bu etkileşim, embriyo gelişiminin ileri aşamalarında belirgin hale gelmektedir. Askorbik asidin etkisiyle antioksidan kapasitesinin yeniden oluşturulması, IVM sırasında oositin gelişimsel yetkinliğinin kazanılması için gereken belirli lipid peroksit seviyelerinin oluşmasını önleyebileceği bildirilmiştir. Hossein ve ark (2007), L-askorbik asidin embriyo kültür ortamına eklenmesiyle daha yüksek blastosist oluşum oranı sağlandığını, toplam hücre sayısı (TCN), inner cell mass (ICM) ve trofektoderm (TE) sayıları değerlendirildiğinde, blastosist kalitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. L-askorbik asidin ayrıca gelişmekte olan embriyolardaki H_2O_2 seviyesini azalttığı da bildirilmiştir. Zhao ve ark (2017), askorbik asidin blastosist oluşumunu ve domuzların somatik hücre nükleer transfer embriyolarında yeniden programlamayla ilgili genlerin ekspresyonunu önemli ölçüde artırdınığı belirlemişlerdir. Chawalit ve ark (2012), askorbik asit gibi antioksidanların kültür ortamına eklenmesinin domuz embriyolarını oksidatif streslere karşı koruyabileceğini ve *in vitro* kültür sırasında embriyo gelişimini optimize edebileceğini göstermiştir. Gęgotek ve Skrzydlewska (2022), askorbik asidin hem antioksidan hem de anti-inflamatuar etkilerini detaylı bir şekilde araştırmıştır. Araştırmacılar askorbik asidin, küçük moleküler yapıdaki antioksidanlarla olumlu etkileşimlerinin yanı sıra, antioksidan enzimlerin biyosentezini ve aktivasyonunu destekleyici etkisini vurgulamıştır. Swamy ve ark (2011), sıçanlarda askorbik asidin reaktif oksijen türlerini temizleyerek ve endojen antioksidan sistemini geri yükleyerek doksorubisin kaynaklı miyokardiyal toksisite üzerinde kardiyoprotektif bir etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Sunulan tez çalışmasında *in vitro* kültür ortamına antioksidan özellikleri bilenen likopen ve askorbik asidin farklı dozları ve kombine dozları ilave edilerek blastosist gelişimi/kalitesi ve apoptozisin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Sunulan doktora tez çalışması için gerekli etik kurul izni "Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'ndan" (SÜVDAMEK) alınmıştır (2022/80).

Sunulan tez çalışmasındaki materyal, Konya ilinde faaliyet gösteren mezbahaneden kesilen dişi sığırlardan elde edilen ovaryumlardan sağlanmıştır. Ön çalışmalar Haziran-Ağustos 2022, tez çalışması ise Temmuz-Eylül 2023 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın *in vitro* embriyo üretim uygulamaları Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı IVF Laboratuvarında, üretilen embriyoların görüntülenmesi Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.2. Yöntem

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

	Ürün	Marka/ Ürün Kodu	Miktar
1	BO-WASH	Bioscience / 51002	50 mL
2	BO OIL	Bioscience / 51003	50 mL
3	BO IVM	Bioscience / 71001	10 mL
4	BO SEMENPREP	Bioscience / 71003	20 mL
5	BO IVF	Bioscience / 71004	10 mL
6	BO IVC	Bioscience / 71005	10 mL
7	Sperma	Süper Genetik / Değirmen	0,25 mL
8	Likopen	Sigma-Aldrich / L9879	5 mL
9	L-Askorbik Asit	Sigma-Aldrich /A4544	100 g
10	Laktaklı Ringer	Biofleks	1000 mL
11	Fötal Buzağı Serumu (FCS)	Sigma-Aldrich /C8056	100 mL
12	Antibiyotik (Pen., Strept., AmB)	Merck / 516104	100 mL

2.2.1. Antioksidanların Hazırlanması

Sunulan tez çalışmasında, embriyo üretimi öncesinde kültür ortamına eklenecek antioksidanların stok çözeltileri hazırlandı.

Likopen kimyasalı 1 mL kloroform içerisinde çözdürülerek 9,31 mM ana stok çözeltisi elde edildi. Stok çözeltilerden, 24 µM yoğunlukta likopen çözeltisi elde etmek amacıyla her bir eppendorf tüpüne 24 µL alındı ve bu tüpler, çalışma sırasında kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

Askorbik asit ana stok çözeltisi, fosfat buffer solüsyonu (PBS) içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan çözeltiler, her biri 20 mM yoğunlukta olacak şekilde eppendorf tüplerine 20 µL olarak ilave edildi ve çalışma sırasında kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

2.2.2. Ovaryumların Eldesi ve Laboratuvara Nakli

Çalışmada kullanılmak üzere mezbahanede kesilen dişi sığırlardan alınan ovaryumların laboratuvara taşınması ve kesim sonrası oluşan kan ve doku kalıntılarından arındırılması için 25-35°C'deki Laktatlı Ringer+antibiyotik (Pen., Strept., AmB) karışımı içeren bir transfer solüsyonu hazırlandı ve termosa aktarıldı. Mezbahadan alınan ovaryumlar termosların içerisine alındı. Ovaryumlar toplandıktan sonra maksimum 1-2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

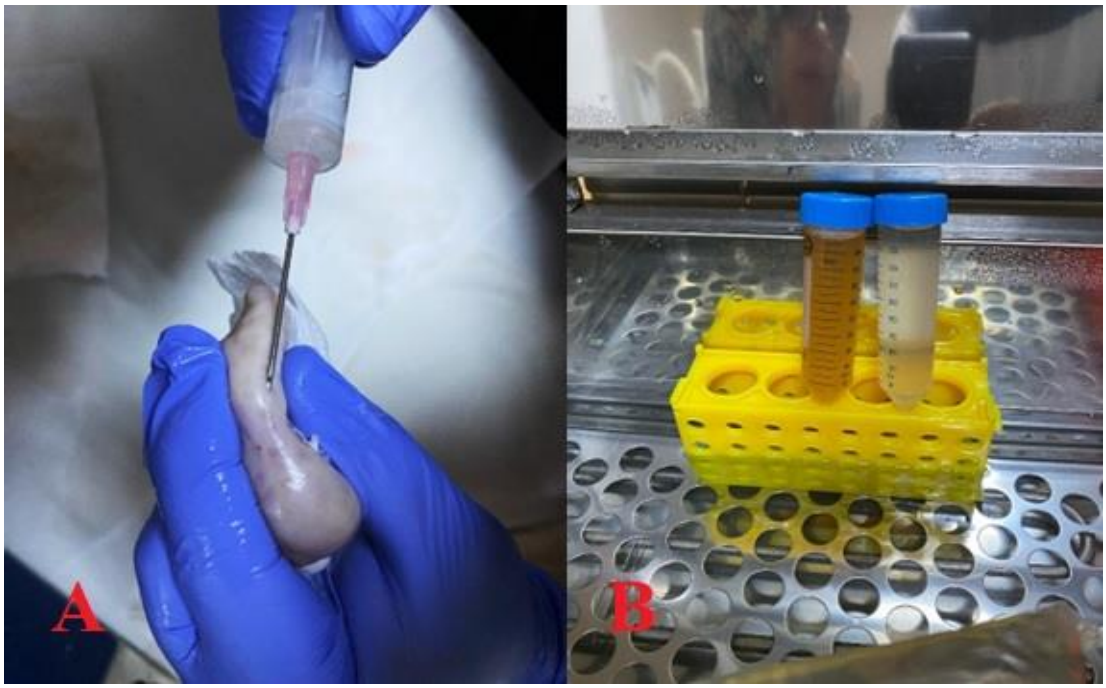
Ovaryumlardan Oosit Eldesi

Laboratuvara getirilen ovaryumların kan, doku kalıntısı ve taşıma vasatından uzaklaştırmak amacıyla antibiyotikli laktatlı ringer solüsyonu ile 3-4 kez yıkandı. Sonrasında ovaryumlar laktatlı ringer, antibiyotik ve FCS içeren behere aktarıldı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Mezbahadan getirilen ovaryumların aspirasyon için hazırlanması, benmariye falkon tüplerin yerleştirilmesi (S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.B.D. IVF laboratuvarı).

Aspirasyonu yapılan foliküllerden oositlerin toplanması için 50 mL'lik konik uçlu falkonlar hazırlandı. Falkonlara oositlerin yapışmasını önlemek için, öncesinde falkonlara 10 mL kadar aspirasyon solüsyonundan ilave edildi. Oositleri aspire etmek için 10 mL'lik 18-G contasız steril enjektör kullanıldı. Ovaryum üzerinde bulunan 2-8 mm çaptaki foliküller enjektör içerisine aspire edildi. Aspirasyon sırasında enjektörün kesik ucunun yukarı bakmasına, ovaryumun korteksine girilmesine ve tek bir noktadan girildikten sonra mümkün olduğunca çok folikül aspirasyonu yapılmasına dikkat edildi (Şekil 2.2.A). Her ovaryum aspirasyonundan sonra enjektör içerindeki sıvı falkona aktarıldı ve bu işlemlere ovaryumlar bitirilene kadar devam edildi. Konik uçlu falkon içerisindeki sıvılardan süpernatant kısmı atıldı ve üzerine tekrar hazırlanmış olan solüsyondan ilave edildi. Bu işlem her zaman 3 kez olacak şekilde tekrar edildi (Şekil 2.2.B). Falkondan süpernatant atıldıktan sonra, 10 mL KOK içeren sıvı, altı çizili 90 mm'lik petriye aktarıldı.

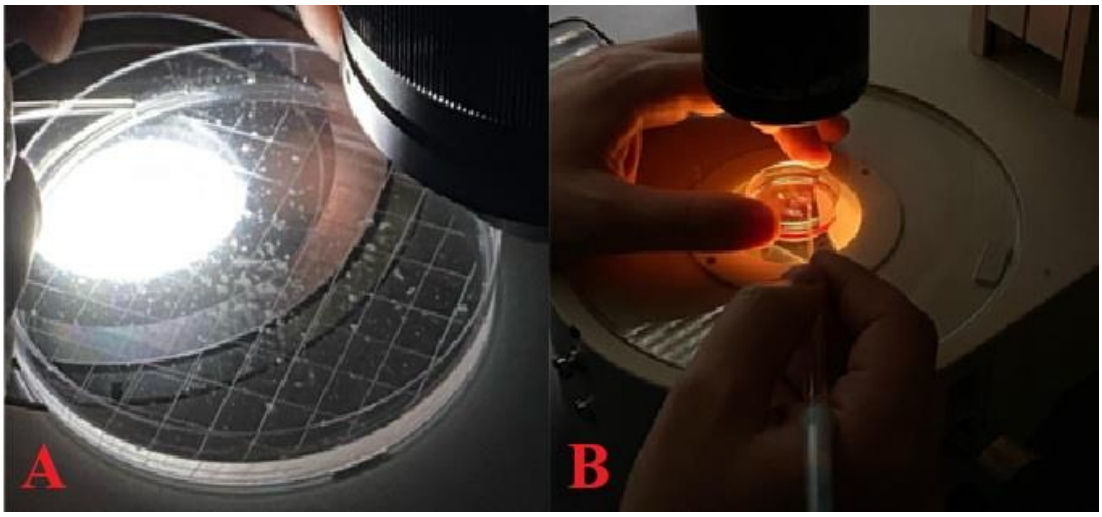


Şekil 2.2. A: Ovaryumlardan oosit aspirasyonu **B:** Aspire edilen oosit sıvılarının falkon tüplerine aktarılması ve yıkanması (S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.B.D. IVF laboratuvarı).

2.2.3. Oositlerin Taranması ve Değerlendirilmesi

Petrilere aktarılan sıvılar "Z" harfi çizerek stereo mikroskopta (Olympus, SZX16) tarandı. Toplanan oositler, 35 mm'lik petrilerdeki yıkama sıvısına (BO-WASH) aktarıldı. Her petri kabı en az 2 kez olacak şekilde tarandı (Şekil 2.3). Yıkama sıvısına toplanan oositlerin kalite değerlendirilmesi yapılıp, sınıflandırılması A, B, C ve D olacak şekilde 4 gruba ayrıldı (Chauhan ve ark 1999, Silvestri ve ark 2021, Al-Shammari ve Almeeni 2022).

Toplanan oositlerin kalite sınıflandırılması yapıldıktan sonra sadece A kalitedeki oositler IVM medyumuna koyulurken, B, C ve D sınıfı oositlerin sayıları kayıt altına alındı



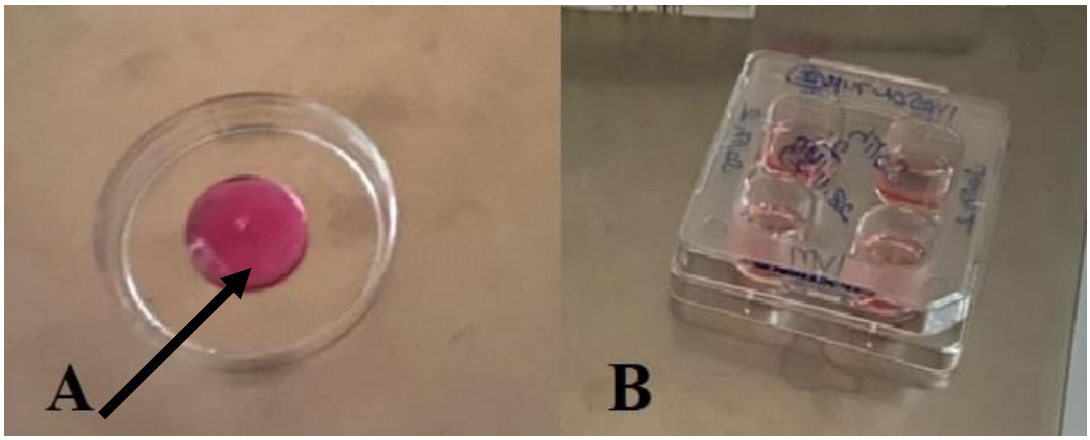
Şekil 2.3. A: Aspire edilen folikül sıvılarından oositin taraması ve toplanması **B:** Toplanan oositlerin kontrolleri ve yıkanması (S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.B.D. IVF laboratuvarı).

2.2.4. Oositlerin *İn Vitro* Maturasyonu (IVM)

Maturasyon işlemi öncesinde, oositler aspire edilmeden BO-IVM medyumu ve 4-Well dish'in her kuyucuğa 0,5 mL eklenen BO-IVM minimum 2 saat kadar 38,5˚C'de ve %5,5 CO_2'de inkübatörde ekilibrasyona bırakıldı.

Toplanan A kalite KOK'lar numaralandırılmış olan petri yıkama medyumlarından sırasıyla geçirildi. Daha sonra 35 mm'lik petriye hazırlanmış olan BO-IVM yıkama medyumuna aktarıldı. Son işlem olarak ise sayısı belirlenen oositler maksimum 45 adet olacak şekilde 4-Well dish'in kuyucuklarına aktarıldı. 38,5˚C ve %5,5 CO_2'de 22-24 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 2.4).

Oositlerin IVM işlemi tamamlandıktan sonra maturasyonlar değerlendirildi. IVM işlemi sonunda oositlerin kumulus ekspansiyonuna (Grade I-II-III) göre değerlendirilmesi yapıldı ve kayıt altına alındı. Grade-I KOK'larınekspansiyon oranı az,geldiğini,Grade-II KOK'larınkumulus ekspansiyonun orta ,Grade-III KOK'ların ise, kumulusların tam veya tamamına yakınının genişlediği ve kumulus hücrelerinin homojen olarak açılması şeklindedir(Kobayashi ve ark 1994, Zhang ve ark 2010, Machado ve ark 2015, Bicici ve ark 2023).



Şekil 2.4. A: BO-Wash ile yıkanmış oositler **B:** Maturasyon medyumu ilaveli 4-Well dish'e aktarılan oositler (S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.B.D. IVF laboratuvarı).

2.2.5. Spermanın Hazırlanması ve *İn vitro* Fertilizasyon

Fertilizasyon günü, IVF işlemine geçilmeden önce fertilizasyon medyumu (4 Well dish kuyucuklarına 0,4 mL konularak) ve BO-SEMENPREP (2 adet santiüj tüpüne 2'şer mL) ekilibrasyon işlemi için 38,5˚C ve %5,5 CO_2'de 2 saat önceden inkübasyona bırakıldı.

İn vitro maturasyon işlemi tamamlanan oositler inkübatörden çıkarıldı. Daha sonra KOK'lar maturasyon medyumundan, in vitro fertilizasyon medyumuna (35 mm petri, BO-IVF) aktarıldı 3 kez yıkandı ve 4 Well dishe aktarılarak sperma hazırlanana kadar inkübatöre kaldırıldı.

Spermanın Hazırlanması

37-38˚C'lik su banyosunda 30 saniyede 2 adet payet çözdürüldü. Çözdürülen payetler 15 mL'lik ilk santrifüj tüpüne aktarıldı ve 328xG'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası üst kısımda yer alan süpernatant kısmı atıldı. Tüpün üzerine tekrar 2 mL sperma hazırlama medyumu eklenerek 328xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Son kez süpernatant atıldı ve fertilizasyon ortamına taşınmış mature oositler üzerine 40 µL (her bir kuyucuğa ortalama $2x10^6$ motil spermatoozon) ilave edildi. Ayrıca sperma kuyucuklara eklenmeden önce subjektif olarak motilite muayenesi yapıldı. Sperma eklendikten sonra 4 Well dish'ler 38,5˚C ve %5,5 CO_2'de 12-18 saat inkübasyona bırakıldı.

2.2.6. Embriyoların *İn vitro* Kültürü (IVC)

Çalışma gruplarının oluşturulması

İn vitro kültür aşamasında gruplar 7'ye ayrıldı.

Kontrol grubu: Bu grupta yer alan muhtemel zigotlar *in vitro* kültüre alınmadan önce kültür medyumuna herhangi bir ilave uygulanmadı.

Likopen 0,2 µM grubu (Lik0.2): Bu grupta yer alan muhtemel zigotlar *in vitro* kültüre alınmadan önce kültür medyumuna 0,2 µM likopen ilave edildi.

Likopen 0,4 µM grubu (Lik0.4): Zigotların aktarıldığı kültür ortamına 0,4 µM likopen ilave edildi.

Askorbik asit 2 mM grubu (AA2): Zigotların aktarıldığı kültür ortamına 2 mM askorbik asit ilave edildi.

Askorbik asit 4 mM grubu (AA4): Zigotların aktarıldığı kültür ortamına 4 mM askorbik asit ilave edildi.

Likopen 0,2 µM ve Askorbik asit 2 mM kombinasyon grubu (Lik0.2+AA2): Zigotların aktarıldığı kültür ortamına 0,2 µM likopen ve 2 mM askorbik asit ilave edildi.

Likopen 0,4 µM ve Askorbik asit 4 mM kombinasyon grubu (Lik0.4+AA4): Zigotların aktarıldığı kültür ortamına 0,4 µM likopen ve 4 mM askorbik asit ilave edildi. Hazırlanan 4 Well dishler kültür öncesi bir gece 38,8°C ve %5,5-6,5 CO_2'de ekilibrasyona bırakıldı.*İn vitro* fertilizasyon işlemi sonrası 4 Well dish'te yer alan kuyucuklar inverted mikroskopta (Olympus IX71) incelendi. Muhtemel zigotların etrafındaki kumulus hücrelerini temizlemek için oositler kuyucuklardan toplanarak 2 saat öncesinde ekilibre edilmiş 1 mL BO-WASH eppendorf tüpüne aktarıldı ve 2 dakika boyunca oositler vortekslendi. Daha sonra içerisinde 2 mL *in vitro* kültür vasatı (BO-IVC) bulunan 35 mm'lik petriye alındı. Elde edilen muhtemel zigotlar, kültür medyumuna aktarılmadan önce rastgele 7 gruba ayrıldı ve bir gece önceden hazırlanmış olan 4 kuyucuklu petrilere (BO-IVC + farklı ve kombine dozlarda likopen ve askorbik asit ilave edilmiş ve üzerine BO-OIL kaplanmış) alındı. 38,5ºC, %6 CO_2,

%6 O_2 ve %88 N_2) inkibatöre 6-8 gün süreyle inkübasyona bırakıldı (Bicici ve ark 2023) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. IVF işlemi sonrası zigotların toplanması S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D. IVF laboratuvarı).

2.2.7. *İn Vitro* Kültür Sonrası Embriyoların Değerlendirilmesi

Kültür sonrası elde edilen embriyolar IETS2NİN belirlediği kriterlere göre değerlendirildi (Bó ve Mapletoft 2018). Bu kriter göz önünde bulundurularak embriyo kaliteleri ve embriyo gelişim aşamaları kayıt altına alındı. Elde edilen yapılar incelendiğinde, gelişim aşamalarına göre; tek hücre, 2-12 hücre, erken morula, morula, erken blastosist, blastosist, genişlemiş (expanded) blastosist, hatched blastosist, expanded hatchedblastosist olarak sınıflandırıldı.

2.2.8. Embriyoların Tunel Kiti ile Boyanması ve Hücre Sayılarının Belirlenmesi

İn vitro kültür sonrası embriyoların gelişim aşamaları belirlendikten sonra sadece blastosist aşamasındaki embriyolar Tunel boyama yöntemi kullanarak boyandı (E-CK-A320, One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit, Elabscience, USA). Her gruptan en az 10'ar blastosist çalışma için kullanıldı. *İn vitro* kültür ortamından ayrılan

ve gelişim aşamaları belirlenen embriyolar, öncelikle 3 kez PBS-Polivinil Prolidon (PVP) solüsyonunda yıkandıktan sonra, %4 paraformaldehit içeren solüsyonda oda sıcaklığında 20 dakika fikse edildi. Bu işlemin ardından embriyolar tekrar 3 kez PBS-PVP solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra, permeabilizasyon işlemi için %2 Triton X içeren solüsyonda oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi ve tekrar 3 kez PBS-PVP solüsyonu ile yıkama gerçekleştirildi. Ardından embriyolar, 38,8°C sıcaklıkta ve %5,5-6,5 CO_2 seviyesinde inkübatörde 20 dakika buffer solüsyonunda bekletildi. Bu aşamadan sonra embriyolar yıkanmadan doğrudan TUNEL reaksiyon karışımına alındı ve aynı inkübasyon koşullarında 1 saat bekletildi. İşlem tamamlandıktan sonra embriyolar üç-dört kez PBS-PVP solüsyonu ile yıkanarak DAPI solüsyonunda oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra, tekrar 3-4 kez PBS-PVP solüsyonu ile yıkama yapılarak embriyolar, polilizin kaplı lam üzerine yerleştirilen gliserole aktarıldı ve üzeri lamel ile kapatıldı. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra embriyolar, lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak incelendi ve elde edilen görüntüler kaydedildi (Şekil 2.6). Hücre sayımlarının yapılması aşamasında, "Apoptotik İndeks (AI) = Apoptozis gösteren hücre sayısı (ACN) / Toplam hücre sayısı (TCN) x 100" formülü kullanılarak hesaplamalar gerçekleştirildi.



Şekil 2.6. Çalışmada kullanılan konfokal mikroskop ve blastosistin taranması anında çekilen görüntü (LSM 900/Zeiss, Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü).

2.2.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPPS 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanılarak değerlendirildi. Üç ve daha fazla grup ortalamaların karşılaştırmaları için varyans analizi kullanıldı (ANOVA). Değişkenlerin öncelikle Shapiro wilk ve Levene testi ile normallik ve homojenlik varsayımlarını sağlayıp sağlamadığı kontrol edildi. Kategorik veriler Ki Kare testi ile analiz edildi. Testlerin anlamlılık düzeyi için $P<0,05$ ve $P<0,01$ değerleri kullanıldı. Verilerin gösterimi ve figürlerin hazırlanmasında GraphPad Prism 9.5.0 (GraphPad Software, La Jolla, Boston MA) programı kullanıldı. Çalışmada elde edilen kategorik veriler "%" ile sayısal veriler ortalama±standart sapma şeklinde ifade edildi.

3. BULGULAR

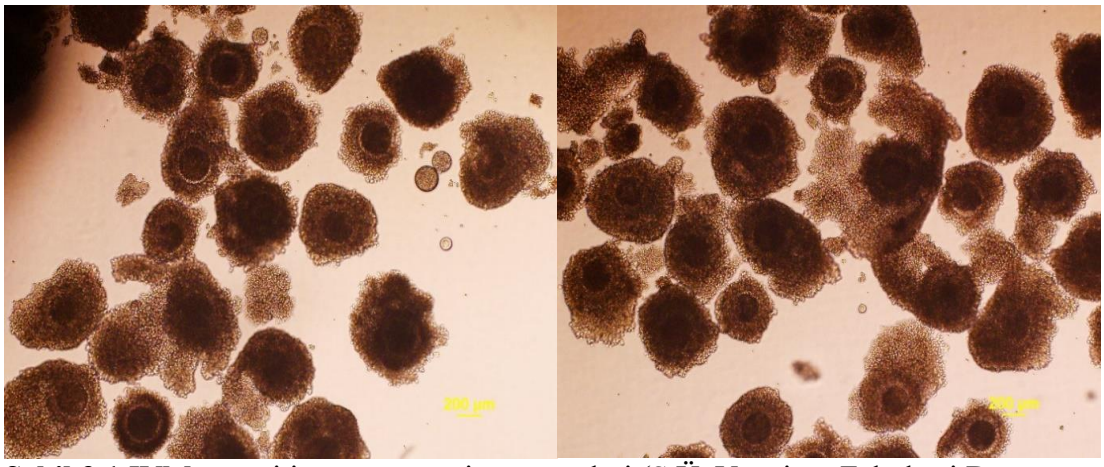
Sunulan çalışmada mezbahaneden uygun koşullar altında 466 adet ovaryum getirildi. Aspirasyon öncesi ön kontrolü yapılan ovaryumlardan 42 tanesi inaktif, kistik ve bağ doku yapışmaları olması nedeniyle çalışmaya dahil edilmedi. Kalan 424 adet ovaryum üzerinde bulunan 2-8 mm çapındaki foliküller aspire edilerek oositler toplandı. Aspire edilen oositlerin sınıflandırılması yapılarak sadece A kalite oositler çalışmada kullanıldı. Aspire edilen oositlerin sınıflandırma verisi Tablo 3.1'de sunuldu.

Tablo 3.1. Aspire edilen oositlerin kalite ve ovaryum başına oosit düşen sayısı

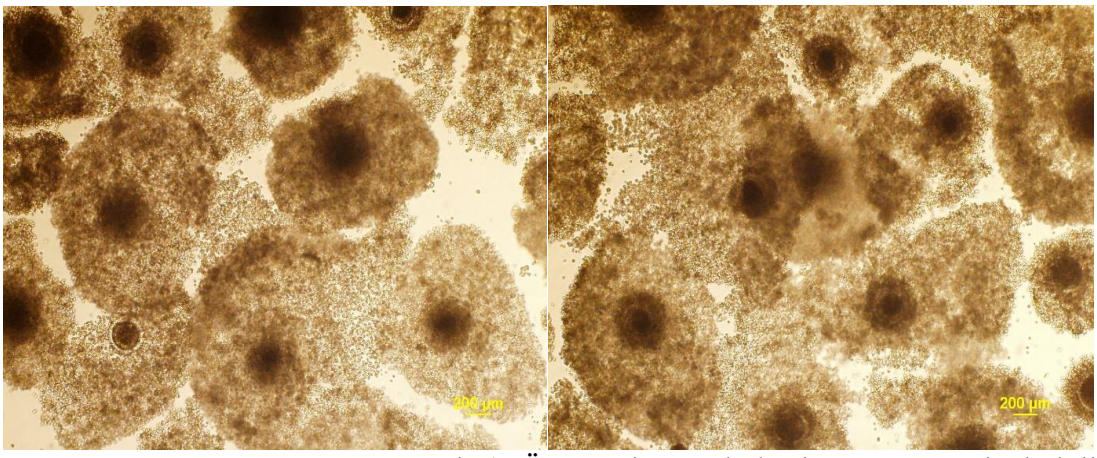
Uygulama	Ovaryum sayısı	Oosit kaliteleri				Toplam
		A	B	C	D	
1. Uygulama	53	132	96	78	38	344
2. Uygulama	51	118	75	55	48	296
3. Uygulama	54	119	90	42	36	287
4. Uygulama	52	132	91	65	51	339
5. Uygulama	54	143	82	47	46	318
6. Uygulama	41	108	78	42	35	263
7. Uygulama	39	100	86	37	40	263
8. Uygulama	33	82	38	43	33	196
9. Uygulama	47	116	71	48	34	269
Toplam	**424**	**1050**	707	457	361	2575

3.1. *İn Vitro* Maturasyon Bulguları

Maturasyon için 1050 adet A kalite oosit kullanıldı (Şekil 3.1). Toplam 958 oositte maturasyon gözlendi (Şekil 3.2). Doksan iki adet oositin mature olmadığı veya dejenere olduğu belirlendi. Maturasyona alınan oosit sayısı, mature olan oosit sayısı, maturasyon yüzdesi ve mature olmayan veya dejenere oosit sayıları ile yüzdesi Tablo 3.2'de sunuldu. Maturasyona alınan oositler ile maturasyon oranları arasında istatistiksel farklılık olmadığı belirlendi ($P>0,05$).



Şekil 3.1 IVM öncesi immature oosit görüntüleri (S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.B.D. IVF laboratuvarı).

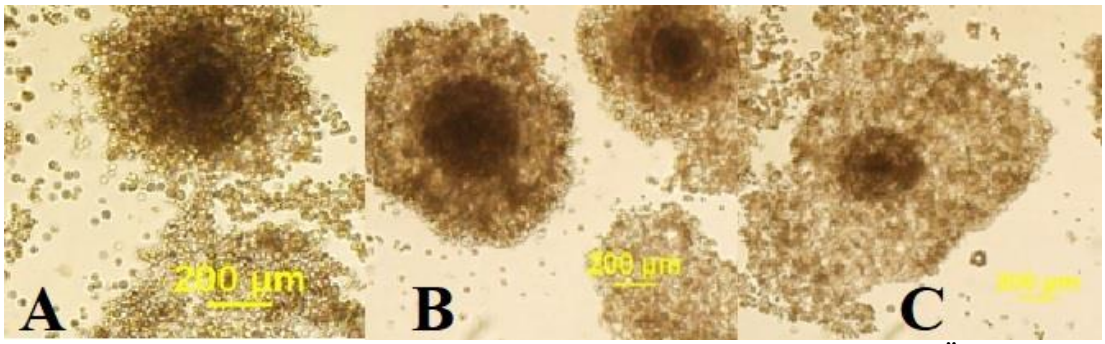


Şekil 3.2 IVM sonrası mature oosit (S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.B.D. IVF laboratuvarı).

Tablo 3.2. Maturasyona alına oosit sayısı, mature olan oosit sayısı ve oranları, immature oosit sayısı ve oranları

Uygulama	Maturasyona alınan oosit sayısı	Mature oosit sayısı (%)	İmmature oosit veya dejenere oosit sayısı (%)
1	132	122	10 (92,42)
2	118	108	10 (91,52)
3	119	108	11(90,75)
4	132	121	11 (91,66)
5	143	131	12 (91,60)
6	108	99	9 (91,66)
7	100	90	10 (90,00)
8	82	73	9 (89,02)
9	116	106	10 (91,37)
Toplam	1050	958 (91,24)	92 (8,76)

Mature olmuş oositlerin kumulus ekspansiyon değerlendirilmeleri Tablo 3.3'te gösterildi. Kumulus ekspansiyonları Grade I, Grade II ve Grade III olarak derecelendirildi (Şekil 3.3).



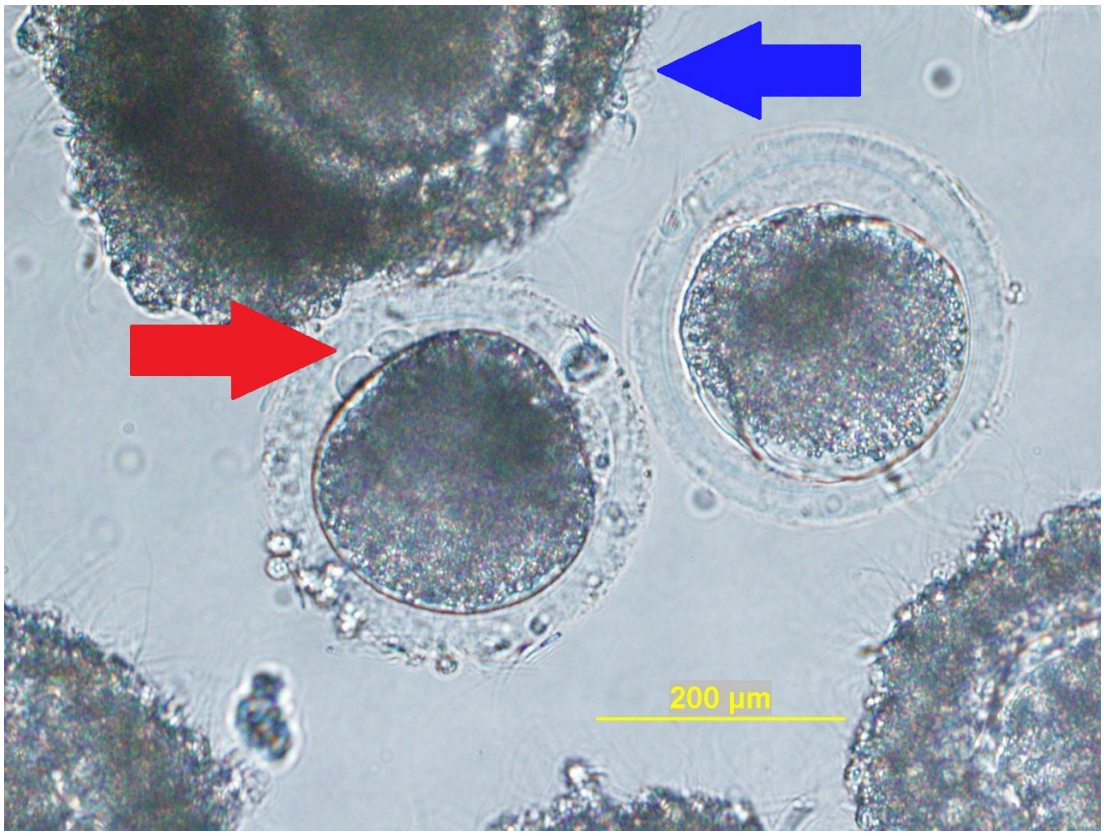
Şekil 3.3. A: Grade I oosit **B:** Grade II oosit **C:** Grade III oosit (S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.B.D. IVF laboratuvarı).

Tablo 3.3. Kumulus ekspansiyonlarının sınıflandırılması

Uygulama	Mature oosit	Grade I oosit (%)	Grade II oosit (%)	Grade III oosit (%)
1	122	15 (12,29)	25 (20,49)	82 (67,21)
2	108	13 (12,03)	25 (23,14)	70 (64,81)
3	108	13 (12,03)	23 (21,29)	72 (66,66)
4	121	16 (13,22)	24 (19,83)	81 (66,94)
5	131	16 (12,21)	24 (18,32)	91 (69,46)
6	99	14 (14,14)	22 (22,22)	63 (63,63)
7	90	12 (13,33)	19 (21,11)	59 (65,55)
8	73	10 (13,69)	17 (23,28)	46 (63,01)
9	106	15 (14,15)	24 (22,64)	67 (63,20)
Toplam	**958**	**126 (13.15)**	**203 (21,19)**	**629 (65,66)**

3.2. *İn Vitro* Fertilizasyon Bulguları

İn vitro fertilizasyon işlemine tabii tutulan 958 mature oositin kültür sonrası 757'sinde bölünme gerçekleştiği 201'inde ise fertilizasyon belirtisi görülmediği belirlendi. Fertilizasyonun varlığı vitellin membran içerisinde spermatozoon kuyruklarının varlığı ve ikinci kutup cisimciğinin görülmesi ile belirlendi (Şekil 3.4). *İn vitro* kültür işlemi sonrası fertilizasyon şekillenen oositlerin sayısı ve oranları Tablo 3.4'te gösterildi. Fertilizasyon işlemi sonrası maturasyona bırakılan bütün oositler kültür medyumuna aktarıldı. Uygulama gruplarında, IVC öncesi, fertilizasyon oranları açısından gruplar arasında istatistiki olarak farklılık tespit edilmedi (P>0,05).



Şekil 3.4. Fertilizasyon sonrası ikinci kutup cisimciği (Kırmızı ok) ve spermatozoon varlığı (Mavi ok) S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.B.D. IVF laboratuvarı).

Tablo 3.4. IVC sonrası fertilizasyon sayıları ve oranları

	Mature oosit	**Bölünme gösteren oosit sayısı (%)**	**Bölünme göstermeyen oosit sayısı (UFO) (%)**
1	122	98 (80,32)	24 (19,68)
2	108	86 (79,63)	22 (20,37)
3	108	87 (80,56)	21 (19,44)
4	121	96 (79,33)	25 (20,67)
5	131	106 (80,92)	25 (19,08)
6	99	78 (78,78)	21 (21,22)
7	90	69 (76,66)	21 (23,34)
8	73	57 (78,08)	16 (21,92)
9	106	82 (77,36)	24 (22,64)
Toplam	**958**	**757 (79,01)**	**201 (20,99)**

3.3. *İn Vitro* Kültür Bulguları

Sunulan tez çalışmasında, likopen ve askorbik asidin yer aldığı kombine gruplardaki (Lik0.2+AA2 ve Lik0.4+AA4) blastosist oranı, askorbik asidin düşük (AA2) ve yüksek (AA4) dozları dışında kalan tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (P<0,01). Blastosist oranları incelendiğinde

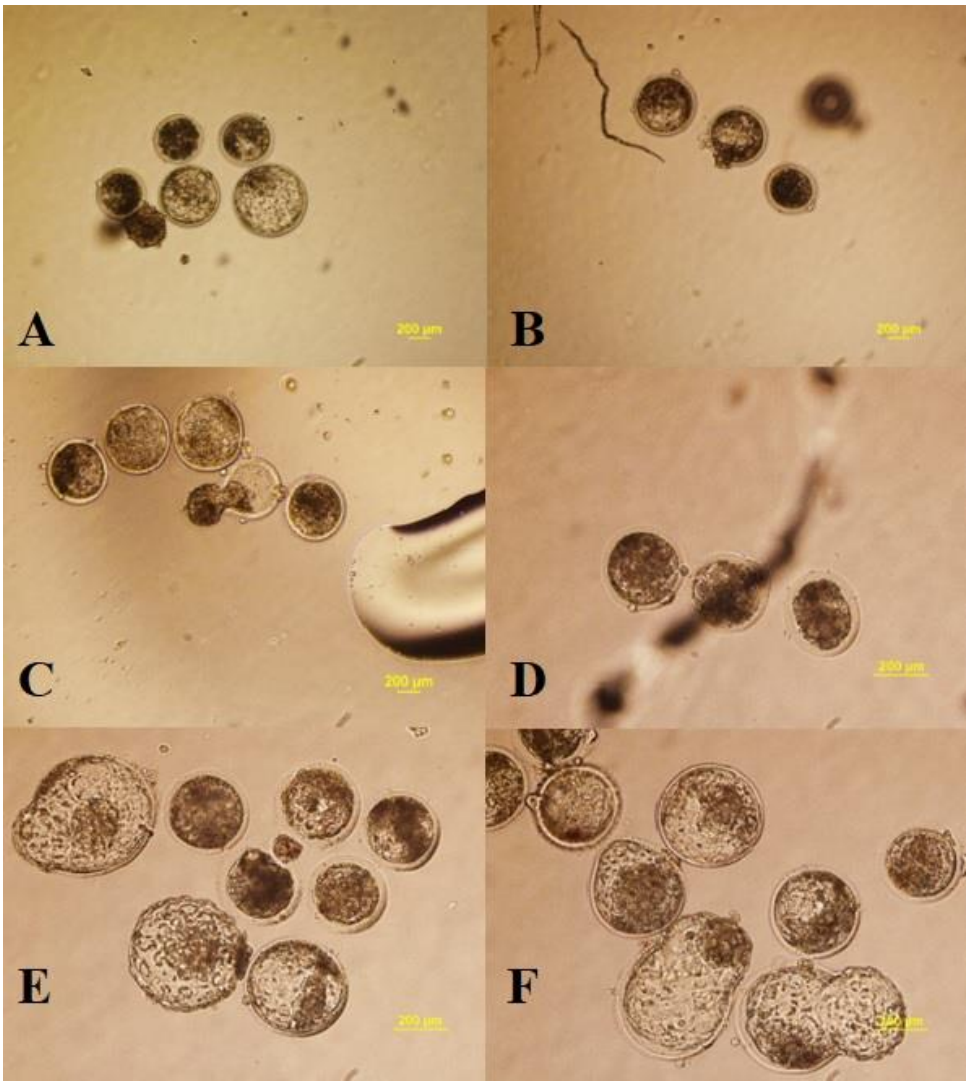
AA4, Lik0.2+AA2 ve Lik0.4+AA4 gruplarının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde daha yüksek oran gösterdiği tespit edildi (P<0,05). AA4 grubunun sadece kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek oranda blastosist verdiği belirlendi (P<0,05). AA2 grubu, diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı belirlendi (P>0,05). Lik0.2, Lik0.4, AA2 ve AA4 grupları arasında istatistiksel olarak farklılık görülmedi (P>0,05). Kontrol grubu ile likopen grubunun düşük (Lik0.2) ve yüksek (Lik0.4) dozlarını içeren gruplar arasında blastosist ve blastosiste ulaşma oranları açısından istatistiki olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı (P>0,05).

Likopen ve askorbik asit kombine gruplarının blastosiste ulaşma oranlarının, AA2 ve AA4 grupları hariç diğer gruplara kıyasla daha yüksek olduğu istatistiki olarak tespit edildi. (P<0,01). AA2 grubu ile kontrol grubu arasında blastosiste ulaşma oranları açsısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (P<0,05). AA4 grubu ile diğer gruplar arasında blastosiste ulaşma oranları açısından herhangi bir istatistiksel farklılık olmadığı belirlendi. (P>0,05) Lik0.2, Lik0.4, AA2 ve AA4 grupları arasında blastosist ve blastosiste ulaşma oranları açısından istatistiki olarak farklılık belirlenmedi (P>0,05). (Tablo 3.5). Deney gruplarına ilişkin blastosist aşamasındaki resimler Şekil 3.5'te gösterildi.

Tablo 3.5. Deney ve kontrol grubundaki blastosist sayısı, blastosist ve blastosiste ulaşma oranları

Grup	Maturasyona alınan oosit sayısı	Kültüre alınan oosit sayısı	Blastosist sayısı	Blastosist oranı	Blastosiste ulaşma oranı
Kontrol	151	137	29	21,16[a] (29/137)	19,20[a] (29/151)
Lik0.2	150	136	31	22,79[ab] (31/136)	20,66[ab] (31/150)
Lik0.4	153	140	31	22,14[ab] (31/140)	20,26[ab] (31/153)
AA2	145	133	42	31,57 [abc] (42/133)	28,96[bc] (42/145)
AA4	142	129	41	31,78[bc] (41/129)	28,87[abc] (41/142)
Lik0.2+AA2	156	142	60	42,25[c] (60/142)	38,46[c] (60/156)
Lik0.4+AA4	153	141	55	39,00[c] (55/141)	35,94[c] (55/153)
Toplam	**1050**	**958**	**289**	**30,16 (289/958)**	**27,52 (289/1050)**

[a-b-c]: Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir (P<0,05).



Şekil 3.5. A: Lik0.2 grubuna ait embriyolar, **B:** Lik0.4 grubuna ait embriyolar, **C:** AA2 grubuna ait embriyolar, **D:** AA4 grubuna ait embriyolar, **E:** Lik0.2+AA2 grubuna ait embriyolar, **F:** Lik0.4+AA4 grubuna ait embriyolar (S.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.B.D. IVF laboratuvarı).

Antioksidanların embriyolar üzerindeki etkisini görmek ve değerlendirmek amacıyla, kontrol ve deney gruplarından elde edilen blastosistler TUNEL assay kiti ile boyanarak hücre sayıları (TE, ICM ve TCN, ACN ve AI) belirlenerek Tablo 3.6'da gösterildi (Şekil 3.6, 3.7, 3.8).

Lik0.2+AA2 grubunun toplam hücre sayısının, Kontrol, Lik0.2, Lik0.4 ve AA4 gruplarına göre istatistiki açıdan önemli oranda daha fazla olduğu belirlendi ($P<0,05$). Lik0.4+AA4 grubunun toplam hücre sayısı, Kontrol, Lik0.2 ve Lik0.4 gruplarının toplam hücre sayılarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı ($P<0,05$). AA2, AA4 ve Lik0.4+AA4 grupları arasında toplam hücre sayısı açısından istatistiki açıdan farklılık olmadığı tespit edildi ($P>0,05$). Aynı şekilde AA2, Lik0.2+AA2 ve

Lik0.4+AA4 grupları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık olmadığı belirlendi (P>0,05). Son olarak Kontrol, Lik0.2, Lik0.4, AA2 ve AA4 grupları arasında toplam hücre sayıları açısından herhangi bir farklılık saptanmadı (P>0,05).

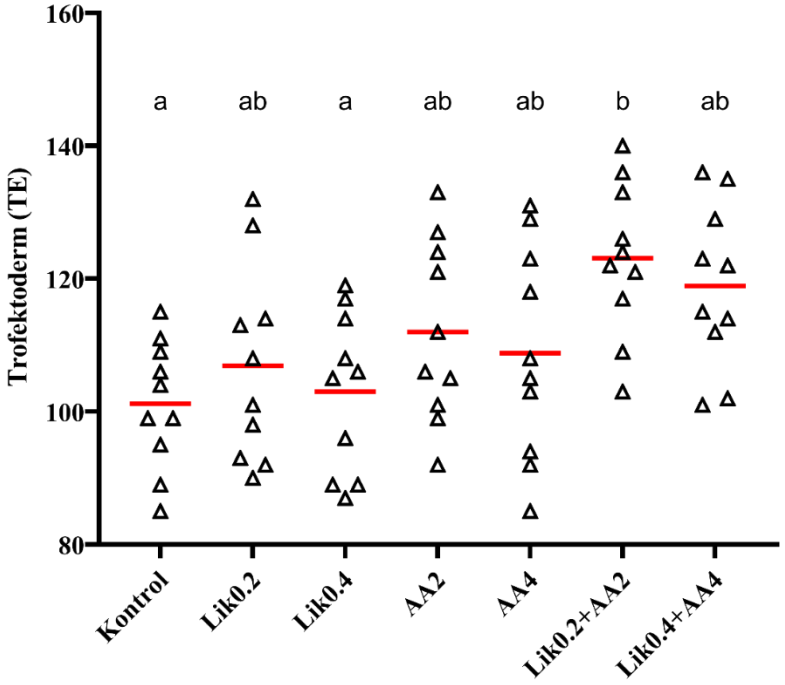
Lik0.2+AA2 ve Lik0.4+AA4 gruplarının ICM sayılarının, Kontrol, Lik0.2 ve Lik0.4 gruplarına göre istatistiksel olarak önemli ölçüde fazla olduğu belirlendi (P<0,01). AA2 ve AA4 gruplarının ICM sayılarının, diğer gruplara göre istatistiksel olarak farklılık göstermediği saptandı (P>0,05).

Lik0.2+AA2 ve Lik0.4+AA4 gruplarından elde edilen TE hücreleri sayıların Kontrol, Lik0.2 ve Lik0.4 gruplarından önemli ölçüde fazla olduğu belirlendi (P<0,05). AA2 ve AA4 gruplarından elde edilen TE hücreleri sayıları ile diğer gruplardan elde edilen TE hücre sayıları arasında herhangi bir farklılık belirlenmedi (P>0,05).

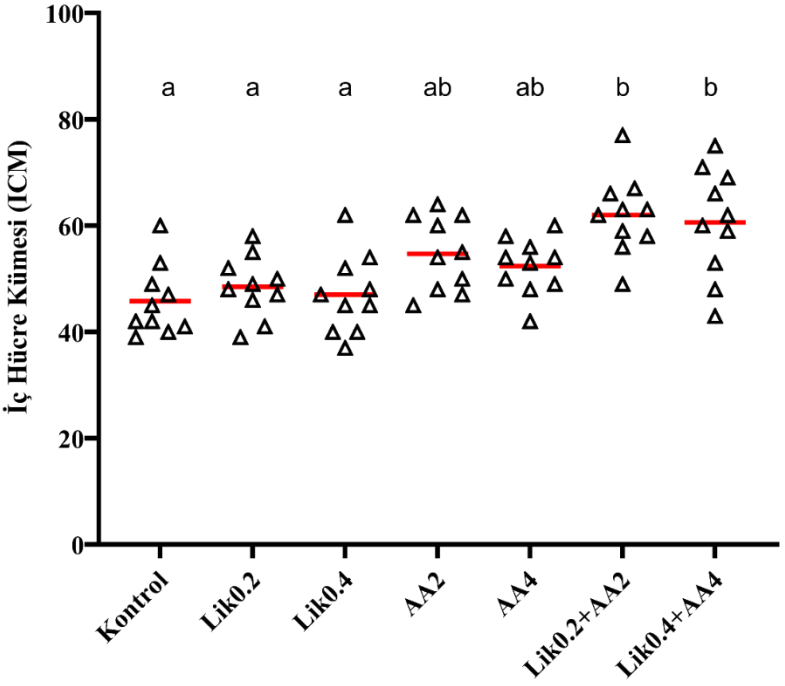
Tablo 3.6. Kontrol ve deney gruplarında ICM, TE, TCN sayıları (Mean±SD)

Grup	ICM	TE	TCN	ICM/TCN	ICM/TE
Kontrol	45,8 ± 6,64^{a}	101,2 ± 9,64^{a}	147 ± 13,9^{a}	0,31	0,45
Lik0.2	48,5 ± 5,79^{a}	106,9 ± 14,83^{a}	155,4 ± 16,62^{a}	0,31	0,45
Lik0.4	47 ± 7,49^{a}	103 ± 12,06^{a}	150 ± 15^{a}	0,31	0,45
AA2	54,7 ± 7^{ab}	112 ± 13,61^{ab}	166,7 ± 17,56^{abc}	0,32	0,48
AA4	52,4 ± 5,29^{ab}	108,8 ± 16^{ab}	161,2 ± 16,8^{ab}	0,32	0,48
Lik0.2+AA2	62 ± 7,43^{b}	123,1 ± 11,57^{b}	185,1 ± 13,85^{c}	0,33	0,50
Lik0.4+AA4	60,6 ± 10,25^{b}	118,9 ± 12,35^{b}	179,5 ± 17,84^{bc}	0,34	0,51

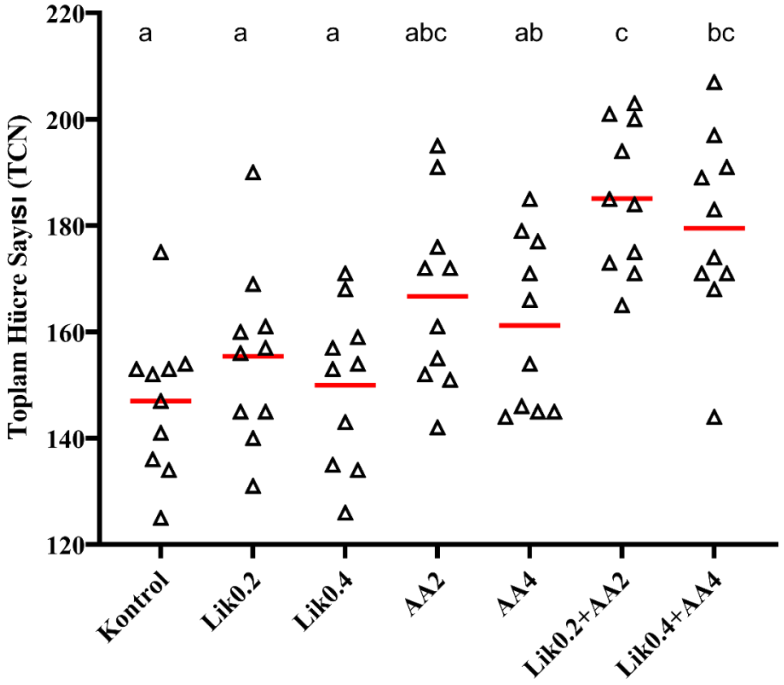
$^{a\text{-}b\text{-}c}$: Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir (P<0,05).



Şekil 3.6. Kontrol ve çalışma gruplarının trofektoderm (TE) sayılarına ilişkin grafik.



Şekil 3.7. Kontrol ve çalışma gruplarının iç hücre kümesi (ICM) sayılarına ilişkin grafik.



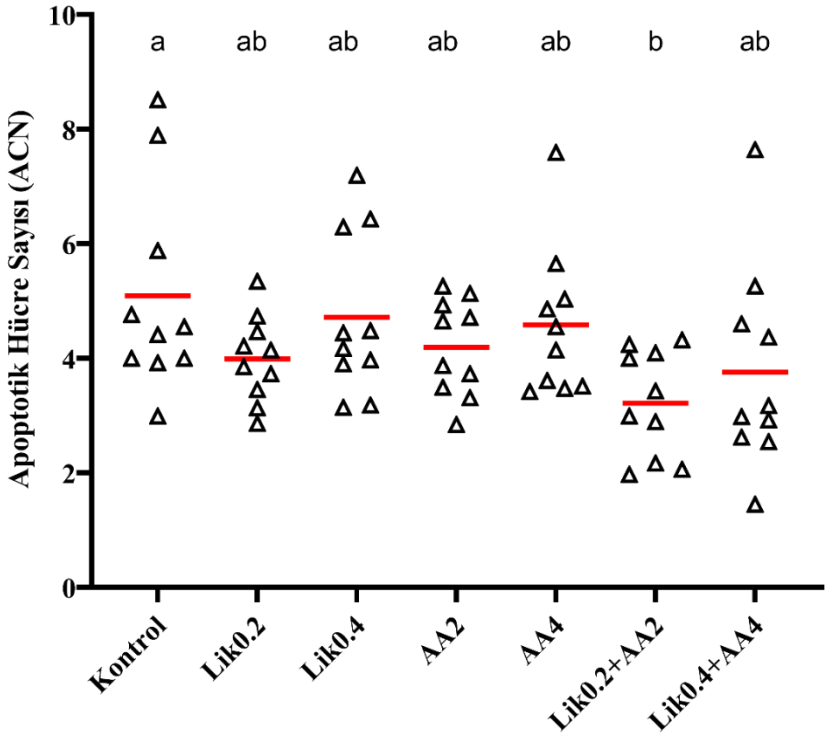
Şekil 3.8. Kontrol ve çalışma gruplarının toplam hücre sayılarına (TCN) ilişkin grafik.

Antioksidanların anti-apoptotik etkisini görmek ve değerlendirmek amacıyla, gelişen embriyoların ACN ve AI belirlemek için TUNEL assay kiti kullanıldı. Floresan boyama sonrası apoptozis açısından, Lik0.2+AA2 grubunda hem sayının hem de apoptotik indeks oranının diğer gruplara göre istatistiksel açıdan önemli ölçüde daha düşük olduğu belirlendi (P<0,05) (Tablo 3.7) (Şekil 3.9, 3.10).

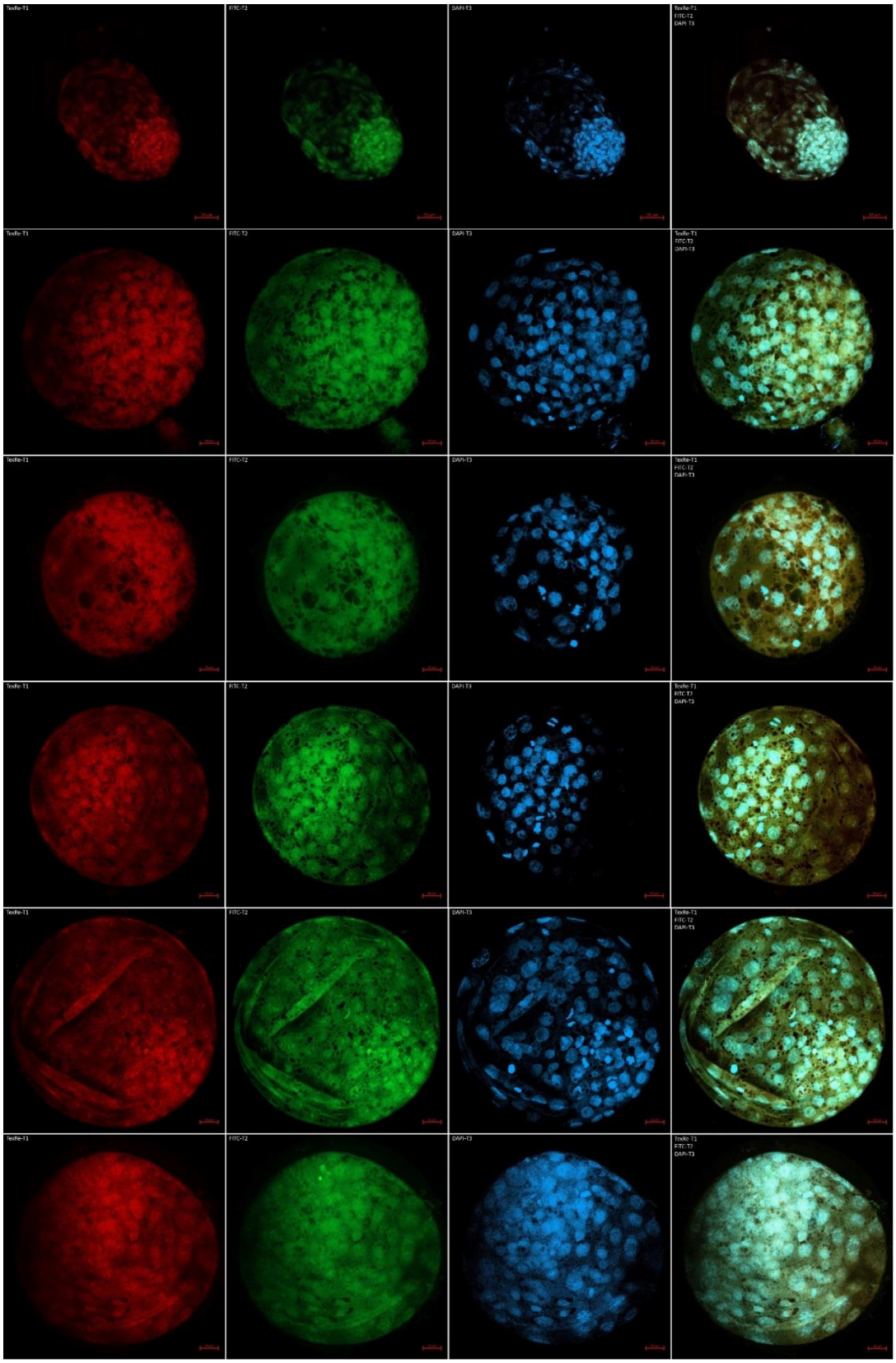
Tablo 3.7. Kontrol ve deney gruplarında apoptozis görülen hücre sayıları ve apoptotik indeks değişimine ilişkin bilgiler (Mean±SD)

Grup	ACN	TCN	AI (%)
Kontrol	7,5± 2,71^{a}	147 ± 13,9^{a}	%5,1
Lik0.2	6,2 ± 1,31^{ab}	155,4 ± 16,62^{a}	%3,98
Lik0.4	7,5± 2,32^{ab}	150 ± 15^{a}	%5
AA2	7 ± 1,7^{ab}	166,7 ± 17,56^{abc}	%4,19
AA4	7,4 ± 2,17^{ab}	161,2 ± 16,8^{ab}	%4,59
Lik0.2+AA2	5,9 ± 1,59^{b}	185,1 ± 13,85^{c}	%3,18
Lik0.4+AA4	6,5 ± 2,41^{ab}	179,5 ± 17,84^{bc}	%3,62

$^{a\text{-}b\text{-}c}$: Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir (P<0,05).



Şekil 3.9. Apoptotik hücre sayılarının kontrol ve antioksidan gruplarına göre dağılımını gösteren grafik



Şekil 3.10. TUNEL boyama ile boyanan blastosistin konfokal mikroskop görüntüsü (kırmızı: TEXAS RED, yeşil: FITC, mavi: DAPI, açık kahve: MERGE).

4. TARTIŞMA

Son yıllarda dünyada fertilite parametreleri artırmak üzere yardımcı üreme teknolojileri sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle hayvansal gıda üretimi için, üstün verimli sığırların çoğaltılmasını sağlamak amacıyla çiftlik hayvanları yaygın olarak kullanılmaktadır. Yardımcı üreme teknikleri özellikle IVEP hayvan ıslahı amacıyla yoğun bir şekilde tercih edilmektedir. Memeli embriyolarının *in vitro* koşullarda gelişiminin sağlanması ve dondurularak saklanması üzerine reprodüktif biyoteknoloji alanında çalışmalar hız kesmeden devam etmektedir. Embriyo üretiminde *in vitro* kültür sistemleri ve farklı medyumlar geliştirilmiş olup %30 ve üzeri oranda embriyo elde edilebilmektedir. Embriyo üretimini artırmak ve desteklemek amacıyla *in vitro* ortamlara kimi katkı maddeleri eklenmektedir. Bu uygulamaların başında ise *in vitro* kültür ortamına antioksidan ilaveleri başta gelmektedir. Kültür ortamına antioksidan eklenmesinin amacı, embriyo gelişimi sırasında meydana gelen enzimatik ve metabolik reaksiyonların oluşturduğu serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresi azaltmak veya ortadan kaldırmaktır (Dalvit ve ark 2005).

Sunulan tez çalışmasında *in vitro* kültür ortamına antioksidan özellikleri bilenen likopen ve askorbik asidin farklı dozları ve kombine dozları ilave edilerek blastosist gelişimi/kalitesi ve apoptozisin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen oositin kalitesini yaş, seksüel siklus dönemi, beslenme durumu, genetik,sıcaklık stresi ve reprodüktif hastalıklar vb. faktörler etkilemektedir. Ayrıca yaz aylarında toplanan oositler, özellikle sıcaklık stresine bağlı olarak olumsuz yönde etkilenebilmektedir. Yüksek sıcaklıklara maruz kalan sığırlarda, oositin hücresel fonksiyonlarında bozulma, DNA hasarı ve organel işleyişinde aksaklıklar meydana gelebilmektedir. Bu durum, oositin olgunlaşma sürecini, fertilizasyon potansiyelini ve sonuç olarak embriyo gelişimini olumsuz etkilemektedir (Maya-Soriano ve ark 2013, Diaz ve ark 2021, Çizmeci ve ark 2022).

İn vitro embriyo elde edilmesinin ilk basamağı ovaryumlardan oositlerin teldesidir. Oositlerin eldesi için en çok tercih edilen yöntemlerden birisi aspirasyon yöntemidir. Aspirasyon yöntemi diğer yöntemlere kıyasla daha kolay ve hızlı uygulanabilir bir metot olması nedeniyle çok fazla tercih edilmektedir (Saleh 2017, Udin ve ark 2020). (Habeeb ve Hussain 2018). Yapılan çalışmalarda aspirasyon yöntemini kullanılarak ovaryum başına 5-8 adet oosit elde edildiği bildirilmektedir

(Fry ve ark 1997, Saleh 1997, Fry ve ark 1998). Walters ve ark (2002), ovaryum başına ortalama 13,9 adet oosit elde ettiklerini ve ortalama olarak 6,8 oositin kullanılabilir kalitede (A, B kalite) olduğunu bildirmişlerdir. Ahmed ve ark (2015), her ovaryum başına 3,54 oosit elde ettiklerini ve bunların %65,79'unun iyi kalitede olduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise maturasyon başarısını değerlendirmek için aspire edilen oositlerin kaliteleri değerlendirilmiş ve %66,39 oranında kaliteli oosit elde edildiği bildirilmiştir (Korkmaz ve ark 2013).

Yürütülen tez çalışmasında mezbahaneden getirilen 424 ovaryumdaki 2-8 mm çapındaki foliküllerden 2575 oosit elde edildi. Ovaryum başına elde edilen oosit sayısı 6,07 olarak belirlendi. Elde edilen oositlerin 4,14'ü (%69,03) A ve B kalite olarak tespit edildi. Çalışmalarda foliküllerden elde edilen oosit/ovaryum oranı ile yürütülen tez çalışmasında elde edilen oosit oranları benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmalar arasında sayısal olarak farklılıkların gözlenmesinin nedeni olarak aspirasyon yapan kişinin tecrübesi, hayvan materyali kaynağının faklı olması, çalışılan mevsim ve laboratuvar ortamlarının farklılıklarından kaynaklı olabileceği düşünüldü.

İn vitro embriyo üretiminin en temel ve önemli basamaklarından biri maturasyon evresidir. İnsanlarda, *in vitro* embriyo üretiminde genellikle metafaz II evresinde olan oositler toplanmakta ve fertilizasyon işlemi sağlanmaktadır. Ancak çiftlik hayvanlarında yeterli sayıda *in vivo* mature oosit elde etmek zor olduğundan, oositlerin olgunlaşması için *in vitro* ortama gerek duyulmaktadır (Biçici 2022). Bu nedenle çalışmaların birçoğu mezbahane materyali ile yürütülmektedir. Bazı çalışmalarda TCM-199 maturasyon medyumuna, çeşitli hormonlar ve büyüme faktörleri ilave edilerek maturasyon oranının arttığı bildirilmiştir (Cooke ve ark 2002, Gordon 2003, Suthar ve Shah 2009, Koçyiğit 2014). Koçyiğit (2014), yaptığı çalışmada A ve B kalitedeki oositlerden %94,06 oranında mature oosit elde etmiştir. Satılmış (2019), maturasyon değerlendirmek için yaptığı bir çalışmada ticari BO-IVM medyumu kullanarak A ve B kalite oositlerden %87,42 oranında mature oosit elde ettiğini bildirmektedir. Diğer bir çalışmada ise A ve B kalite oositler kullanılarak %92 oranında maturasyon şekillendiği ifade edilmiştir (Akyol ve ark 2007). Zhang ve ark (1995), yürüttükleri çalışmada %93-96 oranında mature oosit elde ettiklerini belirtmektedir. Yapılan başka bir çalışmada liposakkaritlerin maturasyon oranına etkisi

araştırılmış, kontrol grubunda ortalama %85,67 oranında mature oosit elde edildiği bildirilmektedir (Zhao ve ark 2019)..

Yürütülen tez çalışmasında maturasyon oranı %91,24 olarak belirlendi. Elde ettiğimiz maturasyon sonuçları diğer çalışmaların bazılarıyla benzerlik gösterirken bazılarından daha yüksek olduğu görüldü. Bu durumun sebebinin sunulan tez çalışmasında maturasyon için optimal şartların sağlanabildiğini düşündürmektedir. (Zhang ve ark 1995, Gordon 2003, Akyol ve ark 2007, Koçyiğit 2014, Satılmış 2019, Zhao ve ark 2019).

Gordon (2003), fertilizasyon oranının %60-90 arasında sağlanabileceğini ifade etmektedir. Chowdhury ve ark (2018), yaptıkları çalışmada; maturasyon ortamına ilave edilen likopen ile kontrol grubundan elde edilen fertilizasyon oranları sırasıyla ortalama %84,3 ve %73,1 olarak belirtmektedir. Damayanti ve ark (2022) embriyoların 48. saatteki bölünme oranlarının %41 olduğunu bildirmektedir. Chaveiro ve ark (2010) yaptıkları çalışmada; 6 farklı boğa sperması kullanarak *in vitro* fertilizasyon oranlarını karşılaştırılmalı olarak incelemişlerdir. Çalışmada embriyo bölünme oranları sırasıyla %65,3, %83,7, %65,3, %49,5, %72,7 ve %86 olarak bildirilmektedir. Bu çalışmaya benzer bir çalışmada ise iki farklı boğa sperması kullanılmış, embriyo bölünme oranları %77,8 ve %65,9 olarak bulunmuştur (Zi ve ark 2008). Düşük ve yüksek fertilite oranlarına sahip olduğu bilenen boğaların *in vitro* koşullarda fertilizasyon oranlarını incelemek için yapılan bir başka çalışmada ise, düşük fertilite oranına sahip boğa sperması ile %55,3, yüksek fertilite oranına sahip boğa sperması ile %76,7 fertilizasyon oranı elde edildiği vurgulanmaktadır (Naib ve ark 2011). Fötal buzağı serumu ve sentetik serum ilavesinin fertilizasyon oranı üzerine etkinin incelendiği bir başka çalışmada %73,7 oranında fertilizasyon elde edilmiştir (Sağırkaya ve ark 2004). Satılmış (2019), yürüttüğü tez çalışmasında fertilizasyon oranının %80,9 olarak belirtmiştir. Satılmış (2019) ile sunulan tez çalışmasından elde edilen fertilizasyon oranları benzerlik göstermektedir. Literatür verileri incelendiğinde, çalışmamızın fertilizasyon oranları Satılmış'ın (2019) yürüttüğü çalışma hariç, diğer tüm çalışmalardaki fertilizasyon oranlarından daha yüksek olduğu belirlendi. Bu farklılıkların kullanılan fertilizasyon medyumlarının değişikliğine, spermanın motilitesindeki değişikliğe, farklı sperma hazırlama tekniklerine ve genetik faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

İn vitro embriyo üretimin en önemli ve uzun aşamalarından biri embriyo kültürüdür., İyi bir antioksidan olduğu bilinen likopeninin sığırlarda in vitro embriyo üretim aşamalarında medyumlara eklenmesinin embriyo gelişimi ve kalitesini artırdığına yönelik önemli çalışmalar mevcuttur. Karotenoid olan likopenin (Joshi ve ark 2020), *in vitro* kültür ortamına eklendiğinde embriyo gelişim oranlarını artırdığı gösterilmiştir (Chowdhury ve ark 2017). Chowdhury ve ark (2017), sığırlardan elde edilen oositlerin maturasyon ortamına ekledikleri 6 farklı likopen dozu (0,1µM, 0,2µM, 0,3µM, 0,5µM, 1µM, 1,5µM) ile optimum dozu belirlemeyi amaçlamış ve en uygun dozun 0,2 µM olduğunu ve %35,20'lik bir blastosist oranı sağladıklarını ifade etmişlerdir.(Chowdhury ve ark 2017). Yükselen dozlarda likopen ilavesinin blastosist oranını düşürdüğü, 0,1µM'lik dozun ise en uygun doza yakın sonuç verdiği (blastosist oranı %32,03) araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Araştırmacılar kontrol grubunda ise %28 blastosist oranı sağladıklarını belirtmektedir. Ayrıca Chowdhury ve ark (2018), tarafından yapılan bir başka çalışmada, IVEP'in farklı aşamalarına likopen eklendiğinde kontrol grubuna kıyasla blastosiste ulaşım oranlarının arttığı bildirilmektedir. Çalışmada; 0,2µM likopen ilave edilen kültür grubunda %41, kontrol grubunda ise %33,4 blastosist oranı elde edildiği belirtilmektedir. Çalışmalar incelendiğinde, sunulan tez çalışmasındaki blastosist oranlarının daha düşük olduğu tespit edildi (Chowdhury ve ark 2017, Chowdhury ve ark 2018) (Tablo 3.5). Ancak yapılan çalışmalar dikkatli bir şekilde incelendiğinde blastosist oranının yüksek çıkmasının temel nedeninin likopen çözücü içerisine oksidatif stres indirgemesi için *Bütilhidroksitoluen* kimyasalı ilave edildiği belirlenmiştir. *Bütilhidroksitoluen* kimyasalı ise antioksidan bir madde olarak karşımıza çıkmaktadır. (Yehye ve ark 2015). Bu sonuçlar, çalışmamızla karşılaştırıldığında kombinasyon gruplarımıza benzer oranlar elde edilmesinin, askorbik asit ile aynı etkiye sahip olmasından kaynaklandığını göstermektedir.

Yapılan farklı bir çalışmada, in vitro maturasyon medyumuna likopen (0,2 µM) ilavesinin sıcaklık stresi nedeniyle oluşan ROS'lara karşı etkinliği araştırılarak embriyo gelişim oranları karşılaştırılmıştır. Çalışmada oositler standart 38,5˚C ve 40,5˚C ısılarında mature edilmiş, daha sonraki aşamalar standart 38,5˚C devam ettirilmiştir. Sıcaklık stresi (40,5˚C) oluşturulan çalışma gruplarının 8. günündeki blastosist oranları, likopen ve kontrol gruplarda sırasıyla ortalama %32,3 ve %29,9 olarak, 38,5˚C'lik çalışma gruplarının likopen ve kontrol gruplarında ise sırasıyla

%55,2 ve %44,5 olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak likopenin sıcaklık stresi nedeniyle oluşan ROS seviyelerini azaltarak blastosist oranını artırdığı görülmüştür. (Residiwati ve ark 2021). Çalışmalardan elde edilen veriler ile sunulan tez çalışmasında likopen (0,2 µM ve 0,4 µM) ilaveli gruplar karşılaştırıldığında blastosist oranının daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum maturasyon süresinin kısa olması ve bu sürede likopenin sıcaklık stresi nedeniyle oluşan ROS bağlanarak antioksidan etkinliğini göstermektedir Embriyo kültür süresinin uzun olması, kültür aşamasında enerji metabolizmasının değişkenliği ve ROS'ların medyumla daha uzun süre etkileşimde kalması gibi faktörler, likopen ilavesinin blastosist oranlarında belirgin bir fark yaratmamasına neden olmuş olabilir. Likopenin süperoksit (O_2^-) giderme kapasitesinin yüksek olduğu bilinmesine rağmen, bu süreçte absorbe ettiği enerjiyi yüksek enerjili triplet duruma geçerek depolar ve ardından ısıya dönüştürerek veya fiziksel söndürme yoluyla temel durumuna geri döner. Bu mekanizma, likopen molekülünün yapısal bütünlüğünü korumasını olanak sağlayabileceği düşünülebilir. Ancak, askorbik asit ile birlikte kullanıldığında, likopenin rejenerasyon süreci desteklenebilir ve böylece oksidatif stresin azaltılmasında daha güçlü bir sinerjik etki oluşturabilir. Bu durum, kombinasyon gruplarının in vitro kültür koşullarında daha dengeli bir redoks ortamı sağlamada etkili bir strateji olabileceğini göstermektedir.

Kang ve ark (2021), likopenin domuz embriyolarında oksidatif stresi ve apoptozu azalttığı, böylece *in vitro* gelişimlerini iyileştirdiğini ifade etmektedir. IVC aşamasında, kültür medyumuna 0,02 µM, 0,05 µM, 0,1 µM veya 0,2 µM likopen ilave edilerek, *in vitro* gelişim üzerindeki etkileri incelenmiştir. Likopen eklenen gruplar ile kontrol grubu arasında bölünme oranlarında bir farklılık olmamasına rağmen, blastosist oluşumunun 0,1 µM likopen eklenmesiyle önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (45,9 ± 3,5). Ancak 0,02µM, 0,05µM ve 0,2µM likopen ilave edilen gruplar ile (sırasıyla 27,1 ± 2,7, 38,3 ± 0,5 ve 34,6 ± 1,7) kontrol grubu (27,9 ± 2,2) arasında blastosist oluşumları açısından istatistiki bir fark gözlenmediği belirtilmektedir.

Ancak, likopenin belirli konsantrasyonlarda faydalı etkiler göstermiş olmasına rağmen, yüksek dozlarının potansiyel olarak olumsuz sonuçlara yol açabileceğini belirtmek önemlidir. Örneğin, aşırı antioksidan ilavesi, hücrelerdeki oksidatif ve indirgeyici süreçlerin hassas dengesini bozabilmektedir. Belirli koşullar altında potansiyel olarak bir pro-oksidan görevi görebilmektedir (Veeramachaneni ve ark

2008, Kujawska ve ark 2014). Bu, olası olumsuz sonuçlardan kaçınırken koruyucu etkilerini en üst düzeye çıkarmak için likopen konsantrasyonlarının optimize edilmesinin önemi vurgulanmaktadır.

Sunulan tez çalışmasında kullanılan likopen dozu ile çalışmalarda kullanılan likopen dozu benzerlik göstermektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarda likopen, embriyo üretim sürecinin farklı aşamalarında kullanılmış olsa da sonuçların tez çalışmasındaki bulgulara göre daha yüksek çıkmasının temel nedeninin kullanılan medyumun ticari bir medyum olması olarak söylemek mümkündür. İçeriği bilinmeyen bir solüsyon olmasından dolayı likopenin bu medyum ile kullanılmasının hangi sebeplerle etkisiz kaldığı bilinememektedir. Ayrıca yaptığımız deneysel ön çalışmalarda daha yüksek ve düşük dozlarını kültür ortamına eklenerek uygun dozun belirlenmesine yönelik çalışılmıştır. Ancak daha yüksek dozlarda (0,6 µM, 0,8 µM, 1 µM ve 2 µM) kültür ortamının 48. saat sonunda bozulmaya (kültür medyumu üzerinde bulutlanma) uğradığı görülmüş ve pro-oksidan etkisi ile embriyo toksisitesine neden olduğu saptandı. Daha düşük dozlarda (0,05 µM ve 0,1 µM) ise herhangi bir varlık göstermediği, kontrol grubu ile benzer sonuçlar ortaya çıkarttığı belirlendi.

Gonzalez Andueza ve ark (2022) kültür ortamında dört farklı deneysel grup kullanılarak araştırma yapmıştır. Bu gruplar sırasıyla, insülin (5 µL), transferrin (5 µL) ve selenyum (5 ng) içeren grup (ITS, kontrol grubu), ITS'ye dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiş grup (seyreltilmiş kontrol grubu), ITS'ye DMSO içinde çözdürülmüş 0,1 µM likopen ilave edilen grup (ITSL) ve insülin ile transferrin içeren, ancak selenyum yerine DMSO içinde çözdürülmüş 0,1 µM likopen ilave edilen grup (ITL) olarak tanımlanmıştır. Çalışmada elde edilen blastosist oranları, kontrol grubunda %37,4, DMSO eklenmiş kontrol grubunda %36,9, ITSL grubunda %39,7 ve ITL grubunda %46,3 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda, likopen ilavesi yapılan ITL grubunun, diğer gruplara kıyasla daha yüksek bir blastosist oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak Gonzalez Andueza ve ark (2022), aksine bu tez çalışmasında blastosist oranı daha düşüktür. Blastosist oranlarında görülen bu farklılığının nedeninin apayrı çözücüler ve medyumların kullanılmasından kaynaklanabileceği ifade edilmektedir.

Askorbik asit, embriyo gelişimi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerdeki antioksidan rolü açısından incelenmiştir. *İn vitro* embriyo üretimi

sırasında ilave edilmesi, embriyo kalitesi ve gelişimsel yeterliliğin iyileştirilmesinde olumlu etkiler göstermiştir (Damayanti ve ark 2022). Sovernigo ve ark (2017) çalışmalarında maturasyon medyumuna 50 µg/mL (yaklaşık 0,28 µM) askorbik asit eklenmesiyle, blastosist oranlarının kontrol grubunda %47,2±2,7 iken, askorbik asit ilave edilen grupta %52,1±3,1'e yükseldiği ve askorbik asit ilavesiyle üretilen embriyolarda toplam hücre sayısının da anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmalar, askorbik asidin ROS seviyelerini düşürerek oksidatif stresi azaltabileceğini göstermiştir. Başka bir çalışmada, araştırmacılar 25, 50, 100 µM miktarındaki askorbik asidin manda oositlerinin *in vitro* olgunlaşması ve embriyonik gelişimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Blastosist oranlarının, 25 µM (%9,50), 50 µM (%12,81) ve 100 µM (%8,88) askorbik asit gruplarında, kontrol grubuna (%4,87) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır. En yüksek blastosist oranı 50 µM askorbik asit ilavesinde gözlemlenmiştir. Blastosist gelişim oranlarının 25 µM ve 100 µM askorbik asit ilavesinde neredeyse benzer olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer gözlem ise blastosist oranının askorbik asit ilave edilen tüm gruplarda belirgin şekilde artmış, üstelik askorbik asidin sisteinle kombinasyonunda bu sonuçların daha da iyileşmiş olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, araştırmacılar *in vitro* embriyo üretimi üzerinde en iyi etkiyi 50 µM askorbik asit ile yapılan bir uygulamanın sağladığını ve 50 µM sisteinle birleştirildiğinde daha da iyi sonuçlar gösterdiğini bildirmişlerdir (El ve ark 2017). Alsalim ve ark (2020), askorbik asit ve sisteamin ile askorbik asit kombinasyonuyla *in vitro* mature edilen sığır oositlerinin bölünme oranı ve daha sonra blastosist gelişimi üzerindeki etkilerini kontrol etmişlerdir. Araştırmacılar 0,2 mM dozundaki askorbik asit ilavesinin (%23,91), kontrol grubuna (%8,57) kıyasla blastosist oranını artırdığını gözlemlemiştir ($P<0,05$). Ancak bölünme oranları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Diğer araştırmalar incelendiğinde askorbik asidin kullanılan dozunun tez çalışmasında kullanılan dozdan yaklaşık olarak 100 kat kadar daha az olduğu saptamıştır. Askorbik asit, konsantrasyonuna ve hücresel duruma bağlı olarak hem antioksidan hem de pro-oksidan olarak ikili rolüyle yaygın olarak tanınmaktadır. Hücre kültüründe, askorbik asidin pro-oksidan etkileri özellikle farmakolojik dozlara göre ortaya çıkmaktadır. Bu da hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin seviyelerinin artmasına yol açabilmektedir (Chen ve ark 2007, Chen ve ark 2008, Bhattacharya 2021).

Sunulan tez çalışmasına başlamadan önce gerçekleştirdiğimiz deneysel ön çalışmalarda askorbik asidin 20 µM, 40 µM, 200 µM, 400 µM, 2 mM ve 4 mM dozları denendi. Deneysel ön çalışmada 20 µM, 40 µM, 200 µM ve 400 µM askorbik asit kültür ortamına ekledikten 48 saat sonra zigotlar incelendiğinde 20 µM ve 40 µM doz içeren gruplarda embriyoların bloklandığı tespit edildi. Bu sonucun askorbik asit için düşük yoğunluklarda özellikle Fe^{+3} komplekslerini indirgeme yeteneği nedeniyle, oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunun başlatıcılarını üreten formlara dönüştürdüğü için pro-oksidan aktivite gösterdiği tahmin edilmektedir (Dalvit ve ark 1998). Diğer 200 µM ve 400 µM askorbik asit içeren gruplarda bölünmelerin varlığı tespit edildi ve tekrar kültür ortamına aktarıldı. Embriyoların 7. ve 8. gün inkübatörden çıkarıldıktan sonra kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, elde edilen blastosist oranları açısından istatistiksel olarak fark olmadığı belirlendi. Bazı sperma sulandırıcılarında kullanıldığı görülen ve 15 mM'a kadar araştırması yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda 2 mM ve 4 mM içeren dozların sunulan tez çalışmasında kullanılmasına karar verildi (Dalvit ve ark 1998, Tronci ve ark 2021, Rakha ve ark 2023). Embriyo üretimi için 2 mM ve 4 mM askorbik asit içeren kültür dozunun kontrol grubuna göre pozitif yansımasını elde edilen blastosist sayısı ile görmüş bulunmaktayız. Yapılan deneysel çalışmada elde edilen veriler, tez çalışmasıyla benzer sonuçlar ortaya koymuştur (Tablo 3.5). Daha önceki araştırmalarda kullanılan medyumlar, antioksidanların eklendiği ortamların farklılığı, bu medyumların içeriklerinde yer alan bileşenlerin çeşitliliği ve kullanılan protokollerdeki varyasyonlar, embriyo üretimi üzerinde oransal değişikliklere sebep olmuştur. Ayrıca, hayvan ırkı, yaşı, besleme, mevsimsel değişiklikler ve çevresel faktörlerin de bu farklılıklar üzerinde etkili olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu durum, embriyo gelişimi üzerine yapılan çalışmaların sonuçlarındaki varyasyonları açıklamada önemli bir etken olarak değerlendirilmektedir.

Sunulan tez çalışmasında likopen ve askorbik asidin kombinasyon gruplarının kültür ortamına eklenerek etkileri araştırıldı. Bu iki antioksidanın daha önce birlikte embriyo üretiminde kullanılmadığı literatür taraması ile saptandı. Ancak embriyo üretimi üzerinde olmasa da sperma kalitesi üzerine yakın zamanda çalışma yapıldığı belirlendi (Bodu ve ark 2024b). Bu iki antioksidanın hücre zarları, hücresel bütünlüğü ve işlevin korunmasında hayati bir rol oynadığı bilinmektedir. Hücrelerin temel bileşenleri fosfolipitler, kolesterol ve proteinlerdir. Ancak bu yapılar, özellikle lipid

peroksidasyonu başta olmak üzere oksidatif hasara karşı oldukça hassastır. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin karbon-karbon çift bağları içeren lipitlere saldırdığı ve hücre zarı işlev bozukluğuna ve apoptoza yol açtığı bir süreçtir (Halliwell ve Gutteridge 2015). Suda çözünür güçlü bir antioksidan olan askorbik asidin, hücre zarlarını oksidatif stresten koruduğu ve diğer antioksidanları yenileyerek genel antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği bildirilmiştir (Carr ve Frei 1999).

Bodu ve ark (2024b), yaptıkları çalışmada likopen (2 mM) ile askorbik asidin (5 mM) ayrı ve kombine dozlarını kullanmışlardır. Sulandırıcı içerisine ilave edilen antioksidanlar daha sonra sperma dondurma işleminde kullanılmıştır. Payetlerin çözdürülmesini takiben motilite, plazma membran bütünlüğü *(SYBR14/PI),* akrozomal membran bütünlüğü *(FITC-PNA/PI)* ve mitokondriyal aktivite *(JC-1/PI)* oranları belirlenmiştir. Araştırmacılar, kombinasyon grubundan (likopen 2 mM + askorbik asit 5 mM) elde edilen spermatolojik parametrelerin, diğer gruplara kıyasla daha pozitif sonuçlar verdiğini, istatistiksel açıdan önemli farklılıklar elde ettiklerini ifade etmektedirler ($P<0,05$).

Sidi ve ark (2022) yaptıkları çalışmada, likopen (0,2 μM), menadiyon (0,5 μM) veya likopen ile menadiyon (0,2 μM+0,5 μM) kombinasyonlarını IVM ortamına ilave ederek, IVC ortamında blastosistlerin bölünmesi ve gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar blastosist oranlarını kültürün 8. gününde incelenmişlerdir. Blastosist oranları kontrol grubunda %43,3, likopen grubunda %56,0, menadiyon grubunda %33,7 ve likopen ile menadiyon kombinasyon grubunda %40,2 olarak belirlenmiştir. Blastosist oranı, likopen grubunda diğer gruplara göre en yüksek bulunmuştur. İstatistiki açıdan önemli farkın yalnızca likopen grubunda elde edildiği bildirilmiştir ($P<0,05$). Yapılan çalışmanın sonuçları, sunulan tez çalışmasının blastosist oranından daha yüksek olduğu tespit edildi. Ancak likopen ve menadion kombinasyonunun blastosist oranlarını düşürdüğü gözlemlenirken, askorbik asit ve likopen kombinasyonunda bunun tersi bir etki saptandı. Menadionun pro-oksidan etkisinin likopenin antioksidan kapasitesini aşırı zorlaması ve oksidatif stres seviyesini artırması, blastosist oranlarının düşmesine neden olmaktadır. Menadionun redoks döngüsü aracılığıyla süperoksit radikalleri (O_2^-) üretebileceği bilinmektedir (Sidi ve ark 2022) Buna karşın, askorbik asit ve likopen kombinasyonu, antioksidan sistemin daha dengeli çalışmasını sağlayarak oksidatif stresin daha etkili bir şekilde

baskılanmasına sağlayabilir. Askorbik asit, likopenin rejenerasyon sürecini destekleyerek onun sürekli aktif kalmasını sağlarken, menadionun aksine, embriyo gelişimini olumsuz etkileyen aşırı ROS üretimini tetikleme ihtimali düşüktür.

Dalvit ve ark (2005) yaptıkları çalışmada, α-tokoferol (Vitamin E), askorbik asit veya α-tokoferol ve askorbik asit kombine gruplarını IVM ortamına ilave ederek gelişim süreçlerini incelemişlerdir. Araştırmacılar en iyi sonucu kombinasyon grubundan elde ettiklerini, E vitaminin tek başına kullanıldığında, kombine gruba göre daha az etkin olduğunu saptamışlardır. E vitamini, hücre zarlarını oksidatif hasardan koruyan, lipidde çözünen güçlü bir antioksidandır. Aktif formda bulunan α-tokoferol (E vitamini), vücutta güçlü bir antioksidan olarak işlev görür ve serbest radikaller gibi zararlı oksidanlarla etkileşime girerek onların hücrelere zarar vermesini engeller. Ancak bu süreçte, α-tokoferol, oksidanlarla reaksiyona girerek α-tokoferoksil radikali adı verilen daha az aktif bir forma dönüşür. Bu dönüşüm, α-tokoferol'ün antioksidan işlevini geçici olarak kaybetmesine neden olur. Burada devreye giren askorbik asit (C vitamini), α-tokoferoksil radikalini yeniden aktif formu olan α-tokoferole dönüştürerek bir tür rejeneratif etki sağlar. Askorbik asit, bu radikali indirger ve bu sayede α-tokoferol, tekrar serbest radikallerle savaşma yeteneğini kazanır. Bu sinerjik etki, C ve E vitamininin hücreleri oksidatif strese karşı birlikte daha etkili bir şekilde korumasını sağlar. Bu mekanizma, özellikle *in vitro* embriyo kültürlerinde, antioksidanların embriyo gelişimini nasıl desteklediği ile ilgili araştırmalar açısından büyük önem taşır. C vitamini, hem α-tokoferol'ü yenileyerek hem de kendi başına serbest radikalleri nötralize ederek hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasında rol oynar, bu da embriyo kalitesi ve gelişim potansiyelini artırabilir (Shimakawa ve ark 2003, Rizvi ve ark 2009).

Sunulan tez çalışmasında, askorbik asit ile likopen'in sinerjik etki göstermesinin temel mekanizmasının, askorbik asit ile α-tokoferol arasındaki sinerjik etkiye benzer olduğu ifade edilebilinir. Likopen, serbest radikaller ya da oksidanlar ile etkileşime girdiğinde, likopen radikal katyonu adı verilen daha reaktif bir yapıya dönüşmektedir (Han ve ark 2004). Bu, likopenin antioksidan savunma sırasında elektron vererek oksitlenmesi sonucu oluşan bir ara üründür. Likopen radikal katyonu, dengesiz ve reaktif bir formdur (Burke ve ark 2001). Ancak askorbik asidin elektron donör özelliği, askorbik asidin diğer antioksidanlarla ile sinerjik etki göstermesinin

temelini oluşturmaktadır. Vitamin E'de olduğu gibi likopende oksitlenerek etkisiz hale geldiğinde, askorbik asit diğer antioksidanlara ihtiyaç duyması halinde elektron sağlayarak yeniden aktif formuna döndürebileceği muhtemeldir.(Frei ve ark 1989, Belin ve ark 2009, Sirmali ve ark 2014).

Embriyo kalitesi ve sonraki gelişim aşamalarının öngörülmesinde, blastosist aşamasındaki hücre sayısı (ICM ve TE) büyük bir önem taşımaktadır. Özellikle iç hücre kümesi, tüm hücre tiplerine dönüşebilme kapasitesine sahip (totipotent) embriyonik kök hücreler tarafından oluşturulmaktadır. Bu hücreler daha sonra, tüm embriyonik dokuları oluşturma yeteneğine sahip (pluripotent) epiblast hücrelerine ve embriyonik gelişimde destekleyici yapıların oluşumundan sorumlu olan primitif endoderm hücrelerine farklılaşmaktadır. Bu süreç, embriyonun ilerleyen gelişim aşamaları açısından kritik bir rol oynamaktadır. Trofektoderm hücreleri ise ekstra embriyonik yapılar ve plasenta oluşumunda görev alarak, embriyonun uterusta tutunmasını ve beslenmesini sağlamaktadır (Brinkhof ve ark 2017, Aguila ve ark 2022). İç hücre kümesinin toplam hücre sayısına oranı, embriyonun gelişim potansiyelini değerlendiren önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir. Yüksek bir iç hücre kümesi oranı, embriyonun daha fazla pluripotent hücre içerdiğini ve dolayısıyla sonraki gelişim aşamalarında daha fazla başarıya ulaşabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, *in vitro* koşullarda elde edilen blastosistlerde iç hücre kümesinin büyüklüğünün ve toplam hücre sayısının artırılması, embriyo kalitesini iyileştirmeye yönelik çalışmaların odak noktalarından biri olmuştur (Buemo ve ark 2016, Deng ve ark 2020).

Sidi ve ark (2022) maturasyon ortamına likopen ve bazı antioksidanları ilave etmişlerdir. Likopen grubun hücre sayılarının (TCN ve ICM) diğer çalışma gruplarına göre önemli derecede artırdığı ve blastosist kalitesinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Residiwati ve ark (2021) yaptıkları çalışmada ısı şoku uygulanmayan likopen ilaveli grubun hücre sayıları (TCN ICM ve TE) diğer grupların tamamından istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Chowdhury ve ark (2017) sığırlarda IVM ortamına farklı dozlarda likopen ilave ettiklerini, 0,2 µM'lık grubun kontrol grubuna göre toplam hücre sayısının önemli ölçüde yüksek çıktığı saptamışlardır. Li ve ark (2014) sığır IVC ortamına ilave ettikleri askorbik asidin toplam hücre sayısının kontrol grubundan önemli ölçüde yüksek çıktığı bildirilmiştir.

Maddahi ve ark (2024) kültür medyumuna askorbik asit ilave ettiklerinde toplam hücre sayısı bakımından kontrol grubu ile arasında fark olmadığı tespit edilmiştir.

Tez çalışmasından elde edilen bulgular, likopen ve askorbik asit kombinasyonunun diğer gruplara kıyasla daha yüksek başarı oranlarına sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 3.6). Bu sonuçlar, bu iki güçlü antioksidanın birlikte kullanıldığında embriyo gelişimi üzerindeki olumlu etkilerini ortaya koymaktadır. Oksidatif stresin *in vitro* embriyo gelişimi üzerindeki olumsuz etkileri göz önüne alındığında, likopen ve askorbik asidin reaktif oksijen türlerini etkili bir şekilde engelleyerek embriyolardaki oksidatif hasarı azalttığı düşünülmektedir. Oksidatif stres, embriyo kültür ortamlarında yaygın bir sorun olup, embriyo kalitesini ve gelişimsel potansiyelini ciddi şekilde tehdit etmektedir. ROS'un embriyonik hücrelere verdiği zarar, hücresel bütünlüğü bozarak apoptotik hücre sayısının artmasına ve gelişim aşamalarının yavaşlamasına neden olabilmektedir (Seaby ve ark 2012, Sollecito ve ark 2019). Apoptotik hücre sayılarının ve indeks oranının kombinasyon gruplarında azaldığı, gruplar arasındaki toplam hücre sayıları karşılaştırıldığında Lik0.2+AA2 grubunda istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük olduğu Tablo 3.7'de belirtilmektedir ($P<0,05$).

Apoptotik hücre sayıları incelendiğinde ise Chowdhury ve ark (2017) IVM ortamına ilave ettikleri likopen ile ACN sayısının kontrol grubuna göre daha az oluştuğunu bildirmişlerdir. Residiwati ve ark (2021) ACN ve AI'yı incelediklerinde kontrol ile likopen grubu arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını belirlemişlerdir. Li ve ark (2014) askorbik asidin kültür medyumuna ilavesinin ACN ve AI'yı azalttığını istatistiksel olarak saptamışlardır.

Tez çalışmamızda likopen ve askorbik asit kombinasyonlarının in vitro kültür koşullarında oosit ve embriyo gelişimi üzerindeki etkilerini değerlendirdiğimizde, apoptotik hücre sayısında ve apoptotik indeks oranında belirgin bir azalma gözlemlendi. Özellikle antioksidan kombinasyon grubunda, kontrol ve tek başına kullanılan antioksidan gruplarına kıyasla daha düşük seviyelerde apoptotik hücre varlığı tespit edildi. Bu durum, likopen ve askorbik asidin sinerjik etkisinin hücresel düzeyde oksidatif stresi azaltarak apoptotik süreçleri baskıladığına işaret etmektedir.

Sunulan bilgiler ışığında, çalışmamızda likopen ve askorbik asit kombinasyonunun ROS'u etkili bir şekilde nötralize etmesi, embriyo gelişimi için uygun bir mikro çevre oluşturarak hücre ölümünü azaltmış ve daha yüksek gelişim oranlarına yol açtığı şeklinde değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, likopen ve askorbik asit kombinasyonunun embriyo gelişimindeki destekleyici rolünü daha iyi anlamamıza olanak sağlamaktadır. Oksidatif stresin engellenmesi, hücresel proliferasyonu destekleyerek daha sağlıklı embriyoların oluşmasına katkıda bulunabilir. Bu nedenle, likopen ve askorbik asit kombinasyonunun, *in vitro* embriyo üretim süreçlerinde potansiyel olarak kullanılabilecek etkili bir strateji olduğu sonucuna varılabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER.

Yürütülen tez çalışmasında *in vitro* embriyo üretimini desteklemek ve başarı oranını artırmak amacıyla IVC ortamlarına farklı dozlarda ve kombinasyonlarda antioksidan ilavesi yapıldı. Antioksidan ilavesi ile oksidatif stresi azaltarak elde edilen embriyo sayılarını ve kalitelerini artırmak hedeflenmiştir.

Sunulan tez çalışmasındaki verilerin sonuçlarına göre;

- Likopen 0,2 µM ve Askorbik asit 2 mM (Lik0.2+AA2) ile Likopen 0,4 µM ve Askorbik asit 4 mM (Lik0.4+AA4) kombinasyonlarından elde edilen embriyo sayılarının kontrol ve likopen gruplarına göre daha yüksek olduğu istatistiki olarak saptandı.
- Askorbik asidin düşük doz ilaveli kültür gruplarından elde edilen embriyo sayılarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlendi. Askorbik asidin yüksek dozlu kültür grubu ise diğer gruplarla karşılaştırıldığında bir farklılık olmadığı saptandı.
- Likopen gruplarından elde edilen embriyo sayılarının kontrol grubu sayıları benzer olduğu görüldü.

Ayrıca elde edilen embriyoların kalite değerlendirilmesini yapmak amacıyla TUNEL assay kiti embriyolar boyandı. Floresan boyama tekniği kullanılarak embriyoların iç hücre kümesi, trofektoderm hücreleri, toplam hücre sayıları ve apoptotik hücre sayıları kontrol edildi. Bu sonuçlara göre;

- İç hücre kümesi sayıları incelendiğinde, likopen ve askorbik asit kombinasyon gruplarının, kontrol grubuna, 0,2 µM ve 0,4 µM likopen uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek değerlere sahip olduğu gözlemlendi. Askorbik asit grupları ile diğer gruplar arasında bir farklılık ortaya çıkmadığı belirlendi.
- Trofektoderm hücre sayıları arasındaki önem, Lik0.2+AA2 grubunun, kontrol ve likopen 0,4 µM gruplarına göre sayısal üstünlüğü istatistiki olarak ortaya çıktı. Diğer grupların arasında anlamlı bir farklılık olmadığı istatistiksel olarak tespit edildi.
- Toplam hücre sayılarının Lik0.2+AA2 grubunda en yüksek olduğu belirlendi. Ancak sadece Lik0.4+AA4 ile AA4 grubu arasında istatistiki açıdan önemli bir

farklılık belirlenmedi. Lik0.4+AA4 grubundaki değerlerin kontrol, Lik0.2 ve Lik0.4 gruplarına göre istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edildi.

- Son olarak apoptotik hücre sayıları toplam hücre sayıları ile karşılaştırıldığında sadece Lik0.2+AA2 grubunda oransal olarak kontrol grubundan daha az olduğu yine istatistiki olarak saptandı. Ancak, Likopen 0,4 µM + Askorbik Asit 4 mM grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamakla birlikte, sayısal olarak daha yüksek değerlere sahip olduğu gözlemlendi.

  Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 0,2 µM Likopen + 2 mM Askorbik Asit grubunun, embriyo üretiminde kültür ortamı açısından en uygun grup olduğu tespit edildi. Sunulan çalışmada elde edilen veriler, kombine antioksidan maddelerin kültür medyumuna ilave edilmesinin IVEP başarısını artırabileceğini göstermektedir. Ancak, başarı oranlarının daha da yükseltmek için farklı antioksidan kombinasyonlarının ve dozlarının *in vitro* kültür ortamında denenmesi faydalı olabilir. Ayrıca, ilerleyen çalışmalarda mezbaha materyali yerine genetiği bilinen hayvanların ovaryumlarının kullanılması, IVEP başarısını daha da artırabileceği unutulmamalıdır.

6. KAYNAKLAR

Adhikari D, Liu K, 2009. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. Endocrine reviews, 30(5), 438–64.

Afonso S, Romagnano L, Babiarz B, 1997. The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. Development, 124(17), 3415–425.

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK, 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. Reproductive biology and endocrinology, 3, 1–21.

Agarwal A, Virk G, Ong C, Du Plessis SS, 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. World J Mens Health, 32(1), 1–17.

Agarwal A, Maldonado Rosas I, Anagnostopoulou C, Cannarella R, Boitrelle F, Munoz LV, Finelli R, Durairajanayagam D, Henkel R, Saleh R, 2022. Oxidative stress and assisted reproduction: a comprehensive review of its pathophysiological role and strategies for optimizing embryo culture environment. Antioxidants, 11(3), 477.

Agarwal S, Rao AV, 1998. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. Lipids, 33(10), 981–84.

Aguila L, Osycka-Salut C, Treulen F, Felmer R, 2022. Pluripotent core in bovine embryos: a review. Animals, 12(8), 1010.

Agwu E, Ezihe C, Kaigama G, 2023. Antioxidant Roles/Functions of Ascorbic Acid (Vitamin C). Ascorbic Acid-Biochemistry and Functions. IntechOpen;

Ahmed JA, Dutta D, Nashiruddullah N, 2015. Recovery of different cumulus oocyte complex (COC) grades from bovine ovaries by aspiration method. Journal of animal research, 5(3), 631–34.

Akyol N, 2005. In vivo and In vitro Fertilization in Cattle (A Review). Lalahan Hay. Araşt. Enst. Der, 45(2), 53–61.

Akyol N, 2006. In vitro Maturation of Bovine Oocytes (A Review). Lalahan Hay. Araşt. Enst. Der, 46(1), .

Akyol N, Ertem TB, 2019. Dünyada ve Türkiye'de Embriyo Transferi Çalışmaları. Turkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics, 5(1), 50–6.

Akyol N, Kızıl SH, Karaşahin T, 2007. İn vitro sığır embriyosu üretim ve transferi. Journal of Lalahan Livestock Research Institute (Turkey), 47(1), .

Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. J. Dairy Sci, 85(2), 390–96.

Al-Shammari RFH, Almeeni IM, 2022. Effect of oocytes collection methods on oocytes quantity and quality in local Iraqi ewes. International journal of health sciences, 6(S1), 14560-67

Alam MH, Lee J, Miyano T, 2018. Inhibition of PDE3A sustains meiotic arrest and gap junction of bovine growing oocytes in in vitro growth culture. Theriogenology, 118, 110–18.

Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ, 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. Reproduction, 121(5), 647–53.

Alçay S, 2020. Sperma Hazırlama Teknikleri ve İn Vitro Kapasitasyon. Turkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics, 6(1), 15–9.

Ali A, Sirard M-A, 2002. The effects of 17β-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. Zygote, 10(1), 65–71.

Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA, 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. Theriogenology, 59(3–4), 939–49.

Ali SS, Ahsan H, Zia MK, Siddiqui T, Khan FH, 2020. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. J Food Biochem, 44(3), e13145.

Alkan H, Satilmis F, Demirel MA, Bodu M, Yesilkaya OF, Ciftci MF, Erdem H, Tekindal MA, Alkan KK, 2023. Does using microfluidic sperm sorting chips in bovine IVEP affect blastocyst development? Reprod Dom Anim, 58(7), 1012–20.

Alkan KK, Satilmis F, Sonmez G, Deniz YE, Culha MH, Ciftci MF, Yesilkaya OF, Alkan H, 2025. Putrescine supplementation improves the developmental competence of in vitro produced bovine embryos. Theriogenology, 231, 133–43.

Alsalim HA, Habeeb IA, Abbas HR, 2020. The Effect of Antioxidant Cysteamine With Ascorbic Acid On In Vitro Fertilization in Cows. International Journal of Pharmaceutical Research (09752366).

Amiri I, Ghorbani M, Heshmati S, 2012. Comparison of the DNA fragmentation and the sperm parameters after processing by the density gradient and the swim up methods. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 6(9), 1451.

Aoto T, Takahashi R, Ueda M, 2011. A protocol for rat in vitro fertilization during conventional laboratory working hours. Transgenic research, 20(6), 1245–52.

Aroca P, Santos E, Kazanietz MG, 2000. Recombinant C1b domain of PKCδ triggers meiotic maturation upon microinjection in Xenopus laevis oocytes. Febs Letters, 483(1), 27–32.

Arroyo A, Kim B, Yeh J, 2020. Luteinizing hormone action in human oocyte maturation and quality: signaling pathways, regulation, and clinical impact. Reproductive Sciences, 27(6), 1223–52.

Asano A, Roman HB, Hirschberger LL, Ushiyama A, Nelson JL, Hinchman MM, Stipanuk MH, Travis AJ, 2018. Cysteine dioxygenase is essential for mouse sperm osmoadaptation and male fertility. The FEBS journal, 285(10), 1827–39.

Asplund K, 2020. Use of in vitro fertilization—ethical issues. Upsala journal of medical sciences, 125(2), 192–199.

Atasoy N, 2012. Biochemistry of lycopene. Journal of Animal and Veterinary Advances, 11(15), 2605–10.

Athale CA, Dinarina A, Nedelec F, Karsenti E, 2014. Collective behavior of minus-ended motors in mitotic microtubule asters gliding toward DNA. Physical Biology, 11(1), 16008.

Aulie RP, 1961. Caspar Friedrich Wolff and his' Theoria Generationis', 1759. Journal of the History of Medicine and Allied Sciences, 124–44.

Awala S, Ajayi E, Alabi O, 2017. Evaluation of the in vitro Antioxidant Activities of Leaves Extracts of Persea americana and Ficus exasperata Collected from Akure, Nigeria. International Journal of Biochemistry Research & Review, 17(1), 1–11.

Balboula AZ, Yamanaka K, Sakatani M, Kawahara M, Hegab AO, Zaabel SM, Takahashi M, 2013. Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes exposed to heat shock during in vitro maturation. Reproduction, 146(4), 407–17.

Balboula AZ, Aboelenain M, Li J, Bai H, Kawahara M, Abdel-Ghani MA, Takahashi M, 2020. Inverse relationship between autophagy and CTSK is related to bovine embryo quality. Reproduction, 159(6), 757–66.

Balestrieri ML, De Prisco R, Nicolaus B, Pari P, Moriello VS, Strazzullo G, Iorio EL, Servillo L, Balestrieri C, 2004. Lycopene in association with α-tocopherol or tomato lipophilic extracts enhances acyl-platelet-activating factor biosynthesis in endothelial cells during oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine, 36(8), 1058–67.

Bansal AK, Bilaspuri GS, 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary medicine international, 2011(1), 686137.

Baratas A, Gosálvez J, de la Casa M, Camacho S, Dorado-Silva M, Johnston SD, Roy R, 2022. Cumulus cell DNA damage as an index of human oocyte competence. Reproductive Sciences, 29(11), 3194–00.

Bardaweel SK, Gul M, Alzweiri M, Ishaqat A, ALSalamat HA, Bashatwah RM, 2018. Reactive oxygen species: The dual role in physiological and pathological conditions of the human body. Eurasian J Med, 50(3), 193-201.

Barnes FL, Looney CR, Westhusin ME, 1991. Embryo cloning in cattle: The current state of technology. Embryo Transfer, 6, 1–5.

Basu A, Imrhan V, 2007. Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: conclusions from clinical trials. European journal of clinical nutrition, 61(3), 295–303.

Belin S, Kaya F, Duisit G, Giacometti S, Ciccolini J, Fontés M, 2009. Antiproliferative effect of ascorbic acid is associated with the inhibition of genes necessary to cell cycle progression. PloS one, 4(2), e4409.

Beyer RE, 1994. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. Journal of bioenergetics and biomembranes, 26, 349–58.

Bhattacharya S, 2021. Clinical Attestation and Redox Mechanism of Ascorbic Acid in the Treatment of Cancer. Free Radicals and Antioxidants, 11(1), 1–6.

Bicici E, Satilmis F, Bodu M, Demirel MA, Karakas Alkan K, Alkan H, 2023. Effect of putrescine supplementation to in vitro maturation medium on embryo development and quality in cattle. Animal Biotechnology, 34(8), 3887–96.

Biçici E, 2022. Sığırlarda İn Vitro Maturasyon Ortamına İlave Edilen Putresinin Embriyo Gelişimi ve Kalitesine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O, 2012. Oxidative stress and antioxidant defense The World Allergy Organization journal 5: 9–19.

Birler S, Papuççuoğlu S, Alkan S, Evecen M, İleri K, 1997. Sığır oositlerinin in vitro fertilizasyonu üzerine farklı medyumların ve bu medyumlara yapılan hormon ilavelerinin etkileri. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 23(2), 511–16.

Birler S, Pabuççuoğlu S, Alkan S, Evecen M, İleri İK, 1998. In vitro fertilize edilen sığır oositlerindeki pronüklear gelişim üzerine olgunlaştırma ve fertilizasyon sürelerinin etkisi. Turk J Vet Anim Sci, 22, 1–15.

Birler S, Pabuccuoğlu S, Atalla H, Alkan S, Özdaş ÖB, Bacınoğlu S, Cirit Ü, Zavar İ, Sönmez MEC, İleri İK, 2002. Transfer of in vitro produced sheep embryos. Turk J Vet Anim Sci, 26(6), 1421–26.

Bó GA, Mapletoft RJ, 2018. Evaluation and classification of bovine embryos. Animal Reproduction, 10(3), 344–8.

Bodu M, Ozturk AE, Elcin M, Atay YE, Narlicay S, Ataman MB, Bucak MN, 2024a. Effect of Ergothineine and Quercetin Additions in to the In Vitro Embriyo Development. Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 40(2), .

Bodu M, Öztürk AE, Kılınç Z, Hatipoğlu Ö, Ataman MB, Bucak MN, Kul M, 2024b. The effect of lycopene and ascorbic acid on the post thaw Angora buck semen parameters. Journal of Advances in VetBio Science and Techniques, 9(2), 133–42.

Boileau TW-M, Liao Z, Kim S, Lemeshow S, Erdman John W J, Clinton SK, 2003. Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. Journal of the National Cancer Institute, 95(21), 1578–86.

Boquest AC, Abeydeera LR, Wang WH, Day BN, 1999. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. Theriogenology, 51(7), 1311–19.

Borges AA, Santos MVO, Queiroz Neta LB, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF, 2018. In vitro maturation of collared peccary (Pecari tajacu) oocytes after different incubation times. Pesquisa Veterinária Brasileira, 38(09), 1863–68.

Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szöllösi MS, Debey P, 1999. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. Biology of Reproduction, 60(3), 580–7.

Brackett BG, 1978. In vitro fertilization: a potential means for toxicity testing. Environmental Health Perspectives, 24, 65–71.

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA, 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biology of reproduction, 27(1), 147–58.

Brauckman S, 2012. Karl Ernst von Baer (1792-1876) and evolution. International Journal of Developmental Biology, 56(9), .

Brewis IA, Wong CH, 1999. Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. Reviews of Reproduction, 4, 135–42.

Brinkhof B, van Tol HTA, Groot Koerkamp MJA, Wubbolts RW, Haagsman HP, Roelen BAJ, 2017.

Characterization of bovine embryos cultured under conditions appropriate for sustaining human naïve pluripotency. PLoS One, 12(2), e0172920.

Buemo CP, Gambini A, Moro LN, Hiriart MI, Fernández-Martín R, Collas P, Salamone DF, 2016. Embryo aggregation in pig improves cloning efficiency and embryo quality. PLoS One, 11(2), e0146390.

Burke M, Edge R, Land EJ, McGarvey DJ, Truscott TG, 2001. One-electron reduction potentials of dietary carotenoid radical cations in aqueous micellar environments. FEBS letters, 500(3), 132–6.

Campbell BK, Clinton M, Webb R, 2012. The role of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory species (sheep). Endocrinology, 153(9), 4533–43.

Candelaria JI, Rabaglino MB, Denicol AC, 2020. Ovarian preantral follicles are responsive to FSH as early as the primary stage of development. Journal of Endocrinology, 247(2), 153–68.

Cantanhêde LF, Santos-Silva CT, Moura MT, Ferreira-Silva JC, Oliveira JMB, Gonçalves DNA, Teixeira ÁAC, Wanderley-Teixeira V, Oliveira MAL, 2021. Follicle-stimulating hormone mediates the consumption of serum-derived glycogen by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. Veterinary World, 14(9), 2512.

Cao Y, Zhao H, Wang Z, Zhang C, Bian Y, Liu X, Zhang C, Zhang X, Zhao Y, 2020. Quercetin promotes in vitro maturation of oocytes from humans and aged mice. Cell Death & Disease, 11(11), 965.

Carr A, Frei B, 1999. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? The FASEB journal, 13(9), 1007–24.

Chamberlin ME, Dean J, 1990. Human homolog of the mouse sperm receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(16), 6014–18.

Chan CJ, Bevilacqua C, Prevedel R, 2021. Mechanical mapping of mammalian follicle development using Brillouin microscopy. Communications biology, 4(1), 1133.

Chang MC, 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature, 168(4277), 697–98.

Chang MC, 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature, 184(4684), 466–67.

Chauhan MS, Nadir S, Bailey TL, Pryor AW, Butler SP, Notter DR, Velander WH, Gwazdauskas FC, 1999. Bovine follicular dynamics, oocyte recovery, and development of oocytes microinjected with a green fluorescent protein construct. J. Dairy Sci, 82(5), 918–26.

Chaveiro A, Santos P, Carvalhais I, Agrícola R, Faheem M, Habibi A, Moreira da Silva F, 2010. Sire effect and sperm apoptosis on bovine embryonic cleavage and subsequent in vitro embryo development. SRX Veterinary Science, 2010(1), 324529.

Chawalit S, Nguyen NT, Tseng J-K, Lo N-W, Tu C-F, Ju J-C, 2012. Trichostatin A and ascorbic acid assist in the development of porcine handmade cloned embryos via different physiologic pathways. Reproductive Sciences, 19(9), 976–86.

Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee J-H, Krishna MC, Shacter E, Choyke PL, Pooput C, Kirk KL, Buettner GR, 2007. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. PNAS, 104(21), 8749–54.

Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, Khosh DB, Drisko J, Levine M, 2008. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. PNAS, 105(32), 11105–09.

Choudhary KK, Kavya KM, Jerome A, Sharma RK, 2016. Advances in reproductive biotechnologies. Veterinary world, 9(4), 388.

Chowdhury MMR, Choi B-H, Khan I, Lee K-L, Mesalam A, Song S-H, Xu L, Joo M-D, Afrin F, Kong I-K, 2017. Supplementation of lycopene in maturation media improves bovine embryo quality in vitro. Theriogenology, 103, 173–84.

Chowdhury MMR, Mesalam A, Khan I, Joo M, Lee K, Xu L, Afrin F, Kong I, 2018. Improved developmental competence in embryos treated with lycopene during in vitro culture system. Mol Reprod Dev, 85(1), 46–61.

Ciftci MF, Dinc DA, 2023. The effect of different FSH administration before ovum pick up on superstimulation response and oocyte yield. Reprod Dom Anim, 58(8), 1055–62.

Clinton SK, Emenhiser C, Schwartz SJ, Bostwick DG, Williams AW, Moore BJ, Erdman Jr JW, 1996. Cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 5(10), 823–33.

Comizzoli P, Paulson EE, McGinnis LK, 2018. The mutual benefits of research in wild animal species and human-assisted reproduction. J Assist Reprod Genet, 35, 551–60.

Conti M, Franciosi F, 2018. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. Human reproduction update, 24(3), 245–66.

Cooke S, Quinn P, Kime L, Ayres C, Tyler JPP, Driscoll GL, 2002. Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. Fertility and sterility, 78(6), 1254–60.

Crocomo LF, Ariu F, Bogliolo L, Bebbere D, Ledda S, Bicudo SD, 2020. Roscovitine use for the delay of meiotic progression in prepubertal sheep oocytes. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 55, e01585.

Çevik M, 2020. İn Vitro Fertilizasyon Sürecini Etkileyen Faktörler. Turkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics, 6(1), 20–30.

Çizmeci SÜ, Dinc DA, Yesilkaya OF, Ciftci MF, Takcı A, Bucak MN, 2022. Effects of heat-stress on oocyte number and quality and in vitro embryo production in Holstein heifers. Acta Scientiae Veterinariae, 50, .

Çizmeci SÜ, 2022. Ovum Pick Up (OPU) ve İn vitro Embriyo Üretimi (IVEP), Türk Veteriner Jinokoloji Derneği IX. Ulusal & III. Uluslararasi Kongresi, 79–86.

Dalton CM, Szabadkai G, Carroll J, 2014. Measurement of ATP in single oocytes: impact of maturation and cumulus cells on levels and consumption. Journal of cellular physiology, 229(3), 353–61.

Dalvit G, Llanes SP, Descalzo A, Insani M, Beconi M, Cetica P, 2005. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. Reprod Dom Anim, 40(2), 93–7.

Dalvit GC, Cetica PD, Beconi MT, 1998. Effect of α-tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. Theriogenology, 49(3), 619–27.

Damayanti E, Sonjaya H, Baco S, Hasbi H, 2022. The role of antioxidants in improving the quality of bovine embryos produced in vitro. Online Journal of Animal and Feed Research, 12(6), 324–32.

Deka SS, Kalita DJ, Sarma S, Dutta DJ, 2015. In Vitro maturation rate of oocytes collected from indigenous cows of Assam after slaughter. Indian Journal of Animal Research, 49(6), 869–71.

Deng T, Xie J, Ge H, Liu Q, Song X, Hu L, Meng L, Zhang C, 2020. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) enhanced intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryo developmental competence by ameliorating endoplasmic reticulum (ER) stress and inhibiting apoptosis. J Assist Reprod Genet, 37, 119–26.

Denomme MM, White CR, Gillio-Meina C, MacDonald WA, Deroo BJ, Kidder GM, Mann MRW, 2012. Compromised fertility disrupts Peg1 but not Snrpn and Peg3 imprinted methylation acquisition in mouse oocytes. Frontiers in genetics, 3, 129.

Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD, 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. Japi, 52(794804), 4.

Diaz FA, Gutierrez-Castillo EJ, Foster BA, Hardin PT, Bondioli KR, Jiang Z, 2021. Evaluation of seasonal heat stress on transcriptomic profiles and global DNA methylation of bovine oocytes. Frontiers in Genetics, 12, 699920.

Dole G, Nilsson EE, Skinner MK, 2008. Glial-derived neurotrophic factor promotes ovarian primordial follicle development and cell–cell interactions during folliculogenesis. Reproduction (Cambridge, England), 135(5), 671.

Dorice AK, Ferdinand N, Justin K, Augustave K, Linda KK, 2019. Effects of breed, age, body condition score, and nutritional status on follicular population, oocyte yield, and quality in three Cameroonian zebus cattle Bos indicus. Advances in Agriculture, 2019(1), 2979740.

Du J, Martin SM, Levine M, Wagner BA, Buettner GR, Wang S, Taghiyev AF, Du C, Knudson CM, Cullen JJ, 2010. Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. Clinical Cancer Research, 16(2), 509–20.

El AA-HH, Mahmoud KM, Sosa GAM, Abouel-Roos MEA, Ahmed YF, 2017. Effect of using ascorbic acid and cysteamine supplementation on in-vitro development of buffalo embryos. Asian Pacific Journal of Reproduction, 6(2), 85–8.

Eppig JJ, 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. Reproduction, Fertility and Development, 8(4), 485–89.

Fagbohun CF, Downs SM, 1992. Requirement for glucose in ligand-stimulated meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. Reproduction, 96(2), 681–97.

Feugang JM, Camargo-Rodríguez O, Memili E, 2009. Culture systems for bovine embryos. Livestock Science, 121(2–3), 141–9.

First NL, 1988. Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. Prog. Clin. Biol. Res., 267, 1.

Fisher HM, Aitken RJ, 1997. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. Journal of Experimental Zoology, 277(5), 390–400.

Fraser LR, 1998. Sperm capacitation and the acrosome reaction. Human Reproduction, 13(suppl_1), 9–19.

Frei B, England L, Ames BN, 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. PNAS, 86(16), 6377–81.

Fry RC, Niall EM, Simpson TL, Squires TJ, Reynolds J, 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. Theriogenology, 47(5), 977–87.

Fry RC, Simpson TL, Squires TJ, 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. Theriogenology, 49(6), 1077–82.

Fuhrman B, Elis A, Aviram M, 1997. Hypocholesterolemic effect of lycopene and β-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. Biochemical and biophysical research communications, 233(3), 658–62.

Funahashi H, 2013. What is the optimal condition for fertilization of IVM oocytes? Reprod Med Biol, 12(1), 15–20.

Gandolfi F, Moor RM, 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. Reproduction, 81(1), 23–8.

García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Jiménez-Rabadán P, Ramón M, Del Olmo E, Iniesta-Cuerda M, Anel-López L, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ, 2015. Effect of different media additives on capacitation of frozen–thawed ram spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum. Theriogenology, 84(6), 948–55.

Gęgotek A, Skrzydlewska E, 2022. Antioxidative and anti-inflammatory activity of ascorbic acid. Antioxidants, 11(10), 1993.

Gilchrist RB, Zeng HT, Wang X, Richani D, Smitz J, Thompson JG, 2015. Reevaluation and evolution of the simulated physiological oocyte maturation system. Theriogenology, 84(4), 656–57.

Goff AK, Yang Z, Cortvrindt R, Smitz J, Miron P, 2001. Protein synthesis during maturation of bovine oocytes, effect of epidermal growth factor. Reprod Dom Anim, 36(1), 19–24.

Gonzalez Andueza S, Azari-Dolatabad N, Benedetti C, Fernandez A, Angel-Velez D, Sadeghi H, Malledevarahalli S, Opsomer G, Van Soom A, Pascottini OB, 2022. Lycopene supplementation to serum-free embryo culture medium and its effect on development and quality of bovine blastocysts produced in vitro. Reprod Dom Anim, 57(10), 1277–79.

Gordon I, 2003. Laboratory production of cattle embryos Cabi.

Gordon I, 2004. In vitro embryo production. Reproductive technologies in farm animals. CABI Publishing Wallingford UK; 108–39,

Gordon I, 2017. Reproductive technologies in farm animals.

Gödöny K, Herczeg R, Gyenesei A, Várnagy Á, Bognár Z, Kovács GL, Szekeres-Barthó J, Mauchart P, Nagy B, Erostyák J, 2024. Clinical Benefits of Decreased Photo-Oxidative Stress on Human Embryo Development. Medical Principles and Practice, 33(2), 112–21.

Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y, 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Human reproduction update, 7(2), 175–89.

Guler C, Melil S, Ozekici U, Donmez Cakil Y, Selam B, Cincik M, 2021. Sperm selection and embryo development: a comparison of the density gradient centrifugation and microfluidic chip sperm preparation methods in patients with astheno-teratozoospermia. Life, 11(9), 933.

Gwaid SA, Reda A, Aggag M, Abdelghafar A, 2023. In vitro maturation (IVM) of camel oocytes using different maturation media. Benha Veterinary Medical Journal, 44(1), 30–3.

Habeeb IA, Hussain SO, 2018. Comparative study between two media on in vitro maturation rate of local buffalo oocytes. Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences, 17(1), .

Hadley CW, Clinton SK, Schwartz SJ, 2003. The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage. The Journal of nutrition, 133(3), 727–32.

Halliwell B, 1995a. How to characterize an antioxidant: an update. Biochemical Society Symposia. 73–101, Portland Press Limited;

Halliwell B, 1995b. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. Biochemical pharmacology, 49(10), 1341–48.

Halliwell B, Gutteridge JM, 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. Free radical biology & medicine, 18(1), 125–26.

Halliwell B, Gutteridge JMC, 2015. Free radicals in biology and medicine Oxford university press, USA.

Hammad EM, El-Ratel IT, Gad MA, 2014. Efficacy of different collection techniques on yield and quality of egyptian buffalo oocytes. Journal of Animal and Poultry Production, 5(7), 413–22.

Han NR, Baek S, Lee Y, Lee J, Im Yun J, Lee E, Lee ST, 2019. Establishment of in-vitro culture system for enhancing production of somatic cell nuclear transfer (SCNT) blastocysts with high performance in the colony formation and formation of colonies derived from SCNT blastocysts in pigs. Journal of Animal Reproduction and Biotechnology, 34(2), 130–38.

Han R, Wul Y, Feng J, Ai X, Zhang J, Skibsted LH, 2004. Radical Cation Generation from Singlet and Triplet Excited States of All-trans-Lycopene in Chloroform¶. Photochemistry and photobiology, 80(2), 326–33.

Han SJ, Conti M, 2006. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. Cell cycle, 5(3), 227–31.

Hantz HL, Young LF, Martin KR, 2005. Physiologically attainable concentrations of lycopene induce mitochondrial apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. Experimental biology and medicine, 230(3), 171–79.

Haraguchi T, Koujin T, Shindo T, Bilir Ş, Osakada H, Nishimura K, Hirano Y, Asakawa H, Mori C, Kobayashi S, 2022. Transfected plasmid DNA is incorporated into the nucleus via nuclear envelope reformation at telophase. Communications Biology, 5(1), 78.

Hardy K, Winston RML, Handyside AH, 1993. Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos in vitro: failure of cytokinesis during early cleavage. Reproduction, 98(2), 549–58.

Harkness L, Chen X, Gillard M, Gray PP, Davies AM, 2019. Media composition modulates human embryonic stem cell morphology and may influence preferential lineage differentiation potential. PLoS One, 14(3), e0213678.

Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N, 2000. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus–oocyte complexes. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete

Research, 57(4), 353–60.

Hasler JF, 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminisces. Theriogenology, 81(1), 152–69.

Hasler JF, Barfield JP, 2021. In vitro fertilization. Bovine reproduction, 1124–41.

Hasler JF, Stokes JE, 2012. 222 effect of the presence or absence of percoll centrifugation; penicillamine, hypotaurine, and epinephrine; and heparin on in vitro production of bovine embryos. Reproduction, Fertility and Development, 25(1), 259.

Hattersley N, Cheerambathur D, Moyle M, Stefanutti M, Richardson A, Lee K-Y, Dumont J, Oegema K, Desai A, 2016. A nucleoporin docks protein phosphatase 1 to direct meiotic chromosome segregation and nuclear assembly. Developmental cell, 38(5), 463–77.

Hernández-González EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, López-González I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A, Visconti PE, 2006. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. Journal of Biological Chemistry, 281(9), 5623–33.

Hoque SAM, Kabiraj SK, Khandoker MAMY, Mondai A, Tareq KMA, 2011. Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, in vitro maturation and fertilization of goat oocytes. African Journal of Biotechnology, 10(45), 9177–81.

Hossein MS, Kim YW, Park SM, Koo OJ, Hashem MA, Bhandari DP, Jeong YW, Kim S, Kim JH, Lee EG, 2007. Antioxidant favors the developmental competence of porcine parthenogenotes by reducing reactive oxygen species. Asian-Aust. J. Anim. Sci, 20(3), 334–39.

Hunter RHF, 1996. Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 44(3), 417–22.

Hutt KJ, Albertini DF, 2007. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. Reproductive biomedicine online, 14(6), 758–64.

Hwang E, Bowen PE, 2005. Effects of lycopene and tomato paste extracts on DNA and lipid oxidation in LNCaP human prostate cancer cells. Biofactors, 23(2), 97–105.

Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M, 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. J Clin Invest, 120(4), 984–94.

Imai K, Matoba S, Dochi O, Shimohira I, 2002. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. Journal of Veterinary Medical Science, 64(10), 887–91.

Iqbal S, Naz S, Bhutta MF, Sufyan A, Awan MA, 2022. Antioxidant effect of Moringa olifera leaves extract in extender improves post-thaw quality, kinematics, lipid peroxidation, total antioxidant capacity and fertility of water buffalo bull semen. Andrologia, 54(1), e14300.

Iritani A, Niwa K, 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. Reproduction, 50(1), 119–21.

Jansen S, Esmaeilpour T, Pantaleon M, Kaye PL, 2006. Glucose affects monocarboxylate cotransporter (MCT) 1 expression during mouse preimplantation development. Reproduction, 131(3), 469–79.

Jiang Y, He Y, Pan X, Wang P, Yuan X, Ma B, 2023. Advances in oocyte maturation in vivo and in vitro in mammals. Int. J. Mol. Sci, 24(10), 9059.

Jöchle W, 1999. Observations on Animals and on Animal Physiology in Herodotus' The Histories: Facts and Fancies. Perspectives in Biology and Medicine, 42(4), 496–506.

Joshi B, Kar SK, Yadav PK, Yadav S, Shrestha L, Bera TK, 2020. Therapeutic and medicinal uses of lycopene: a systematic review. Int J Res Med Sci, 8(3), 1195.

Kallajoki M, Virtanen I, Suominen J, 1986. The fate of acrosomal staining during the acrosome reaction of human spermatozoa as revealed by a monoclonal antibody and PNA-lectin. International journal of Andrology, 9(3), 181–94.

Kang H-G, Lee S, Jeong P-S, Kim MJ, Park S-H, Joo YE, Park SH, Song B-S, Kim S-U, Kim MK,

2021. Lycopene improves in vitro development of porcine embryos by reducing oxidative stress and apoptosis. Antioxidants, 10(2), 230.

Kang J-T, Moon JH, Choi J-Y, Park SJ, Kim SJ, Saadeldin IM, Lee BC, 2016. Effect of antioxidant flavonoids (quercetin and taxifolin) on in vitro maturation of porcine oocytes. Asian-Aust. J. Anim. Sci, 29(3), 352.

Kang S-S, Koyama K, Huang W, Yang Y, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M, 2015. Addition of D-penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE) mixture to IVF medium maintains motility and longevity of bovine sperm and enhances stable production of blastocysts in vitro. Journal of Reproduction and Development, 61(2), 99–105.

Karas M, Amir H, Fishman D, Danilenko M, Segal S, Nahum A, Koifmann A, Giat Y, Levy J, Sharoni Y, 2000. Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. Nutrition and cancer, 36(1), 101–11.

Karasahin T, Alkan H, Satilmis F, Dursun S, Ozturk C, Bulut G, Aksoy NH, Tekindal MA, Caglayan T, Yesilkaya OF, 2021. Relationship between total antioxidant/oxidant status, and oxidative stress index and superovulation response in donor cows. Livestock Science, 244, 104340.

Kawakami E, Ohashi T, Hori T, Tsutsui T, 2002. Influence of canine cumulus oophorus on homologous sperm motility. Journal of veterinary medical science, 64(10), 867–72.

Kaymaz M, 2015. Yardımcı üreme teknikleri. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. 2rd ed, Medipres, Malatya, Bölüm VI, 695–811.

Kelly JM, Kleemann DO, Rudiger SR, Walker SK, 2007. Effects of grade of oocyte–cumulus complex and the interactions between grades on the production of blastocysts in the cow, ewe and lamb. Reprod Dom Anim, 42(6), 577–82.

Khan IQ, Samad HA, Rehman NU, 1997. Quantity and quality of buffalo follicular oocytes recovered by aspiration and scoring methods for in vitro studies. Pakistan Veterinary Journal, 17, 187–89.

Khatib H, Huang W, Wang X, Tran AH, Bindrim AB, Schutzkus V, Monson RL, Yandell BS, 2009. Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. J. Dairy Sci, 92(5), 2238–47.

Kidder GM, Vanderhyden BC, 2010. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. Can. J. Physiol. Pharmacol, 88(4), 399–413.

Kikuchi K, Nakai M, Kashiwazaki N, Kaneko H, 2011. Xenografting of gonadal tissues into mice as a possible method for conservation and utilization of porcine genetic resources. Animal science journal, 82(4), 495–503.

Kim MS, Bae CY, Wee G, Han Y, Park J, 2009. A microfluidic in vitro cultivation system for mechanical stimulation of bovine embryos. Electrophoresis, 30(18), 3276–82.

Kirillova A, Smitz JEJ, Sukhikh GT, Mazunin I, 2021. The role of mitochondria in oocyte maturation. Cells, 10(9), 2484.

Kishimoto T, Kanatani H, 1980. Induction of oocyte maturation by disulfide-reducing agent in the sea cucumber, Stichopus japonicus. Develop., Growth and Differ, 22(2), 163–67.

Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T, 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. Theriogenology, 62(7), 1186–97.

Kılıçoğlu Ç, 1985. Long-Term Preservation of Frozen Embryos. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 25(1–4), 42–55.

Kleinschnitz K, Vießmann N, Jordan M, Heidmann SK, 2020. Condensin I is required for faithful meiosis in Drosophila males. Chromosoma, 129(2), 141–60.

Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H, 1994. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor-α on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. Reproduction, 100(2), 439–46.

Kochan J, Nowak A, Młodawska W, Prochowska S, Partyka A, Skotnicki J, Niżański W, 2020. Comparison of the morphology and developmental potential of oocytes obtained from prepubertal

and adult domestic and wild cats. Animals, 11(1), 20.

Kocyigit A, Cevik M, 2015. Effects of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor-I on the cell allocation and cryotolerance of bovine blastocysts. Cryobiology, 71(1), 64–9.

Koçyiğit A, 2014. Sığır embriyosunun in vitro üretimi ve vitrifikasyonunda sitokin (LIF) ve büyüme faktörünün (IGF-1) etkileri DoktoraTezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

Korkmaz Ö, Küplülü Ş, Ağca Y, Polat IM, 2013. Effect of oocyte quality and activation protocols on bovine embryo development following intracytoplasmic sperm injection. Turk J Vet Anim Sci, 37(1), 26–30.

Kropp J, Peñagaricano F, Salih SM, Khatib H, 2014. Invited review: Genetic contributions underlying the development of preimplantation bovine embryos. J. Dairy Sci, 97(3), 1187–1201.

Kujawska M, Ewertowska M, Adamska T, Sadowski C, Ignatowicz E, Jodynis-Liebert J, 2014. Antioxidant effect of lycopene-enriched tomato paste on N-nitrosodiethylamine-induced oxidative stress in rats. J Physiol Biochem, 70, 981–90.

Kuroda Y, Kaneko S, Oda T, Yoshimura Y, Nozawa S, 1998. Quantitative assessment of human sperm acrosome reaction by using fluorescein isothiocyanate conjugated concanavalin A—comparison between highly purified acrosome reacted with non-acrosome reacted sperm. Archives of andrology, 40(3), 215–24.

Kurutas EB, 2015. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. Nutrition journal, 15, 1–22.

La Fuente R, Eppig JJ, 2001. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. Developmental biology, 229(1), 224–36.

Laufer N, Botero-Ruiz W, DeCherney AH, Haseltine F, Polan ML, Behrman HR, 1984. Gonadotropin and prolactin levels in follicular fluid of human ova successfully fertilized in vitro. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 58(3), 430–34.

Leese HJ, Conaghan J, Martin KL, Hardy K, 1993. Early human embryo metabolism. Bioessays, 15(4), 259–64.

Leonardo da V, 2016a. Notebooks of Anatomy. Vol. III. Sheets of the Royal Library of Windsor, Organs of Generation, Embryo (First Figure). Longo, Lawrence D., and Reynolds, LP. Wombs with a View: Illustrations of the Gravid Uterus from the Renaissance through the Nineteenth Century. Springer.

Leonardo da V, 2016b. Notebooks of Anatomy. Vol. III. Sheets of the Royal Library of Windsor, Organs of Generation, Embryo (Second Figure). Longo, Lawrence D., and Reynolds, LP. Wombs with a View: Illustrations of the Gravid Uterus from the Renaissance through the Nineteenth Century. Springer.

Levin G, Yeshurun M, Mokady S, 1997. In vivo antiperoxidative effect of 9-cis β-carotene compared with that of the all-trans isomer. Nutrition and Cancer, 27(3), 293–97

Li J, Maeji M, Balboula AZ, Aboelenain M, Fujii T, Moriyasu S, Bai H, Kawahara M, Takahashi M, 2020. Dynamic status of lysosomal cathepsin in bovine oocytes and preimplantation embryos. Journal of Reproduction and Development, 66(1), 9–17.

Li Q, Wang Y-S, Wang L-J, Zhang H, Li R-Z, Cui C-C, Li W-Z, Zhang Y, Jin Y-P, 2014. Vitamin C supplementation enhances compact morulae formation but reduces the hatching blastocyst rate of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. Cellular Reprogramming, 16(4), 290–97.

Li R, Liu Y, Pedersen HS, Callesen H, 2015. Effect of ambient light exposure of media and embryos on development and quality of porcine parthenogenetically activated embryos. Zygote, 23(3), 378–83.

Liu C, Russell RM, Wang X-D, 2006. Lycopene supplementation prevents smoke-induced changes in p53, p53 phosphorylation, cell proliferation, and apoptosis in the gastric mucosa of ferrets. The Journal of nutrition, 136(1), 106–11.

Liu S, Lin C, Qu H, Sun J, Ru X, Sun L, Zhang L, Zhang T, Zhou Y, Yang H, 2019. Changes in key enzyme activities and metabolites during in vitro maturation of Apostichopus japonicus oocyte

under desiccation stress. Aquaculture Research, 50(2), 400–11.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N, 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy reviews, 4(8), 118.

Lohka MJ, Maller JL, 1985. Induction of nuclear envelope breakdown, chromosome condensation, and spindle formation in cell-free extracts. The Journal of cell biology, 101(2), 518–23.

Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P, 1997. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. Reproduction, 109(2), 355–65.

Los Santos MJ, Mercader A, Francés A, Portolés E, Remohí J, Pellicer A, Simón C, 1996. Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. Biology of Reproduction, 54(3), 563–74.

Lottero-Leconte R, Alonso CAI, Castellano L, Martinez SP, 2017. Mechanisms of the sperm guidance, an essential aid for meeting the oocyte. Transl Cancer Res, 6(Suppl 2), .

Loutradis D, Kiapekou E, Zapanti E, Antsaklis A, 2006. Oocyte maturation in assisted reproductive techniques. Ann. N.Y. Acad. Sci, 1092(1), 235–46.

Lu KH, Gordon I, Gallagher M, McGovern H, 1988. Production of cattle embryos by in vitro and in vivo culture. Proceedings of the British Society of Animal Production (1972), 1988, 53.

Lv B, Liu C, Chen Y, Qi L, Wang L, Ji Y, Xue Z, 2019. Light-induced injury in mouse embryos revealed by single-cell RNA sequencing. Biological Research, 52, 1–8.

Ma J-K, Saad Eldin WF, El-Ghareeb WR, Elhelaly AE, Khedr MHE, Li X, Huang X-C, 2019. Effects of pyrene on human liver HepG2 cells: Cytotoxicity, oxidative stress, and transcriptomic changes in xenobiotic metabolizing enzymes and inflammatory markers with protection trial using lycopene. BioMed Research International, 2019(1), 7604851.

Machado MF, Caixeta ES, Sudiman J, Gilchrist RB, Thompson JG, Lima PF, Price CA, Buratini J, 2015. Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro–produced embryos in cattle. Theriogenology, 84(3), 390–98.

Machatkova M, Horakova J, Hulinska P, Reckova Z, Hanzalova K, 2008. Early oocyte penetration can predict the efficiency of bovine embryo production in vitro. Zygote, 16(3), 203–09.

Macías-García B, Macedo S, Rocha A, Gonzalez-Fernandez L, 2017. Fetal bovine serum is associated with polar body degeneration after in vitro maturation of bovine oocytes. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 68(3), 279–84.

Maddahi A, Saberivand A, Hamali H, Jafarpour F, Saberivand M, 2024. Exploring the impact of heat stress on oocyte maturation and embryo development in dairy cattle using a culture medium supplemented with vitamins E, C, and coenzyme Q10. Journal of Thermal Biology, 119, 103759.

Makarevich A V, 2012. 8 Quality Assessment of Mammalian Preimplantation Embryos. Jozef Laurinčík et al., 115.

Makita M, Ueda M, Miyano T, 2016. The fertilization ability and developmental competence of bovine oocytes grown in vitro. Journal of Reproduction and Development, 62(4), 379–384.

Maksura H, Akon N, Islam MN, Akter I, Modak AK, Khatun A, Alam MH, Hashem MA, Amin MR, Moniruzzaman M, 2021. Effects of estradiol on in vitro maturation of buffalo and goat oocytes. Reprod Med Biol, 20(1), 62–70.

Mansor MW, 2019. Effect of season and ovarian morphology of Egyptian buffalo on oocyte quality and in vitro maturation rate. Journal of Current Veterinary Research, 1(1), 34–41.

Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F, 2014. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. Reproductive biomedicine online, 28(3), 284–99.

Marnett LJ, 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. Mutation Research, 424(1–2), 83–95.

Marques MG, de Barros FRO, Goissis MD, Giassetti MI, Assumpção MEOD, Visintin JA, 2015. Effect of oocyte recovery techniques on in vitro production of swine embryos. Open Journal of Animal Sciences, 5(4), 467–73.

Maya-Soriano MJ, Taberner E, López-Béjar M, 2013. Retinol improves in vitro oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. Zygote, 21(4), 377–84.

McKim KS, Ko Jang J, Theurkauf WE, Scott Hawley R, 1993. Mechanical basis of meiotic metaphase arrest. Nature, 362(6418), 364–66.

Mehlmann LM, 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. Reproduction, 130(6), 791–99.

Mehta JG, 2013. Media and Quality Control in. IVF Techniques for the Beginners, 36.

Mehta SK, Gowder SJT, 2015. Members of antioxidant machinery and their functions. Basic principles and clinical significance of oxidative stress, 11, 59–85.

Mein JR, Lian F, Wang X-D, 2008. Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention. Nutrition reviews, 66(12), 667–83.

Meulmeester FL, Luo J, Martens LG, Mills K, van Heemst D, Noordam R, 2022. Antioxidant supplementation in oxidative stress-related diseases: What have we learned from studies on alpha-tocopherol? Antioxidants, 11(12), 2322.

Mittal S, Gupta P, Malhotra N, Singh N, 2014. Serum estradiol as a predictor of success of in vitro fertilization. The Journal of Obstetrics and Gynecology of India, 64, 124–29.

Moawad AR, Fernandez MC, Scarlata E, Dodia C, Feinstein SI, Fisher AB, O'Flaherty C, 2017. Deficiency of peroxiredoxin 6 or inhibition of its phospholipase A2 activity impair the in vitro sperm fertilizing competence in mice. Scientific Reports, 7(1), 12994.

Monaghan P, Carolan C, Lonergan P, Sharif H, Wahid H, Gordon I, 1993. The effect of maturation time on the subsequent in vitro development of bovine oocytes. Theriogenology, 39(1), 270.

Mortensen A, 2006. Carotenoids and other pigments as natural colorants. Pure Appl. Chem, 78(8), 1477–91.

Motlik J, Crozet N, Fulka J, 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. Reproduction, 72(2), 323–28.

Mulukutla S, Riddle J, Heberling L, 2015. Vitamin C in Fruits: Does Organic Make a Difference? Journal of Emerging Investigators, 21, 1–5.

Murakami M, Otoi T, Karja NWK, Ooka A, Suzuki T, 2002. Effects of serum-free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization. Reprod Dom Anim, 37(6), 352–56.

Nagai T, 2001. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. Theriogenology, 55(6), 1291–1301.

Nagina G, Asima A, Nemat U, Shamim A, 2016. Effect of melatonin on maturation capacity and fertilization of Nili-Ravi buffalo (Bubalus bubalis) oocytes. Open veterinary journal, 6(2), 128–34.

Naib A, Hanrahan JP, Lonergan P, Fair S, 2011. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. Theriogenology, 76(1), 161–67.

Nakagawa A, Leibo SP, 1997. Influence of luteinizing hormone on nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. Theriogenology, 1(47), 198.

Namgoong S, Kim N-H, 2016. Roles of actin binding proteins in mammalian oocyte maturation and beyond. Cell Cycle, 15(14), 1830–43.

Navarrete FA, García-Vázquez FA, Alvau A, Escoffier J, Krapf D, Sánchez-Cárdenas C, Salicioni AM, Darszon A, Visconti PE, 2015. Biphasic role of calcium in mouse sperm capacitation signaling pathways. Journal of cellular physiology, 230(8), 1758–69.

New DAT, 1978. Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. Biological Reviews, 53(1), 81–122.

Nilsson E, Rogers N, Skinner MK, 2007. Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. Reproduction, 134(2), 209–21.

Nimse SB, Pal D, 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC advances, 5(35), 27986–28006.

Novita CI, Eriani K, Sutriana A, Siregar TN, Karja NW, 2024. Quality of aceh cattle ovaries added with bovine pituitary extract in the vitrification medium. Adv. Anim. Vet. Sci, 12(4), 624–28.

Obermüller-Jevic UC, Olano-Martin E, Corbacho AM, van der Vliet A, Valacchi G, Cross CE, Eiserich JP, Packer L, 2003. Lycopene inhibits the growth of normal human prostate epithelial cells in vitro. The Journal of nutrition, 133(11), 3356–60.

Ochiai J, Villanueva L, Niihara H, Niihara Y, Oliva J, 2022. Posology and Serum-/Xeno-Free Engineered Adipose Stromal Cells Cell Sheets. Front. Cell Dev. Biol, 10, 873603.

Oegema K, Hyman T, 2006. Cell division. WormBook: The Online Review of C. elegans Biology.

Paramio M, Izquierdo D, 2014. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. Reprod Dom Anim, 49, 37–48.

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A, 2017. Oxidative stress: harms and benefits for human health. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017(1), 8416763.

Poetz F, Lebedeva S, Schott J, Lindner D, Ohler U, Stoecklin G, 2022. Control of immediate early gene expression by CPEB4-repressor complex-mediated mRNA degradation. Genome Biology, 23(1), 193.

Pool-Zobel BL, Bub A, Müller H, Wollowski I, Rechkemmer G, 1997. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. Carcinogenesis, 18(9), 1847–50.

Prima BR, Hestiantoro A, Gunardi ER, Saroyo YB, Natadisastra M, 2022. Estradiol on Day Seven is a Good Predictor for Oocyte Maturation Rate in In Vitro Fertilization Program. Indonesian Journal Of Obstetrics and Gynecology, 91-4.

Quetglas MD, Adona PR, De Bem THC, Pires PRL, Leal CLV, 2010. Effect of Cyclin-dependent Kinase (CDK) Inhibition on Expression, Localization and Activity of Maturation Promoting Factor (MPF) and Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) in Bovine Oocytes. Reprod Dom Anim, 45(6), 1074–81.

Racowsky C, Vernon M, Mayer J, Ball GD, Behr B, Pomeroy KO, Wininger D, Gibbons W, Conaghan J, Stern JE, 2010. Standardization of grading embryo morphology. J Assist Reprod Genet, 27, 437–39.

Rahman MM, Rahman MM, Juyena NS, Bhuiyan MMU, 2020. Optimization of in vitro fertilization technique for oocytes of indigenous zebu cows. J Anim Reprod Biotechnol, 35(2), 142–48.

Rakha BA, Ansari MS, Zuha S, Akhter S, 2023. Effect of ascorbic acid on metabolic status, lipid peroxidation, antioxidant activity and quality of frozen Indian red jungle fowl (Gallus gallus murghi) semen. Reprod Dom Anim, 58(9), 1199–206.

Rao A V, Agarwal S, 1998. Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer.

Rao AV, Rao LG, 2007. Carotenoids and human health. Pharmacological research, 55(3), 207–16.

Rao AV, Ray MR, Rao LG, 2006. Lycopene. Advances in food and nutrition research, 51, 99–164.

Raty S, Walters EM, Davis J, Zeringue H, Beebe DJ, Rodriguez-Zas SL, Wheeler MB, 2004. Embryonic development in the mouse is enhanced via microchannel culture. Lab on a Chip, 4(3), 186–90.

Read CC, Willhelm G, Dyce PW, 2018. Connexin 43 coupling in bovine cumulus cells, during the follicular growth phase, and its relationship to in vitro embryo outcomes. Molecular Reproduction and Development, 85(7), 579–89.

Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA, 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochimica et Biophysica Acta, 1863(12), 2977–92.

Residiwati G, Azari-Dolatabad N, Tuska HSA, Sidi S, Van Damme P, Benedetti C, Montoro AF, Luceno NL, Pavani KC, Opsomer G, 2021. Effect of lycopene supplementation to bovine oocytes exposed to heat shock during in vitro maturation. Theriogenology, 173, 48–55.

Reyes JM, Ross PJ, 2016. Cytoplasmic polyadenylation in mammalian oocyte maturation. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 7(1), 71–89.

Rizvi SI, Pandey KB, Jha R, Maurya PK, 2009. Ascorbate recycling by erythrocytes during aging in humans. Rejuvenation research, 12(1), 3–6.

Ros VG, Munuce MJ, Cohen DJ, Marín-Briggiler CI, Busso D, Visconti PE, Cuasnicú PS, 2004. Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. Biology of reproduction, 70(5), 1325–32.

Rubinstein S, Breitbart H, 1991. Role of spermine in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. Biochemical Journal, 278(1), 25–28.

Russell DF, Baqir S, Bordignon J, Betts DH, 2006. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. Molecular Reproduction and Development, 73(10), 1255–70.

Saeki K, Nagao Y, Hoshi M, Nagai M, 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. Theriogenology, 43(4), 751–59.

Sağırkaya H, Üstüner B, 2010. Replacement of fetal calf serum with two different synthetic sera in in vitro maturation medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of cattle oocytes in vitro. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 29(2), 51–7.

Sağırkaya H, Yağmur M, Nur Z, Soylu MK, 2004. Replacement of fetal calf serum with synthetic serum substitute in the in vitro maturation medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of cattle oocytes in vitro. Turk J Vet Anim Sci, 28(4), 779–84.

Saleh WM, 2017. Assessment of different methods of bovine oocytes collection, maturation and Invitro fertilization of abattoir specimens. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, 31(1), 55–65.

Sarıözkan S, 2004. Fertilization and In Vitro Maturation of Livestock (A Review). Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 44(2), 47–52.

Sasamoto Y, Sakaguchi M, Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y, 2004. Follicular development after ovum pick-up and fertilizability of retrieved oocytes in postpartum dairy cattle. Japanese Journal of Veterinary Research, 51(3–4), 151–59.

Satılmış F, 2019. Farklı Antioksidanların (Pentoksifilin ve Borik Asit) İn Vitro Sığır Embriyo Kültür Medyumlarına İlavesinin Embriyo Gelişimi ve Kalitesi Üzerine Etkileri, DoktoraTezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Schenk C, 1880. Topographical Report of a Part of Greenup and Lawrence Counties for the Year 1874 Yeoman Press.

Seaby RP, Mackie P, King WA, Mastromonaco GF, 2012. Investigation into developmental potential and nuclear/mitochondrial function in early wood and plains bison hybrid embryos. Reprod Dom Anim, 47(4), 644–54.

Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Şirvanlı A, Köker A, 2015. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. Medipres Matbaacılık, Malatya, Türkiye.

Sha W, Xu B-Z, Li M, Liu D, Feng HL, Sun Q-Y, 2010. Effect of gonadotropins on oocyte maturation in vitro: an animal model. Fertility and sterility, 93(5), 1650–61.

Sharma RK, Agarwal A, 2004. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. Reprod Med Biol, 3, 177–99.

Shimakawa S, Yoshida Y, Niki E, 2003. Antioxidant action of a lipophilic nitroxyl radical, cyclohexane-1-spiro-2′-(4′-oxyimidazolidine-1′-oxyl)-5′-spiro-1 ″-cyclohexane, against lipid peroxidation under hypoxic conditions. Lipids, 38(3), 225–31.

Sidi S, Pascottini OB, Angel-Velez D, Azari-Dolatabad N, Pavani KC, Residiwati G, Meese T, Van Nieuwerburgh F, Kambai Bawa E, Alikidon Voh A, 2022. Lycopene supplementation to serum-free maturation medium improves in vitro bovine embryo development and quality and modulates embryonic transcriptomic profile. Antioxidants, 11(2), 344.

Siler U, Barella L, Spitzer V, Schnorr J, Lein M, Goralczyk R, Wertz K, 2004. Lycopene and vitamin E interfere with autocrine/paracrine loops in the Dunning prostate cancer model. The FASEB journal, 18(9), 1019–21.

Silvestri G, Rathje CC, Harvey SC, Gould RL, Walling GA, Ellis PJI, Harvey KE, Griffin DK, 2021. Identification of optimal assisted aspiration conditions of oocytes for use in porcine in vitro

maturation: A re-evaluation of the relationship between the cumulus oocyte complex and oocyte quality. Veterinary Medicine and Science, 7(2), 465–73.

Sirard M-A, 2016. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. Theriogenology, 86(1), 54–61.

Sirard MA, 1989. Practical aspects of in-vitro fertilization in cattle. Journal of Reproduction and Fertility, 38, 127-34

Sirard MA, Blondin P, 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. Anim Reprod Sci, 42(1–4), 417–26.

Sirmali R, Giniş Z, Sirmali M, Solak O, Şeliman B, Ağaçkiran Y, Delibaş N, 2014. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role on pulmonary contusion experimental model. Turkish Journal of Medical Sciences, 44(6), 905–13.

Snyers L, Löhnert R, Weipoltshammer K, Schöfer C, 2022. Emerin prevents BAF-mediated aggregation of lamin A on chromosomes in telophase to allow nuclear membrane expansion and nuclear lamina formation. Molecular Biology of the Cell, 33(14), ar137.

Sollecito N V, Pereira ECM, Grázia JG V, Neves BP, Couto BVR, Andrade VB, Miranda MS, Silva JKR, Borges AM, 2019. Antioxidant activity of oily extract obtained from Lippia origanoides improves the quality of bovine embryos produced in vitro. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 71, 723–31.

Sovernigo TC, Adona PR, Monzani PS, Guemra S, Barros FDA, Lopes FG, Leal CL V, 2017. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. Reprod Dom Anim, 52(4), 561–69.

Sreenivas D, DSVGK K, Yarla NS, Thomas VM, PalniSamy A, Vadlapudi VR, Preethi R, 2014. In vitro production of sheep embryos in CR1aa medium supplemented with L-Ascorbic Acid. J Tissue Sci Eng, 5(131), 2.

Stival C, Puga Molina L del C, Paudel B, Buffone MG, Visconti PE, Krapf D, 2016. Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. Sperm acrosome biogenesis and function during fertilization, 93–106.

Suthar VS, Shah RG, 2009. Bovine in vitro embryo production: An overview. Veterinary world, 2(12), 478–79.

Suwik K, Sinderewicz E, Boruszewska D, Kowalczyk-Zięba I, Staszkiewicz-Chodor J, Łukaszuk K, Wocławek-Potocka I, 2020. mRNA expression and role of PPARγ and PPARδ in bovine preimplantation embryos depending on the quality and developmental stage. Animals, 10(12), 2358.

Swamy AHMV, Wangikar U, Koti BC, Thippeswamy AHM, Ronad PM, Manjula D V, 2011. Cardioprotective effect of ascorbic acid on doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. Indian journal of pharmacology, 43(5), 507–11.

Şen U, Kuran M, 2018. Low incubation temperature successfully supports the in vitro bovine oocyte maturation and subsequent development of embryos. Asian-Aust. J. Anim. Sci, 31(6), 827.

Takahashi T, Morrow JD, Wang H, Dey SK, 2006. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. Journal of Biological Chemistry, 281(48), 37117–37129.

Takahashi Y, Kanagawa H, 1998. Effect of oxygen concentration in the gas atmosphere during in vitro insemination of bovine oocytes on the subsequent embryonic development in vitro. Journal of veterinary medical science, 60(3), 365–67.

Tariq SA, 2007. Role of ascorbic acid in scavenging free radicals and lead toxicity from biosystems. Molecular biotechnology, 37(1), 62–5.

Tekeli T, 1984. Investigations on in vitro fertilisation of rabbit ova. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 31(2), 186-96

Tekeli T, 1992. The effect of EDTA on the development of mouse eggs fertilized in vitro. Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 8(1), 25–7.

Tekeli T, Güler M, Aksoy M, 1990. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. Eurasian Journal

of Veterinary Sciences, 6(1), 13–5.

Thomas AD, Meyers SA, Ball BA, 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. Theriogenology, 65(8), 1531–50.

Torres-Osorio V, Urrego R, Echeverri-Zuluaga JJ, López-Herrera A, 2019. Oxidative stress and antioxidant use during in vitro mammal embryo production. Review. Revista mexicana de ciencias pecuarias, 10(2), 433–59.

Toshimori K, 1998. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. Cell and Tissue Research, 293, 177–87.

Tronci L, Serreli G, Piras C, Frau DV, Dettori T, Deiana M, Murgia F, Santoru ML, Spada M, Leoni VP, 2021. Vitamin C cytotoxicity and its effects in redox homeostasis and energetic metabolism in papillary thyroid carcinoma cell lines. Antioxidants, 10(5), 809.

Tsuji A, Ikeda Y, Murakami M, Kitagishi Y, Matsuda S, 2021. d-Leucine protects oocytes from chronic psychological stress in mice. Reprod Med Biol, 20(4), 477–84.

Udin Z, Masrizal M, Hendri H, Nanda S, 2020. Evaluation of Different Techniques in Recovering of Oocytes and Storage Duration of Ovaries on the Quality and Quantity of Bovine in Vitro Maturation. Buletin Peternakan, 44(2), 64–70.

Ün M, Küplülü Ş, 2005. Mezbahadan toplanan ovaryumlardan elde edilen sığır oositlerinin in vitro maturasyonu ve fertilizasyonu. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 52(2), 92–7.

Üstüner B, 2020. İn Vitro Maturasyon İçin Oosit Kazanım Yöntemleri ve İn Vitro Maturasyon. Turkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics, 6(1), 6–14.

Vajta G, Korösi T, Du Y, Nakata K, Ieda S, Kuwayama M, Nagy ZP, 2008. The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. Reproductive biomedicine online, 17(1), 73–81.

Varanou A, Withington SL, Lakasing L, Williamson C, Burton GJ, Hemberger M, 2006. The importance of cysteine cathepsin proteases for placental development. J Mol Med, 84, 305–17.

Veeramachaneni S, Ausman LM, Choi SW, Russell RM, Wang X-D, 2008. High dose lycopene supplementation increases hepatic cytochrome P4502E1 protein and inflammation in alcohol-fed rats. The Journal of nutrition, 138(7), 1329–35.

Vennapureddy S, Arunakumari G, Reddy KC, Reddy KR, Ambica G, 2024. Effect of FSH stimulation of ovaries on in vitro maturation of sahiwal oocytes collected by ovum pick-up (OPU) method. Indian Journal of Animal Research, 58(3), 395–400.

Ventura-Juncá P, Irarrázaval I, Rolle AJ, Gutiérrez JI, Moreno RD, Santos MJ, 2015. In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. Biological Research, 48, 1–13.

Vettical BS, 2016. Effect of Fetal Calf Serum and Mid Estrus Cow Serum on In Vitro Maturation and Fertilization of Oocytes from Crossbred Cattle in the Tropics. Int J Appl Sci Biotechnol, 4(3), 308–10.

Viana JHM, 2024. 2023 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. International Embryo Technology Society, https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2023.pdf

Vijayakumar R, Ndubisi B, De Leon F, Heine W, 1987. Sperm wash in three culture media: maximization of motile sperm recovery during swim-up incubation. Andrologia, 19(5), 579–84.

Vincenti L, Starvaggi Cucuzza A, Girgis SM, Teodoro PL, 1998. IVF in Piedmontese breed: production data related to oocytes characteristics. 14th Scientific Meeting of the European Embryo-Transfer Association. 266, Edition Fondation Marcel Meirux;

Vogele AC, 1937. Effect of environmental factors upon the color of the tomato and the watermelon. Plant physiology, 12(4), 929.

Volpes A, Sammartano F, Rizzari S, Gullo S, Marino A, Allegra A, 2016. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. J Assist Reprod Genet,

33, 765–70.

Walters AH, Bailey TL, Pearson RE, Gwazdauskas FC, 2002. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. J. Dairy Sci, 85(4), 824–32.

Wang F, Kooistra M, Lee M, Liu L, Baltz JM, 2011. Mouse embryos stressed by physiological levels of osmolarity become arrested in the late 2-cell stage before entry into M phase. Biology of reproduction, 85(4), 702–13.

Wang H, Wan H, Li X, Liu W, Chen Q, Wang Y, Yang L, Tang H, Zhang X, Duan E, 2014. Atg7 is required for acrosome biogenesis during spermatogenesis in mice. Cell research, 24(7), 852–69.

Wang Z, Yu S, Xu Z, 2007a. Effects of collection methods on recovery efficiency, maturation rate and subsequent embryonic developmental competence of oocytes in holstein cow. Asian-Aust. J. Anim. Sci, 20(4), 496–500.

Wang ZG, Xu ZR, Yu SD, 2007b. Effects of oocyte collection techniques and maturation media on in vitro maturation and subsequent embryo development in Boer goat. Czech J. Anim. Sci, 52(1), 21.

Wieczorek J, Koseniuk J, Skrzyszowska M, Cegła M, 2020. L-OPU in goat and sheep—different variants of the oocyte recovery method. Animals, 10(4), 658.

Wolf DP, Quigley MM, 1984. Historical Background and Essentials for a Program in In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Human In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Springer; 1–9

Xu J, Guo Z, Su L, Nedambale TL, Zhang J, Schenk J, Moreno JF, Dinnyés A, Ji W, Tian XC, 2006. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. J. Dairy Sci, 89(7), 2510–18.

Yamamoto T, Iwata H, Goto H, Shiratuki S, Tanaka H, Monji Y, Kuwayama T, 2010. Effect of maternal age on the developmental competence and progression of nuclear maturation in bovine oocytes. Molecular reproduction and development, 77(7), 595–604.

Yanagimachi R, 1966. Time and process of sperm penetration into hamster ova in vivo and in vitro. Reproduction, 11(3), 359–70.

Yang C-R, Miao D-Q, Zhang Q-H, Guo L, Tong J-S, Wei Y, Huang X, Hou Y, Schatten H, Liu Z, 2010. Short-term preservation of porcine oocytes in ambient temperature: novel approaches. PloS one, 5(12), e14242.

Yang H, Kolben T, Meister S, Paul C, van Dorp J, Eren S, Kuhn C, Rahmeh M, Mahner S, Jeschke U, 2021. Factors influencing the in vitro maturation (IVM) of human oocyte. Biomedicines, 9(12), 1904.

Yang MY, Fortune JE, 2006. Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. Biology of Reproduction, 75(6), 924–32.

Yang X, Jiang S, Foote RH, 1993. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. Molecular Reproduction and Development, 34(1), 94–100.

Yao T, Suzuki R, Furuta N, Suzuki Y, Kabe K, Tokoro M, Sugawara A, Yajima A, Nagasawa T, Matoba S, 2018. Live-cell imaging of nuclear–chromosomal dynamics in bovine in vitro fertilised embryos. Scientific Reports, 8(1), 7460.

Yehye WA, Rahman NA, Ariffin A, Abd Hamid SB, Alhadi AA, Kadir FA, Yaeghoobi M, 2015. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review.European journal of medicinal chemistry,101, 295-312.

Yen G-C, Duh P-D, Tsai H-L, 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. Food chemistry, 79(3), 307–13.

Yong HY, Hao Y, Lai L, Li R, Murphy CN, Rieke A, Wax D, Samuel M, Prather RS, 2006. Production of a transgenic piglet by a sperm injection technique in which no chemical or physical treatments were used for oocytes or sperm. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 73(5), 595–99.

Yoshimura Y, Nakamur Y, Yamada H, Ando M, Ubukata Y, Oda T, Suzuki M, 1991. Possible

contribution of prolactin in the process of ovulation and oocyte maturation. Hormone Research in Paediatrics, 35(Suppl. 1), 22–32.

Yu H, Diao H, Wang C, Lin Y, Yu F, Lu H, Xu W, Li Z, Shi H, Zhao S, 2015. Acetylproteomic Analysis Reveals Functional Implications of Lysine Acetylation in Human Spermatozoa (sperm). Molecular & Cellular Proteomics, 14(4), 1009–23.

Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ, 2003. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. Theriogenology, 59(7), 1585–96.

Zhang K, Hansen PJ, Ealy AD, 2010. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. Reproduction, 140(6), 815–26.

Zhang LI, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA, 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. Molecular reproduction and development, 40(3), 338–44.

Zhang M, Dai X, Sun Y, Lu Y, Zhou C, Miao Y, Wang Y, Xiong B, 2017a. Stag3 regulates microtubule stability to maintain euploidy during mouse oocyte meiotic maturation. Oncotarget, 8(1), 1593.

Zhang Y, Yu L, 2008. Single-cell microinjection technology in cell biology. Bioessays, 30(6), 606–10.

Zhang Y, Wang H, Liu W, Yang Y, Wang X, Zhang Z, Guo Q, Wang C, Xia G, 2017b. Natriuretic peptides improve the developmental competence of in vitro cultured porcine oocytes. reproductive biology and endocrinology, 15, 1–12.

Zhao M, Hur T-Y, No J, Nam Y, Kim H, Im G-S, Lee S, 2017. Ascorbic acid increases demethylation in somatic cell nuclear transfer embryos of the pig (Sus scrofa). Asian-Aust. J. Anim. Sci, 30(7), 944.

Zhao S, Pang Y, Zhao X, Du W, Hao H, Zhu H, 2019. Detrimental effects of lipopolysaccharides on maturation of bovine oocytes. Asian-Aust. J. Anim. Sci, 32(8), 1112.

Zhao Z, Garbett D, Hill JL, Gross DJ, 2005. Epidermal growth factor receptor downregulation in cultured bovine cumulus cells: reconstitution of calcium signaling and stimulated membrane permeabilization. Reproduction, 130(4), 517–28.

Zi X-D, Lu H, Yin R-H, Chen S-W, 2008. Development of embryos after in vitro fertilization of bovine oocytes with sperm from either yaks (Bos grunniens) or cattle (Bos taurus). Anim Reprod Sci, 108(1–2), 208–15.

Zuzarte-Luis V, Montero JA, Kawakami Y, Izpisua-Belmonte JC, Hurle JM, 2007. Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. Developmental biology, 301(1), 205–17.

7. EKLER

EK-A. Etik Kurul Onayı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI
ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ETİK KURULU (SÜVDAMEK) KARARLARI

Toplantı Tarihi	30.06.2022	Toplantı Sayısı	2022/07	Karar Sayısı	2022/80

S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN tarafından sunulan **"Likopen ve Askorbik Asitin İn Vitro Sığır Embriyo Kültür Medyumlarına İlavesinin Embriyo Gelişimi ve Kalitesi Üzerine Etkileri"** başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.

Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin **8 inci maddesinin 8 inci fıkrasının (k) bendinde belirtilen maddeler gereğince; "1)Teşhis ve tedavi amaçlı klinik uygulamalar, 2) Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetuslar ile yapılan prosedürler, 3) Süt sağma, 4) Dışkı veya altlık örneği toplama, 5) Sürüntü ile örnek alma şeklindeki müdahaleler HADMEK iznine tabi değildir.**

Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından "**Uygun olduğuna**" oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Oya BULUT Başkan (Katılmadı)	Prof. Dr. İbrahim AYDIN Başkan Yardımcısı
Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR Üye	Doç. Dr. Ayşe ER Üye (Katılmadı)

Doç. Dr. Mustafa Selçuk ALATAŞ Hayvan Refahı Birimi Üyesi	Doç. Dr. Nermin IŞIK USLU Üye	Doç. Dr. Hasan ALKAN Raportör Üye
Vet. Hek. Mustafa Sedat ARSLAN Üye	Muhan ÜLGEN Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi	Sabri YALICI Sivil Üye

EK- B. Turnitin Raporu

Likopen ve Askorbik Asit'in İn Vitro Sığır Embriyo Kültür Medyumlarına İlavesinin Embriyo Gelişimi ve Kalitesi Üzerine Etkisi

Yazar Salih NARLIÇAY

Gönderim Tarihi: 07-Şub-2025 01:38PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2582000855
Dosya adı: Tez_Salih_Narl_ay_d_zenlenIyor_son2.docx (5.4M)
Kelime sayısı: 30888
Karakter sayısı: 203258

Likopen ve Askorbik Asit'in İn Vitro Sığır Embriyo Kültür Medyumlarına İlavesinin Embriyo Gelişimi ve Kalitesi Üzerine Etkisi

ORİJİNALLİK RAPORU

%6	%6	%2	%0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%5
2	silo.tips İnternet Kaynağı	%1
3	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1

Alıntıları çıkart	üzerinde	Eşleşmeleri çıkar	< %1
Bibliyografyayı Çıkart	üzerinde		

8. ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Tokat'ta doğdu. İlköğretimini Tokat Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda, liseyi ise Tokat Atatürk Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2008-2010 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Safiye Çıkrıkçıoğlu Meslek Yüksek Okulu'nda Hayvan Yetiştiriciliği ve Sağlığı programını bitirdi. Aynı yıl DGS sınavı ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı. Lisans eğitimi sırasında Erasmus sınavını kazanarak 2014-2015 yılı güz dönemini Romanya'nın Iasi şehrinde bulunan "Ion Ionescu de la Brad University of Agricultural Science and Veterinary Medicine"da tamamladıktan sonra Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne döndü ve 2015 yılında mezun oldu. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi'nde 2016 yılında Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2019 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2020 yılı haziran ayında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi'nde Araştırma Görevlisi olarak görevine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.