



## PROTEİN KAYNAKLARININ İN VİTRO OLGUNLAŞTIRILMIŞ SIĞIR OOSİTLERİNİN GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Nisa Nur YILMAZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs University, Agricultural Faculty, Department of Agricultural Biotechnology, 55139, Samsun, Türkiye

**Özet:** Bu çalışma, siğir oositlerinin in vitro olgunlaştırma (IVO)'sında kültür medyumuna ilave edilen protein kaynaklarının glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Siğir ovaryumlarından elde edilen oositler %10 fetal buzağı serum (FBS), 4 mg/mL siğir serum albümin (SSA), 1 mg/mL polivinil alkol (PVA) içeren ve protein kaynağı içermeyen bikarbonat tamponlu doku kültür medyumlarında (TCM-199) 38,5 °C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş ortamda 22 saat IVO'ya alınmıştır. Olgunlaşma süresi sonunda elde edilen kumulus-oosit kompleksleri (KOK'ler), kumulus hücrelerinden ayırmak için işleme tabi tutulmuştur. Kumulus hücrelerinden ayrılan oositler, polivinil alkol içeren ve Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> içermeyen fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Daha sonra, oositler belirlenmiş örnek boyutlarına bölünerek mikrotüplerde saklanmıştır. IVO kültürü sonrasında oositlerdeki glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi için ticari kit kullanarak 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Çalışmada, her bir deneme grubundaki oositlerden izole edilen hücre ekstraktlarındaki GPx enzim aktivitesinin seviyelerinin zamanla değişmediği, kültür medyumuna PVA eklenmiş oositlerinde GPx enzim aktivitesinin diğer deneme gruplarındaki oositlerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir (P>0,05). Bu çalışma sonucunda farklı protein kaynaklarının antioksidan aktivitenin göstergelerinden biri olan GPx enzim seviyelerinin siğir oositlerinde üzerine etkileri belirlenmiş ve FBS ve BSA'nın protein kaynağı olarak siğir oosit gelişimi üzerine daha etkili olabileceği tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Oosit, Siğir, Antioksidan aktivitesi, Protein, Olgunlaşma


### Effect of Protein Sources on Glutathione Peroxidase Enzyme Activity of In Vitro Matured Bovine Oocytes

**Abstract:** This study was conducted to determine the effect of protein sources added to the culture media during in vitro maturation (IVM) on the glutathione peroxidase (GPx) enzyme activity of bovine oocytes. Oocytes obtained from bovine ovaries were IVM cultured in bicarbonate buffered tissue culture media (TCM-199) containing 10% fetal calf serum (FBS), 4 mg/mL bovine serum albumin (SSA), 1 mg/mL polyvinyl alcohol (PVA) and without protein source for 22 hours in a humidified environment containing 38.5 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Following the maturation period, cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained were subjected to a procedure to separate the cumulus cells from the oocytes. The oocytes separated from the cumulus cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing polyvinyl alcohol and devoid of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. Subsequently, the oocytes were divided into predetermined sample sizes and stored in microtubes for further processing. After IVM culture, using a commercial kit, glutathione peroxidase (GPx) enzyme activity in oocytes was determined spectrophotometrically at a wavelength of 340 nm. In the study, the levels of GPx enzyme activity in the cell extracts isolated from the oocytes in each experimental group did not change over time, and the GPx enzyme activity in the oocytes with PVA added to the culture medium was lower than the oocytes in the other experimental groups (P>0.05). As a result of this study, the effects of different protein sources on GPx enzyme levels, one of the indicators of antioxidant activity in bovine oocytes, were determined, and FBS and BSA, as protein sources, could be more effective on bovine oocyte development.

**Keywords:** Oocyte, Bovine, Antioxidant activity, Protein, Maturation

\*Sorumlu yazar (Corresponding author): Ondokuz Mayıs University, Agricultural Faculty, Department of Agricultural Biotechnology, 55139, Samsun, Türkiye

E mail: nisanyilmaz06@gmail.com (N. N. YILMAZ)

Nisa Nur YILMAZ  <https://orcid.org/0000-0002-8675-9709>

**Gönderi:** 19 Şubat 2024

**Kabul:** 08 Mayıs 2024

**Yayınlanma:** 15 Mayıs 2024

**Received:** February 19, 2024

**Accepted:** May 08, 2024

**Published:** May 15, 2024

**Cite as:** Yılmaz NN. 2024. Effect of protein sources on glutathione peroxidase enzyme activity of in vitro matured bovine oocytes. *BSJ Eng Sci*, 7(3): 575-579.

### 1. Giriş

Hücre için ATP üretimi, oksidatif metabolizmanın bir yan ürünü olarak gerçekleşir; ancak bu metabolik aktivitenin bir sonucu olarak istenmeyen serbest oksijen radikalleri (SOR) de üretilir (Sen ve Kuran, 2018; Sen, 2021; Sen ve ark., 2022). SOR üretimi, oksidatif metabolizma hızına bağlı olarak değişebilir ve yüksek metabolik aktivite, SOR üretimini artırabilir (Sturmey ve ark., 2009). Yüksek SOR miktarları, hücresel enzimlerin etkisiz hale gelmesine, membran lipid peroksidasyonuna ve embriyo

hücrelerinde DNA hasarına yol açabilir (Halliwell, 1996). Hücresel hasar, metabolik aktivitenin artmasına ve daha fazla besin tüketimi ile daha fazla SOR üretimine neden olarak apoptoza yol açabilmektedir (Sturmey ve ark., 2009). Oositlerin in vitro olgunlaştırılması sırasında kullanılan medyumların çoğu, olgunlaşmayı desteklemek için bir protein kaynağı içerir. Örneğin, siğir oositlerin in vitro olgunlaşmasında siğir serum albümin, fetal buzağı serumu ve gibi çeşitli protein kaynaklarının eklenmesi neredeyse zorunlu olarak bildirilmiştir (Sen, 2015;



Kocyyigit ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar, in vitro kùltür ortamına eklenen protein kaynaklarının oosit ve embriyo üzerinde toksik etkisi olan maddelerin olumsuz etkilerini azaltabileceğini, SOR'lara karşı bir savunma oluşturarak hücrel bileşenleri koruyabileceğini ve redoks potansiyelini düzenleyebileceğini göstermiştir (Flood ve Shirley, 1991; Koçyiğit ve ark., 2015). Protein ilavesinin aynı zamanda oosit olgunlaşmasını destekleyen büyüme faktörlerini sağlayabileceğini bildirilmiştir (Koçyiğit ve ark., 2015). Dolayısıyla bu çalışma, farklı protein kaynaklarının in vitro oosit olgunlaşma kùltürlerine eklenmesinin, hücrel antioksidan aktivitenin bir göstergesi olan glutasyon peroksidaz enzim seviyelerini nasıl etkileyebileceğini anlamayı amaçlamaktadır. Ayrıca, hangi protein kaynağının sığır oositlerinin olgunlaşmasında daha etkili bir antioksidan aktivite sağlayabileceğini belirlemeye yardımcı olacaktır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Kumulus-Oosit Komplekslerinin (KOK) Elde Edilmesi

Sığır ovaryumları, yerel bir mezbahadan (Florya A.Ş.) kesim sonrasında temin edildi. Çalışma süresince toplam 50 ovaryumdan 200 oosit elde edildi. Ovaryumlar, kesimden sonra yaklaşık 2 ila 3 saat içinde, 35-37 °C sıcaklıkta 0,9% NaCl (S5886; w/v) içeren ve 0,1% v/v antibiyotik çözeltisi (A5955; mL başına 10.000 IU penisilin, 10 mg streptomisin ve 25 µg amfoterisin B) eklenmiş bir ortamda laboratuvara nakledildi. 2 ila 8 mm çapındaki folliküllerden 18 gauge iğneye bağlı 10 mL'lik tek kullanımlık bir şırınga kullanılarak kumulus-oosit kompleksleri (KOK'ler) elde edildi (Şekil 1). KOK'ler, %1 v/v antibiyotik-antimikotik çözeltisi ile 100 µg/mL L-glutamin ilave edilen Hapes-modifiye ticari kùltür medyumunu (H-TCM-199; M7528) içinde birkaç kez yıkandı. KOK'ler morfolojik olarak incelendi ve sadece atretik olmayan kümüslü yapısına, kompakt ve düzenli granüle edilmiş sitoplazmaya sahip olanlar IVO için seçildi (Şekil 1) (Sen, 2022).

### 2.2. İn Vitro Oosit Olgunlaştırması

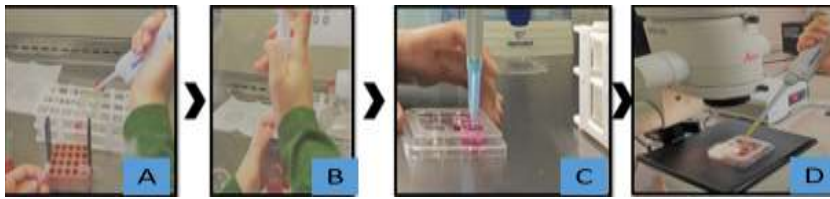
Sığır oositlerinin IVO kùltürü Sen (2021)'in önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 2). IVO kùltür medyumunu, Earle tuzları ve L-glutamin takviyeli, 5,5 µg/mL sodyum piruvat, %1 v/v antibiyotik-antimikotik solüsyon içeren ve sodyum bikarbonat tamponlu ticari doku kùltürü medyumundan (TCM-199; M4530) hazırlandı. Seçilen KOK'lar, üç kez H-TCM-199 kùltür medyumunda yıkandı ve ardından rastgele sığır oositi olgunlaştırma kùltür gruplarına dağıtıldı. Sığır oositi olgunlaştırma kùltür grupları; (a) IVO + 4 mg/mL BSA , (b) IVO + %10 FCS , (c) IVO + 1 mg/mL PVA ve (d) makromolekül takviyesi olmayan şekilde oluşturulmuştur. Kùltürde olgunlaştırma medyumundan dört gözlü petrinin (Nunc, Roskilde, Danimarka) her bir kuyucuğuna 500 mL aktarılmış ve üzeri 300 mL mineral yaė (Sigma M-5904) ile kapatılıp ısınması ve gazlanması için inkübatöre bırakılmıştır. Her bir ortam grubundaki KOK'lar 38,5 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 oranında nem içeren atmosferde 22 saat süreyle kùltüre alınmışlardır (Cevik ve ark., 2011; Sen ve Kuran, 2018).

### 2.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesi

Olgunlaşma süresi sonunda KOK'lar, 2 defa H-TCM-199'da yıkandıktan sonra 1,5 ml'lik endorf tüplerin içerisine alınıp etrafını saran kumulus hücrelerinden ayırmak için 5 dakika vortekslenmişlerdir (Labart Multi-Mixer). Kumulus hücrelerinden ayrılan ve çıplak kalan oositler 1 mg/ml polivinil alkol ilaveli Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> içermeyen fostat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisinde 3 kez yıkandı ve 10 µl PBS içinde 25 adet oosit olacak şekilde GPx enzim aktivite analizine kadar -80°C'de mikrotüplerde depolanmıştır. Analiz güzünü çözdürülen örnekler enzimatik ekstraksiyon için 50W'de 2 dakika süreyle sonikasyona tabi tutulmuştur (Sen ve ark., 2022). Daha sonra örneklerin her birinden 50 µl alınmış ve 2M 1X Assay Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM EDTA) ve 2 µl DTT solüsyonunda 15 dakika boyunca buz içerisinde inkübe edilmiştir. Her bir numune 3 tekrarlamalı olarak 30 saniye aralıklarla vorteks edilmiştir. Numuneler 4°C'de 15 dakika boyunca 10.000 x g' de santrifüj edilmiştir.



Şekil 1. Oositlerin enjektör yardımı ile aspire edilmesi ve değerlendirilmesi.



Şekil 2. A) Olgunlaşma medyumuna protein kaynaklarının eklenmesi. B) Olgunlaşma medyumunun filtre edilmesi. C) Olgunlaşma medyumunun dört gözlü petri kutusuna alınması. D) Olgunlaşmaya bırakılacak oositlerin dört gözlü petriye alınıp inkübasyona bırakılması.

Süpernantlar pipet yardımı ile alınmıştır. Oositlerin GPx aktivitesi, ticari kit (GSH-Px Assay, Northwest Life Science Specialities, LLC ve Vancouver, WA ABD) kullanılarak üreticinin önerdiği şekilde spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. GPx enziminin aktivite tayini UV spektrofotometre (Shimadzu UV-1800) kullanılarak glutasyon dönüşümüne bağlı olarak absorbans artışı 340 nm’de gözlemlenmiştir. Spektrofotometrik yöntemler, Kinatics rate ayarında 340 nm’de ve 3 dakika boyunca yapılmıştır (Sen, 2022).

#### 2.4. İstatistik Analiz

Çalışma boyunca elde edilen veriler Ondokuz Mayıs Üniversitesi lisansı ile kullanılan SPSS 20,0 (2014) paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Farklı protein kaynağı içeren kültür medyumlarında olgunlaştırmaya alınmış sığır oositlerinin GPx enzim aktivitelerine ait verilerinin normallik varsayımı Shapiro Wilk testi ile belirlenmiş ve normal dağılım sergilediği tespit edilmiştir. Ayrıca Verilerin varyans analizine uygunluğu Levente varyans homojenlik testi değerlendirilmiş olup varyansların homojen olduğu (P<0,05) tespit edilmiştir. Deneme gruplarından elde edilen ortalamaların önem seviyesinin karşılaştırılması 0,05 önem düzeyinde Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak yapılmıştır (Genç ve Soysal, 2018).

### 3. Bulgular

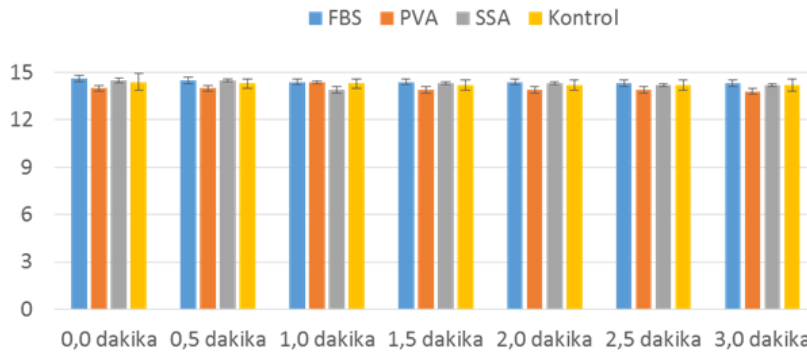
Çalışmada kullanılmak üzere mezbahaneye kesim için getirilen 53 baş sığırdan elde edilen toplam 106 adet ovaryum laboratuvara getirilmiştir. Protein kaynağı olarak fetal buzağı serumu (FBS), sığır serum albumini (SSA) ve polivinil alkol (PVA) eklenmiş kültür medyumlarında in vitro olgunlaştırılan sığır oositlerinin farklı ölçüm zamanlarındaki ve ortalama Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri (nmol/dakika/ml)

sırasıyla Şekil 3 ve Tablo 1’de sunulmuştur. Çalışmada, her bir deneme grubundaki oositlerden izole edilen hücre ekstraktlarındaki GPx enzim aktivitesinin seviyelerinin zamanla değişmediği, fakat kültür medyumuna PVA eklenmiş oositlerinde GPx enzim aktivitesinin diğer deneme gruplarındaki oositlerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir (P>0,05).

Olgunlaştırma ortamına eklenen farklı protein kaynaklarının GPx enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla farklı protein kaynaklarında olgunlaştırılmaya alınan oosit hücreleri depolanarak numuneler elde edilmiştir. Elde edilen bu numunelerin farklı protein kaynakları üzerine etkisi araştırılmıştır. Yapılan aktivite tayinleri sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki şekil 3’te gösterilmiştir.

### 4. Tartışma ve Sonuç

Sığır oositlerinin in vitro olgunlaşması, embriyo üretimi süreçlerinde kritik bir aşamayı temsil eder ve bu süreç, elde edilen embriyo kalitesi ve üretim verimliliği üzerinde önemli etkilere sahiptir. İn vitro koşullarda oosit olgunlaşması, oositlerin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini dikkate alan uygun bir çevrenin sağlanmasını gerektirir (Brackett ve Zuelke, 1993; Gordon, 1994). Modern embriyo üretimi süreçlerinde, kültür ortamının bileşimi, oositlerin ve embriyonun gelişimini doğrudan etkileyebilmektedir. Protein kaynaklarının türü, besin madde içeriği ve diğer katkı maddeleri, bu süreçte belirleyici faktörlerdir. Bu süreç, oositlerin ve embriyonun adaptif yanıtlarını tetikleyebilir; çünkü in vitro koşulları, oositlerin doğal çevresinden belirgin şekillerde farklılık gösterebilir ve bu da hücreyel yanıtları etkileyebilir (Sturmey ve ark., 2009).



**Şekil 3.** İn vitro olgunlaştırma medyumuna farklı protein kaynaklarının eklenen sığır oositlerinin farklı ölçüm zamanlarındaki GPx enzim aktivitesi seviyeleri (nmol/dakika/ml). FBS= fetal buzağı serumu, SSA= sığır serum albumini, PVA= polivinil alkol.

**Tablo 1.** İn vitro olgunlaştırma medyumuna farklı protein kaynaklarının eklenen sığır oositlerinin ortalama GPx enzim aktivitesi (nmol/dakika/ml). <sup>a,b</sup> (P<0,05).

	SSA	FCS	PVA	Control
GPx EA	14,362±0,18 <sup>a</sup>	14,414±0,21 <sup>a</sup>	13,932±0,1 <sup>b</sup>	14,061±0,2 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup>Aynı satırda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir (P<0,05). GPx EA= glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi, FBS= fetal buzağı serumu, SSA= sığır serum albumini, PVA= polivinil alkol.

Oositlerin ve embriyonun biyokimyasal dengesini desteklemek ve olgunlaşma sürecini optimize etmek amacıyla, in vitro embriyo üretimi sürecinde farklı katkı maddelerinin kullanımı yaygın bir yaklaşımdır. Bu bağlamda, FBS, BSA ve PVA gibi protein kaynakları önemli bir rol oynamaktadır. Bu katkı maddeleri, embriyo kültür ortamının besin içeriğini artırabilmekte ve oositlerin metabolik ihtiyaçlarını karşılamaya yardımcı olabilmektedir. Önceki çalışmalar, bu tür protein ilavelerinin, özellikle pronükleus oluşumu gibi kritik evreleri hızlandırma yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, FBS, BSA ve PVA'nın in vitro kültür sırasında gen transkript düzeylerini etkileyebildiği ve bu da embriyo gelişim hızı ve kalitesi üzerinde olumlu etkiler yaratabileceği belirtilmiştir (Ali ve Sirard, 2002). Mevcut çalışmada farklı protein kaynaklarının sığır oositlerinde glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılmasıdır. GPx, antioksidan savunmanın kritik bir bileşenidir ve hücrelerde reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı koruma sağlar. Sığır oositlerinde glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesinin incelenmesi, in vitro embriyo üretimi sürecindeki önemli bir parametreyi değerlendirmeyi amaçlar. GPx enzimi, antioksidan savunmanın kritik bir bileşenidir ve hücrelerde reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı koruma sağlar. Oositlerin antioksidan kapasitesi, embriyo kalitesi üzerinde belirleyici bir faktördür çünkü ROS, oositlerin sağlığını, genetik bütünlüğünü ve gelişim potansiyelini olumsuz yönde etkileyebilir. İn vitro koşullarda oosit olgunlaşması süreci, oositlerin döllenmeye hazır hale gelmesini sağlar ve bu süreçte oositlerin çevresel stres faktörlerine karşı direnci önemlidir. Oositler, doğal olarak antioksidan enzimlerle donatılmış olmasına rağmen, in vitro ortamda maruz kalınan stres ve oksidatif hasar, bu antioksidan savunmanın etkinliğini azaltabilir. Bu nedenle, oositlerin antioksidan kapasitesini değerlendirmek ve optimize etmek, başarılı bir in vitro embriyo üretimi süreci için kritik öneme sahiptir. GPx enzim aktivitesinin incelenmesi, kullanılan kültür ortamının ve protein kaynaklarının oositlerin antioksidan savunmasını nasıl etkilediğini anlamamıza yardımcı olmaktadır (Cetica ve ark., 2001). Bu çalışmanın sonuçları, farklı protein kaynaklarının medyum içeriğine eklenmesinin oositlerin antioksidan kapasitesini nasıl etkileyebileceğine dair önemli bir içgörü sunmaktadır. Elde edilen sonuçlar, her bir deneme grubundan elde edilen oositlerin hücre ekstraktlarında GPx enzim aktivitesinin zaman içinde anlamlı bir değişiklik göstermediğini göstermektedir. Bununla birlikte, PVA eklenmiş medyumlarda yetiştirilen oositlerde GPx enzim aktivitesinin diğer deneme gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, farklı protein kaynaklarının oositlerin in vitro olgunlaşma işlemleri sırasındaki antioksidan kapasitesini etkileyebileceğini göstermektedir. Daha düşük GPx aktivitesi, olgunlaşma ortamına PVA eklenmiş oositlerde gözlenirken, diğer protein kaynaklarının oositlerin

antioksidan savunmasını daha etkili bir şekilde artırabileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak, bu çalışma farklı protein kaynaklarının sığır oositlerinin in vitro olgunlaşma süreçlerindeki antioksidan kapasite üzerindeki etkilerini aydınlatarak, in vitro embriyo üretimi süreçlerinin optimize edilmesine ve embriyo kalitesinin artırılmasına yönelik stratejiler geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

### Katkı Oranı Beyanı

Yazar(lar)ın katkı yüzdesi aşağıda verilmiştir. Yazar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

	N.N.Y.
K	100
T	100
Y	100
VTI	100
VAY	100
KT	100
YZ	100
KI	100
GR	100
PY	100
FA	100

K= kavram, T= tasarım, Y= yönetim, VTI= veri toplama ve/veya işleme, VAY= veri analizi ve/veya yorumlama, KT= kaynak tarama, YZ= Yazım, KI= kritik inceleme, GR= gönderim ve revizyon, PY= proje yönetimi, FA= fon alımı.

### Çatışma Beyanı

Yazar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

### Etik Onay Beyanı

Bu çalışmada hayvanlar ve insanlar üzerinde herhangi bir çalışma yapılmadığı için etik kurul onayı alınmamıştır.

### Destek ve Teşekkür Beyanı

Bu çalışma TÜBİTAK 2209/A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destek Programı kapsamında desteklenmiştir.

### Kaynaklar

- Ali A, Sirard MA. 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod*, 66(4): 901-905.
- Brackett B, Zuelke K. 1993. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39(1): 43-64.
- Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT. 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life*, 51(1): 57-64.
- Cevik M, Kocyyigit A, Sen U, Kuran M. 2014. Can commercial human embryo culture media be used in bovine embryo culture? *J Fac Vet Med, Univ Kafkas*, 20(1): 149-153.
- Cevik M, Sen U, Kocyyigit A, Soydan E, Kuran M. 2011. Effects of serum, gonadotropins, epidermal growth factor and estradiol

- 17-Beta on cumulus expansion and nuclear maturation of bovine oocytes. *J Fac Vet Med, Univ Kafkas*, 17(6): 1009-1014.
- Flood L, Shirley B. 1991. Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. *Molec Reprod Develop*, 30: 226-231.
- Genç S, Soysal Mİ. 2018. Parametric and nonparametric post hoc tests. *BSJ Eng Sci*, 1(1): 18-27.
- Gordon I. 1994. Laboratory production of cattle embryo. Wallingford: CAB International, Newyork, USA, pp: 30-142.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An overview *Methods Enzymol*, 186: 1-8.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, 16: 33-50.
- Kocyigit A, Cevik M, Sen U, Kuran M. 2015. The effect of macromolecule and growth factors combinations on in vitro development of bovine embryos. *Turkish J Vet Anim Sci*, 39: 308-313.
- Sen U, Kuran M. 2018. Low incubation temperature successfully supports the in vitro bovine oocyte maturation and subsequent development of embryos. *Asian-Australas J Anim Sci*, 31(6): 827-834.
- Sen U, Şirin E, Onder H, Özyürek S, Kolenda M, Sitkowska B. 2022. Macromolecules Influence Cellular Competence and Expression Level of IGFs Genes in Bovine Oocytes In Vitro. *Animals*, 12(19), 2604.
- Sen U. 2015. Effects of sperm from different bulls on developmental competence, blastosist quality and cell number of bovine embryos in vitro. *J Fac Vet Med, Univ Kafkas*, 21(3): 339-344.
- Sen U. 2021. Maturation of bovine oocytes under low culture temperature decreased glutathione peroxidase activity of both oocytes and blastocysts. *Polish J Vet Sci*, 24: 93-99.
- Sen U. 2022. In vitro maturation culture temperature alters the enzymatic antioxidant activity of bovine oocytes and embryos. 37th International Conference on "Chemical, Agriculture, Biological & Environmental Sciences", December 12-14, Lisbon, Portugal, pp: 1-4.
- Sturmey RG, Hawkhead JA, Barker EA, Leese HJ. 2009. DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. *Hum Reprod*, 24: 81-91.