

RESEARCH ARTICLE

J Res Vet Med. 2025; 44 (1) 42-48
DOI:10.30782/jrv.1704382

Koyun Oositlerinin *In Vitro* Maturasyonu Sırasında Melatonin İlavesinin Sıcaklık Stresi ve Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisi

Ahmet Aktar^{1*}, Selim Alçay¹¹ Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama A.D., Görükle Kampüsü, Bursa

Received 22-05-2025 Accepted 03-06-2025

Özet

Bu çalışmada koyunlarda *in vitro* maturasyon sırasında uygulanan melatonin hormonunun sıcaklık stresi üzerine etkisinin embriyonik gelişim düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır. *in vitro* embriyo (IVF) üretim aşamalarından en kritik noktalardan birisi *in vitro* maturasyon aşamasında oositlerin mature olma oranlarıdır. Bu aşamada meydana gelen streslere bağlı olarak reaktif oksijenlerin artması hücrelerde hasarlara sebep olmaktadır. Sunulan çalışmada melatonin hormonunun *in vitro* ortamda oosit gelişimi üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla; maturasyon medyumuna 10^{-7} M melatonin hormonu ilave edildi ve 38 °C – 41 °C sıcaklıklarda inkübe edildi. Mezbahada kesilen koyunların ovaryumları 35 °C’ de ve fizyolojik tuzlu su içerisinde laboratuvara getirildi ve folliküller bistüri ile kesilerek oositlerin elde edilmesi sağlandı. Elde edilen oositler ilgili grupların maturasyon medyumlarına aktarıldı ve inkübe edildi. Maturasyon sürecinin tamamlanmasının ardından fertilizasyon sürecine geçildi. Embriyonik gelişim aşamaları bölünme, morula, blastosit aşamaları olarak değerlendirildi. Bölünme oranları kıyaslandığında en yüksek oran G39M, en düşük değer G41 elde edildi ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($P<0,05$). Morula oranlarında ise en yüksek değer G39M gözlenirken en düşük değer G41 elde edildi ($P<0,05$). Elde edilen blastosit oranları en iyi G39M’ de elde edildi. Buna göre melatonin sıcaklık stresinde bölünme ve morula aşamasında etki gösterirken blastosit aşamasında anlamlı ölçüde azalma oldu. ($P<0,05$)

Anahtar Kelimler: IVF, Melatonin, Sıcaklık Stresi, Embriyonik Gelişim

Abstract

In this study, the effect of melatonin hormone administered during *in vitro* maturation (IVM) on heat stress was investigated at the embryonic development level in sheep. Among the critical stages of *in vitro* embryo (IVF) production, the maturation rate of oocytes during the IVM phase plays a pivotal role. Stress factors occurring during this stage can lead to an increase in reactive oxygen species (ROS), which in turn may cause cellular damage. To evaluate the effect of melatonin on oocyte development under *in vitro* conditions, 10^{-7} M melatonin was added to the maturation medium, and oocytes were incubated at temperatures of 38 °C and 41 °C. Ovaries from sheep slaughtered at a local abattoir were transported to the laboratory in physiological saline at 35 °C. Follicles were dissected using a scalpel to collect the oocytes. Retrieved oocytes were then transferred into the maturation media corresponding to their respective experimental groups and incubated accordingly. Upon completion of the maturation period, the fertilization process was initiated. Embryonic development was assessed based on cleavage, morula, and blastocyst stages. When comparing cleavage rates, the highest rate was observed in group G39M, while the lowest was recorded in group G41, with statistically significant differences between the groups ($P < 0.05$). Similarly, for morula rates, the highest was observed in G39M and the lowest in G41 ($P < 0.05$). The highest blastocyst formation rate was also recorded in G39M. These findings suggest that melatonin positively influences the cleavage and morula stages under heat stress conditions, although a significant decrease was observed at the blastocyst stage ($P < 0.05$).

Keywords: IVF, Melatonin, Heat Stress, Embryonic Development

* Corresponding author: Ahmet Aktar, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama A.D., Görükle Kampüsü, Bursa (16059), Tel: +90 224 2941356, e-posta: ahmet1889@gmail.com

Giriş

Günümüzde biyoteknolojik yaklaşımlar, tarım ve hayvancılıkta hem verim artışı sağlamak hem de sürdürülebilirliği desteklemek adına kritik araçlar arasında yer almaktadır. Özellikle genetik mühendisliği, *in vitro* embriyo üretimi (IVE), suni tohumlama, embriyo transferi ve klonlama gibi ileri düzey teknikler, hayvan ıslahında yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Genetik ilerleme, koyunlarda IVE ve embriyo transferi teknikleri sayesinde kayda değer bir hızla sağlanabilir. IVE, yüksek genetik potansiyele sahip koyunların oositlerinin laboratuvar koşullarında olgunlaştırılması ve döllenmesini kapsar (2). Ayrıca, IVE genetik çeşitliliği artırarak, hastalıklara dayanıklı, yüksek verimli, kaliteli et ve süt üreten koyun ırklarının geliştirilmesini mümkün kılar. Söz konusu biyoteknolojik yöntemler, koyun yetiştiriciliğinde verimlilik ve sürdürülebilirliğin artırılmasında önemli bir rol üstlenir (3).

In vitro maturasyon (IVM) ortamında meydana gelen sıcaklık stresi, oositlerin olgunlaşma sürecini olumsuz yönde etkileyebilir. Oositlerin sağlıklı bir şekilde olgunlaşabilmesi için ideal sıcaklık koşulları hayati öneme sahiptir. Sıcaklık stresine maruz kalan oositlerde hücresel metabolizmada bozulmalar ortaya çıkabilir ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı seviyede üretilmesi söz konusu olabilir (4). Bu durum, hücre yapıları ve DNA üzerinde oksidatif hasarlara neden olarak oosit kalitesini düşürür ve böylece embriyo gelişim kapasitesini olumsuz etkiler (5). IVM sürecinde sıcaklığın titizlikle kontrol edilmesi, oositlerin sağlıklı olgunlaşması ve kaliteli embriyoların elde edilmesi açısından kritik bir faktördür. Bundan dolayı, laboratuvar ortamında sıcaklık düzenlemesine özellikle dikkat edilmesi, başarılı *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve embriyo transferi (ET) sonuçlarının sağlanması için zorunludur (6).

IVM sırasında oluşan sıcaklık stresinin zararlı etkileri, antioksidanların kullanımıyla kontrol altına alınabilir. Sıcaklık stresi, oositlerde ROS aşırı üretimini tetikleyerek hücresel hasara neden olur ve bu durum, olgunlaşma ile embriyo gelişim kapasitesinde azalmaya yol açabilir. Antioksidanlar, ROS kaynaklı oksidatif stresi azaltarak hücre yapılarının korunmasına yardımcı olur ve oosit kalitesini artırır (7).

Melatonin, serbest radikalleri etkisiz hale getirme ve ROS daha az zararlı bileşiklere dönüştürme kapasitesi sayesinde güçlü bir antioksidan olarak bilinir. Bu özellikleriyle melatonin, lipidler, proteinler ve DNA gibi hücresel bileşenleri oksidatif hasara karşı korur (8). Melatonin metabolitlerinin ROS ile etkileşiminin ardından serbest radikalleri

temizleme yeteneklerini sürdürdüğü dikkate alındığında, melatonin molekülü klasik antioksidanların aksine, sadece bir veya birkaç ROS'u detoksifiye etmekle kalmayıp, aynı zamanda on adede kadar ROS'u etkisiz hale getirebilir (9). Birçok *in vitro* araştırma, kültür ortamına melatonin eklenmenin oosit olgunlaşmasını, fertilizasyonunu ve embriyo gelişimini iyileştirdiğini göstermiştir (10). Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, oositlerde oksidatif stresin yalnızca sekiz saatlik *in vitro* inkübasyondan sonra ortaya çıktığını göstermiştir. Ancak, oosit kültür ortamının melatonin ile desteklenmesi, fare oositlerinde bu stresin zamana bağlı olarak önemli ölçüde azaltılmasını sağlamış ve böylece apoptoz sürecinin başlamasını geciktirmiştir. Ayrıca, melatonin takviyesi embriyo kalitesinde belirgin bir iyileşme sağlamıştır (11). Başka bir çalışmada ise, melatoninin domuz oositlerinde ROS üretimini, apoptozu ve DNA hasarını azaltarak kalite ve gelişimi artırdığı rapor edilmiştir (12). Benzer şekilde, düşük doz melatonin, sıgır blastosistlerinin üretim miktarını ve kalitesini artırırken, DNA metiltransferaz 3a (DNMT3A), okludin (OCC) ve kaderin (CDH1) ekspresyonlarını yükseltmekte, ayrıca azalan aquaporin 3 (AQP3) seviyesiyle birlikte apoptoza karşı artan bir direnç sağlamaktadır (13).

Bu çalışmada, sıcaklık stresine karşı etkili olduğu gösterilmiş melatonin hormonunun en uygun dozu seçilerek, koyun oositlerinin sıcaklık stresi altında olgunlaşma durumları ve embriyonik gelişim seviyeleri karşılaştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun 12.10.2021 tarihli ve B.30.2.ULU.0.8Z.00.00/152 sayılı onayıyla yürütülmüştür.

Ovaryumların Alınması ve Oositlerin Toplanması

Çalışmada kullanılan ovaryumlar, Bursa Et-Balık mez-bahasında kesilen koyunlardan temin edilmiş ve zaman kaybetmeden, 35 °C'de 500 ml %0.9'luk fizyolojik tuzlu su içeren termoslara yerleştirilmiştir. Gerekli ovaryum sayısı toplandıktan sonra, en kısa sürede Bursa Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı IVF laboratuvarına ulaştırılmıştır.

Ovaryum çevresinde bulunan fazla doku ve yağ dokusu kesilerek temizlendi. Kan ve diğer kalıntılardan arındırmak amacıyla ovaryumlar üç kez 37 °C'deki PBS solüsyonunda yıkandı. Bu işlemler sırasında ovaryumlar, işleme alınana kadar 37 °C'de su banyosunda tutuldu. Ovaryum yüzeyin-

de bulunan foliküller bisturi yardımıyla belirli aralıklarla kesilerek önce foliküler sıvının dışarı çıkması sağlandı. Geri kalan foliküler içerik, 20 ml'lik enjektöre alınan oosit yıkama medyumunu ile basınç uygulayarak ve her foliküle yaklaşık 7-8 ml medyum kullanılarak petri kabına boşaltıldı. Oositler stereomikroskop altında incelenip Hamilton enjektörü ile seçildi. Seçim kriterleri arasında; oosit etrafında 3-4 sıra kumulus hücrelerinin bulunması, kumulus hücrelerinin sıkı ve hasarsız şekilde oositi çevrelemesi, oosit çaplarının uygun olması ve vitellus dağılımının homojenliği yer aldı.

***In vitro* Maturasyon**

Maturasyon için toplanan oositler, üç kez oosit yıkama medyumunda yıkandıktan sonra bir kez de maturasyon medyumunda temizlendi. Ardından, önceden hazırlanıp inkübe edilmiş dört kuyu içeren olgunlaştırma petrilerine alındı. Her kuyucukta, mineral yağ ile kaplanmış 500 µl medyum bulunmaktaydı. Oositler, her kuyucuğa 50 adet olacak şekilde yerleştirildi ve 19-24 saat süreyle, %5 CO₂ ortamında, nemlendirilmiş inkübatörlerde, 39 °C ve 41 °C sıcaklıklarda inkübe edildi. Bu işlem sonucunda, oositler germinal vezikül (GV) aşamasından metafaz II (MII) aşamasına geçerek maturasyon tamamlandı. Medyumların hazırlanması sırasında, oositler maturasyon süreci için dört farklı çalışma grubuna ayrıldı. Çalışma medyumları her gün taze olarak hazırlandı. Her kuyucuğa, önceden tartılıp hesaplanan melatonin (Sigma-M5250) miktarı, final konsantrasyonun 10⁻⁷ M olacak şekilde eklendi. Gruplar aşağıda gösterildiği şekilde oluşturuldu.

Gruplar:

G39 °C : 10⁻⁷ M melatonin içermeyen 39 °C'de kontrol grubu

G39M °C : 10⁻⁷ M melatonin içeren 39 °C'de çalışma grubu

G41 °C : 10⁻⁷ M melatonin içermeyen 41 °C' de kontrol grubu

G41M °C : 10⁻⁷ M melatonin içeren 41 °C' de çalışma grubu

Spermanın Hazırlanması ve *in vitro* Fertilizasyon

Hiperaktif spermatozoonların ayrıştırılması amacıyla kullanılacak Percoll gradyan tekniği için 10 ml'lik deney tüpleri hazırlandı. Bu yöntem kapsamında, %90 ve %45 oranlarındaki iki farklı percoll-SOF gradyanı, tabakalı bir yapı oluşturacak şekilde tüplere dikkatlice yerleştirildi. Dölleme işlemleri için daha önceden dondurulmuş sperma kullanıldı. Çözdürülen spermadan 200 µl alınarak, oluşturulmuş olan %45'lik percoll katmanının üzerine dikkatlice tabakalandırıldı. Hazırlanan bu tüpler, 1140 g kuvvetinde

15 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüjleme sonrasında, üstte kalan percoll tabakaları dikkatli şekilde uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde biriken ve spermatozoonlardan oluşan pellet, 2 ml HSOF ile süspanse edilerek yeniden çözüldü ve bu karışım 500 g kuvvetinde 6 dakika daha santrifüj edildi. Sonrasında üst kısımdaki süpernatant atıldı ve tüpte kalan spermatozoonlar sayılarak belirlendi.

IVM sürecini tamamlayan ve genişlemiş kumulus tabakası gösteren oositler, olgunlaşma medyumundan alınarak korona ve kumulus hücrelerinden arındırıldı. Bu işlem, HSOF çözeltisi içerisinde oositlerin 3-5 dakika boyunca nazikçe pipetlenmesiyle gerçekleştirildi. Hücrelerden temizlenen oositler, %2 oranında koyun serumu (SS) içeren bikarbonat tamponlu sentetik ovidukt sıvısında (BSOF) bir kez yıkandı. Temizlenmiş oositler, her biri 500 µl BSOF + SS içeren ve yüzeyi 400 µl mineral yağ ile kaplanmış dört kuyucuklu petri kaplarının her bir kuyucuğuna yerleştirildi. Her kuyucuğa 50 oosit konuldu. Fertilizasyon ortamında, spermatozoonlar nihai konsantrasyonu 0,6-1 x 10⁶ sperm/ml olacak şekilde ayarlandı. Dölleme süreci, %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş atmosfer koşullarında, 39 °C ve 41 °C sıcaklıklarda, yaklaşık 19-21 saat boyunca sürdürüldü.

***In vitro* Kültür**

Fertilizasyon ortamından alınan ve yıkama işlemiyle üzerindeki spermatozoonlardan temizlenmiş olan muhtemel zigotlar, 39 °C ve 41 °C sıcaklıklarda, %5 CO₂ içeren nemli atmosfer koşullarında daha önce dengeye getirilmiş (ekilibre edilmiş) inkübasyon kaplarına yerleştirildi. Her kuyucuğa 50 hücre transfer edildi. İnkübasyonun dördüncü gününde gelişim gösteren embriyolar, SOF II medyumuna aktarıldı ve embriyonik gelişim süreçleri dikkatle gözlemlendi ve kaydedildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin analizinde SPSS 23 istatistik programı kullanılmıştır. Embriyonik gelişimle ilgili değerlendirmeler Ki-Kare (Chi-Square) testi aracılığıyla analiz edilmiştir. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde, P<0,05 değeri anlamlılık eşiği olarak kabul edilmiştir. DeneySEL bulguların güvenilirliğini sağlamak amacıyla, her bir deney grubu en az beş kez tekrarlanarak çalışmanın tekrarlanabilirliği sağlanmıştır.

Bulgular

IVM ortamında kullanılan oositler üzerinde yapılan bu çalışmada, farklı sıcaklıklarda maturasyon süresince kültür ortamına eklenen 10⁻⁷ M melatonin dozunun IVF ve blastosist oluşumu üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla dört farklı deney grubu oluşturulmuştur. G39 ve

G41 grupları kontrol grubu olarak belirlenmiş, G39M ve G41M gruplarında ise IVM medyumuna 10^{-7} M melatonin ilave edilmiştir. Bu dört grup kullanılarak melatoninin IVF başarısı ve embriyo gelişimi üzerindeki etkileri karşılaştırılmalı olarak analiz edilmiştir. IVM için çalışmada G39 için 440, G39M için 438, G41 için 438, G41M için de 358 oosit kullanıldı. Maturasyon sonrası geriye kalan mature oosit sayıları, bölünen hücre, morula, blastosist hücre sayıları sonuçları Tablo 1'de verildi.

Tablo 1. *In vitro* Fertilizasyon sonucunda elde edilen değerler

Grup	n	Bölünme %	Morula %	Blastosist %
G39	338(5)	102 ^a (%30)	36 ^a (%35,30)	16 ^a (%15,68)
G39M	340(5)	136 ^b (%40,23)	62 ^b (%45,69)	28 ^b (%20,59)
G41	138(5)	29 ^c (%21,01)	4 ^c (%2,89)	0 ^c (%0)
G41M	258(5)	85 ^a (%32,94)	29 ^a (%34,12)	14 ^a (%16,48)

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası fark önemlidir ($P<0.05$)

a: Maturasyon sonrası mature olup fertilizasyona alınan oosit sayısı

Oositlerin *in vitro* maturasyon (IVM) aşamasında melatonin ile muamele edilmesinin bölünme ve blastosist oranlarına etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, IVM ortamına iki farklı sıcaklıkta melatonin (10^{-7} M) ilave edilerek embriyonik gelişim aşamaları incelenmiştir. Bölünme oranları açısından gruplar karşılaştırıldığında, en yüksek oranlar G39M ve G41M gruplarında elde edilirken, en düşük oran G41 grubunda gözlenmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Morula oranları değerlendirildiğinde, en yüksek değer G39M, en düşük değer ise yine G41 grubunda tespit edilmiştir ($P<0.05$; Şekil 6). Blastosist oranları incelendiğinde ise, en yüksek başarı G39M grubunda elde edilmiştir (Şekil 7). Bu bulgular, melatoninin sıcaklık stresine karşı oositlerin bölünme ve morula aşamalarında olumlu etkiler sağladığını, ancak blastosist aşamasında bu etkinin anlamlı düzeyde azaldığını göstermektedir ($P<0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Türkiye'de koyun popülasyonunun büyük bir kısmı, düşük verimli ve genetik kapasitesi sınırlı yerli ırklardan oluşmaktadır. Mevcut koyun varlığı, çoğunlukla geleneksel yöntemlerle ve modern, bilimsel uygulamalardan yoksun şekilde yetiştirilmektedir. Koyunlardan elde edilen et, süt ve yapağı miktarı; hem genetik yapının hem de çevresel koşulların iyileştirilmesiyle önemli ölçüde artırılabilir. Bu durum, koyunculüğün Türkiye ekonomisindeki yerini ve önemini gelecekte de sürdüreceğinin açık bir göstergesidir (14). Başarılı bir IVE üretimi için en uygun kültür ortamlarının belirlenmesi ve sürekli olarak geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Günümüzde embriyoların *in vitro* koşullarda üretilmesi, dünya genelinde giderek yaygınlaşan

bir uygulama haline gelmiştir. Yapılan son istatistiklere göre, 2010 yılında elde edilen sığır embriyolarının yaklaşık üçte biri *in vitro* yöntemlerle üretilmiştir (15). Yardımcı üreme teknolojileri kapsamında *in vitro* olgunlaşma, dölleme ve embriyo kültürü protokolleri son on yılda önemli ölçüde geliştirilmiştir. Ancak bu gelişmelere rağmen, üretilen embriyolardan yalnızca çok azı tam gelişim sürecini başarıyla tamamlayabilmektedir. Bu durumun temel nedeni, *in vivo* ortamın koşullarını yeterince taklit edemeyen *in vitro* sistemlerin hâlâ istenilen düzeye ulaşamamasıdır. *In vitro* ortamlar ile *in vivo* ortamlar arasındaki en belirgin farklardan biri, ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS) düzeylerindeki artıştır (16).

Koyunların östrus döneminde maruz kaldıkları ısı stresi, dölleme sonrası embriyonal gelişimi olumsuz etkileyerek oositlerin verimliliğini azaltmaktadır (17). Isı stresinin bu olumsuz etkisi, olgunlaşmakta olan oositin mitokondriyal fonksiyonlarını bozabilir (18,19), yeterli düzeyde nükleer olgunlaşmanın tamamlanmasını engelleyebilir (20-23) ve gelişen embriyoların blastosist aşamasına ulaşma şansını azaltabilir (18, 22, 24). Benzer şekilde, IVE üretimi süreçlerinde de sıcaklık stresinin ciddi olumsuz etkileri söz konusudur. Bu etkilerden en önemlilerinden biri, ROS aşırı üretimiyle birlikte glutatyon (GSH) seviyesinin azalması sonucu ortaya çıkan oksidatif streştir (25). Oksidatif stres, hücre yapının bozulmasına neden olan ve hücre ölümüne yol açabilen, hücrelerin fizyolojik işlevlerini tehdit eden yaygın bir durumdur. Bu nedenle hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda oosit olgunlaşmasını olumsuz yönde etkileyebilir (25). Ayrıca sıcaklık stresi, oositi çevreleyen kumulus hücrelerinin nükleer ve sitoplazmik olgunlaşmasını ve işlevselliğini bozmakta, apoptozu tetiklemekte ve mitokondriyal aktivitenin azalmasına neden olmaktadır (24, 26-28).

Yapılan çalışmaların genel sonuçları, embriyo kültür ortamlarına antioksidan takviyesinin faydalı etkiler sağladığını ortaya koymaktadır. Ancak, bu antioksidanların klinik uygulamalardaki etkinliklerinin tam olarak anlaşılabilmesi için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. *In vitro* üretilen embriyo sayısının artmasıyla birlikte, *in vitro* embriyo üretim sistemlerinin yanı sıra antioksidan desteği ile olgunlaşma ve embriyo kültür sistemlerinin optimizasyonunun önemi giderek artacaktır. Çeşitli çalışmalarda, antioksidan takviyesinin etkisi araştırılmış ve olumlu veriler elde edilmiştir (29-31).

Son yıllarda, memeli embriyolarının *in vitro* kültürü için çeşitli serbest radikal temizleme sistemleri araştırılmıştır (32). Bu kapsamda, reaktif oksijen türlerini (ROS) te-

mizleyici bir ajan olarak melatonin; fare, domuz ve sığır embriyolarının *in vitro* gelişiminin desteklenmesinde test edilmiştir (32, 33). Ancak, melatoninin embriyo gelişimi üzerindeki doğrudan etki mekanizması hâlen tam olarak aydınlatılamamıştır. Iwata ve arkadaşlarının (2003) gerçekleştirdiği bir çalışmada, süperoksit dismutaz ve dimetil-tiourea gibi bazı antioksidanların oosit aspirasyonu sırasında kullanılması, embriyo üretimi üzerinde olumlu etkiler göstermiştir (34). Benzer şekilde, Rodriguez-Osorio ve arkadaşlarının (2007) yaptığı bir çalışmada ise, kültür ortamına 10^{-9} M konsantrasyonunda melatonin eklenmesinin, domuz embriyolarının *in vitro* üretimi (IVP) sırasında bölünme oranı ve blastosist hücre sayısı üzerinde belirgin derecede olumlu etkiler yarattığı bildirilmiştir (35). Çalışmamızda embriyo üretimi sırasında istenilen düzeyde bölünme oranları ve blastosist sayıları elde edilmiştir.

Domuz embriyoları üzerinde yapılan başka bir çalışmada, melatoninin sıcaklık stresine karşı kumulus hücrelerinin genişlemesi, bölünme oranları ve embriyoların blastosist oranları üzerindeki etkisi araştırılmış ve melatoninin bu parametreler üzerinde olumlu etkiler sağladığı belirlenmiştir (35). Diğer çalışmalarda olduğu gibi mevcut çalışmamız da melatonin koyun oositleri sıcak stresine karşı korumuş ve benzer şekilde etki göstermiştir. Morula aşamasına ulaşan oosit oranları açısından 39°C 'de melatonin içeren grup (%45,69) diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($P<0,05$). 41°C 'de melatonin içeren grup (%34,12) ile 39°C kontrol grubu (%35,30) benzer oranlarda morula elde edilmiştir. En düşük morula oranı ise 41°C kontrol grubunda (%2,89) gözlemlenmiştir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, melatoninin koyun oositlerinin *in vitro* olgunlaşması, fertilizasyon sonrası bölünme oranları ve blastosist gelişimi üzerinde olumlu etkiler sağladığı ve literatürdeki benzer çalışmalara kıyasla yüksek başarı oranı gösterdiği sonucuna varılmıştır. Gelecekte gerçekleştirilecek IVF çalışmalarında uygulanacak protokollere belirli bir standardizasyon dahilinde melatonin hormonunun eklenmesi, embriyo kalitesinin artırılması ve daha yüksek oranda embriyo elde edilmesi açısından potansiyel bir katkı sağlayabilir.

Teşekkür

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi TAO-2022-670 numaralı projeden sağlanan bütçe ile finanse edilmiştir. Bu makale Ahmet AKTAR'ın " Koyunlarda *in vitro* Oosit Matürasyonu Sırasında Uygulanan Melatonin Hormonunun Sıcaklık Stresi Üzerine Etkisinin Tüm Genom Ekspresyonu Düzeyinde Araştırılması " başlıklı doktora tezinden türetilmiştir.

Kaynaklar

1. Bergstein-Galan TG, Busato E, Abreu ACMR, Bertol MAF, Pereire JFS, Hartmann W, Bertol MAF. Reproduction Biotechnology in Farm Animals, (pp. 181-200). Avid Science, 2018.
2. Orland B. The invention of artificial fertilization in the eighteenth and nineteenth century. Hist Philos Life Sci, 39(2), 2017. <https://doi.org/10.1007/s40656-017-0136-3>
3. Betteridge KJ. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. Anim Reprod Sci, 79(3-4), 203-244, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00166-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00166-0)
4. Wilson SJ, Marion RS, Spain JN, Spiers DE, Keisler DH, Lucy MC. Effects of Controlled Heat Stress on Ovarian Function of Dairy Cattle. 1. Lactating Cows. J Dairy Sci, 81(8), 2124-2131, 1998. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(98\)75788-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(98)75788-1)
5. Agarwal A, Gupta S, Sharma, R. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective. Reprod Biomed Online, 11(5), 641-650, 2005. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61174-1](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61174-1)
6. Takahashi M. Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. Reprod Med Biol, 11(1), 37-47, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12522-011-0105-6>
7. Özdaş OB, Baran A, TAŞ M, Cirit U, Demir K, Bacınoğlu S, Pabuccuoğlu S, Ak K. Effect of different transport temperatures on *in vitro* maturation of oocytes collected from frozen-thawed sheep ovaries. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 37(1),15-19, 2013. <https://doi.org/10.3906/vet-1104-24>
8. Cipolla-Neto J, Do Amaral FG. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. Endocr Rev, 39, 990-1028, 2018. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00084>
9. Hardeland R. Taxon- and Site-Specific Melatonin Catabolism. Molecules, 21-22(11), 2015, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22112015>
10. Tamura H, Tanabe M, Jozaki M, Taketani T, Sugino N. Antioxidative Action of Melatonin and Reproduction. Glycative Stress Research, 6, 192-197. (2019). https://doi.org/10.24659/gsr.6.3_192
11. Lord T, Nixon B, Jones KT, Aitken RJ. Melatonin Prevents Postovulatory Oocyte Aging in the Mouse and Extends the Window for Optimal Fertilization *in vitro*. Biol Reprod, 88, 1-9, 2013. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106450>
12. Lin T, Lee JE, Kang JW, Oqani RK, Cho ES, Kim SB, Il

- Jin D. Melatonin Supplementation during Prolonged *in vitro* Maturation Improves the Quality and Development of Poor-Quality Porcine Oocytes via Anti-Oxidative and Anti-Apoptotic Effects. *Mol Reprod Dev*, 85, 665–68, 2018. <https://doi.org/10.1002/mrd.23052>
13. Marques TC, da Silva Santos EC, Diesel TO, Leme LO, Martins CF, Dode MAN, Alves, BG, Costa, F, de Oliveira, EB, Gambarini ML. Melatonin Reduces Apoptotic Cells, SOD2 and HSPB1 and Improves the *in vitro* Production and Quality of Bovine Blastocysts. *Reprod Domest Anim*, 53, 226–236, 2018. <https://doi.org/10.1111/rda.13097>
 14. Kaymakçı M. Sönmez R. Koyun yetiştiriciliği, Hasad Yayıncılık, İstanbul, 1992.
 15. Stroud B. IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter*, IETS Publications, 29, 14–23, 2011.
 16. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy, MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril*, 86, 503–512, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.02.088>
 17. Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Theriogenology*, 30, 195–209, 1988. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90169-0](https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90169-0)
 18. Rodrigues-Cunha MC, Mesquita LG, Bressan F, Collado MD, Balieiro JC, Schwarz KR, de Castro F, Watanabe, OY, Watanabe YF, Coelho LA, Leal CL. Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. *Theriogenology*, 86, 1685–1694, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.026>
 19. Payton RR, Rispol, LA, Nagle KA, Gondro C, Saxton AM, Voy BH, Edwards JL. Mitochondrial-related consequences of heat stress exposure during bovine oocyte maturation persist in early embryo development. *J Reprod Dev*, 64, 243–51, 2018. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-160>
 20. de Castro e Paula LA, Hansen PJ. Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 68, 763–770, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.005>
 21. Meiyu Q, Liu D, Roth Z. IGF-I slightly improves nuclear maturation and cleavage rate of bovine oocytes exposed to acute heat shock *in vitro*. *Zygote*, 23, 514–24, 2015. <https://doi.org/10.1017/S096719941400015X>
 22. Roth Z, Hansen PJ. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol Reprod*, 71, 1898–906, 2004. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031690>
 23. Roth Z, Hansen PJ. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reprod*, 129, 235–44, 2005. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00394>
 24. Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote*, 20, 249–59, 2012. <https://doi.org/10.1017/S0967199411000220>
 25. Li Y, Zhang Z, He C, Zhu K, Xu Z, Ma T, Tao J, Liu, G. Melatonin protects porcine oocyte *in vitro* maturation from heat stress. *J Pineal Res*, 59, 365–375, 2015. <https://doi.org/10.1111/jpi.12268>
 26. Hansen PJ. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*, 364, 3341–3350, 2009. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0131>
 27. He C, Wang J, Zhang Z, Yang M, Li Y, Tian X, Ma T, Tao J, Zhu K, Song Y, Ji P, Liu G. Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte's quality under *in vitro* conditions. *Int J Mol Sci*, 17, 939, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17060939>
 28. Roth Z. Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 43(2), 238–244, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01168.x>
 29. Perreault SD, Barbee RR, Slott VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol*, 125(1), 181–186, 1988. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90070-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90070-x)
 30. Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in-vitro. *Mol Reprod Dev*, 31, 68–71, 1992. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310112>
 31. Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod*, 49, 89–94, 1993. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.1.89>
 32. Poleszczuk O, Papis kwenta-Muchalska E. An effect of melatonin on development of bovine embryos cultured *in vitro* under optimal or enhanced oxygen ten-

- sions. *Reprod Fertil Dev*, 17, 224, 2005.
33. Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K, Amemiya A, Itoh MT. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. *J Pineal Res*, 28, 48–51, 2000. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2000.280107.x>
34. Iwata H, Ohota M, Hashimoto Snagai Y. Free oxygen radicals are generated at the time of aspiration of oocytes from ovaries that have been stored for a long time. *Zygote*, 11, 1–5, 2003. <https://doi.org/10.1017/s0967199403001011>
35. Rodriguez-Osorio N, Kim IJ, Wang H, Kaya A. Memili E. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos *in vitro*. *Journal of Pineal Research*, 43, 283–288, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00475.x>