

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ASTAKSANTİN TAKVİYESİ'NİN
MALATHION TOKSİSİTESİ'NE MARUZ BIRAKILMIŞ
FARE OOSİT MATÜRASYONU'NA
EGFR ARACILI ERK1/2 SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN
ETKİLERİ'NİN İNCELENMESİ

BURAK TOZUN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-22038 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2024

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Burak TOZUN tarafından hazırlanan “Astaksantin Takviyesi’nin Malathion Toksisitesi’ne Maruz Bırakılmış Fare Oosit Matürasyonu’na EGFR Aracılı ERK1/2 Sinyal Yolağı Üzerinden Etkileri’nin İncelenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06/11/2024

Üye (T.D.)	: Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ	Aydın ADÜ Tıp Fakültesi	
Üye	: Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN	Aydın ADÜ Tıp Fakültesi	
Üye	: Prof. Dr. Recep KUTLUBAY	Denizli PAÜ Tıp Fakültesi	

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Yollarımız kesiştiğinden beri, her konuda kendimi geliştirmem için elinden geleni yapan, yalnızca engin akademik bilgisi ve tecrübesini değil hayat tecrübelerini de benimle paylaşan, yardım elini uzatmaktan asla çekinmeyen, kendisini tanıma fırsatı elde ettiğim için şanslı hissettiğim çok değerli akıl hocam, ağabeyim ve danışmanım Sayın Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca, babacan tavrını ve sonsuz tecrübesini benden hiç esirgemeyen, bana ve tüm bölüm arkadaşlarıma bir aile ortamı sunan, bu yolda ilerlerken desteğini hep yanımda hissettiğim çok kıymetli anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN başta olmak üzere, derin bilgi ve birikimlerinden istifade ettiğim, aldığım dersler sayesinde kendimi geliştirmemde katkıları olan hocalarım Sayın Prof. Dr. Kemal ERGİN ve Sayın Doç. Dr. Kadri Murat GÜRSES'e, sevgili bölüm arkadaşlarıma ve değerli anabilim dalı asistanlarımıza,

Tez çalışmam boyunca ne zaman yardıma ihtiyacım olsa sevecenlikle bana zaman ayıran, akademik başarısına hayran olduğum ve bizlere örnek olan değerli hocam Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Özge ÇEVİK'e, bilgi ve deneyimiyle yardım elini uzatan Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mahmut Alp KILIÇ'a ve temel araştırma laboratuvarları bünyesinde çalışmalarını sürdüren, bu yolda birlikte ilerlediğim tüm değerli arkadaşlarıma,

Tez çalışmam sürecinde ihtiyacım olan yardımları ve manevi desteklerini benden asla esirgemeyen, umutsuzluğa kapılıp düştüğüm her anda elimden tutup kaldıran sevgili arkadaşlarım Gökhan DAVAS, Aslıhan KÜÇÜK ve Nur Sevim KALKAN'a,

Bana verdiği sevgi ve değeri her zaman hissettiğim, kilometreler ötede bile birlikte gülüp birlikte ağladığım, huysuzluklarıma rağmen yanımda duran sevgili dostum Seyhan HELVACI'ya,

En önemlisi de, varlığımı borçlu olduğum, ellerinden gelenin en iyisiyle beni yetiştirmeye çalışan, hayatım boyunca bana hep inanan gözlerle bakan, sadece bu tezin gerçekleşmesinde değil her zaman desteği ve sabrı ile yanımda olan canım annem Ümmü TOZUN ve canım babam Erol TOZUN'a,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
ÖZET.....	xv
ABSTRACT	xvi
1.GİRİŞ	1
1.1.Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2.Araştırmanın Amacı	3
1.3.Araştırmanın Hipotezleri.....	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ovaryum.....	4
2.1.1. Oogenez ve Ovaryan Folliküllerin Intrauterin Gelişimi	5
2.1.2. Ovaryan Folliküllerin Histolojisi	7
2.1.2.1. Primordiyal Folliküller.....	7
2.1.2.2. Gelişmekte Olan Folliküller.....	8
2.1.2.2.1. Primer Folliküller	8
2.1.2.2.2. Sekonder (Antral) Folliküller	10
2.1.2.3. Olgun (Graff) Folliküller	11

2.1.3. Ovulasyon	12
2.2. Oosit Matürasyonu	14
2.2.1. Oosit Nükleer Matürasyonu	15
2.2.1.1. Oosit GV Arrestinin Sürdürülmesi	15
2.2.1.2. MPF Aktivasyonu ve Germinal Vezikül Yıkımı	17
2.2.2. Oosit Sitoplazmik Matürasyonu	18
2.2.2.1. Sitoplazmik Organellerin Yeniden Düzenlenmesi	19
2.2.2.2. Hücre İskeleti'nin Yeniden Yapılandırılması	22
2.2.3. Oosit Matürasyonu ve EGFR Aracılı ERK1/2 Sinyal Yolağı	23
2.2.4. Oosit Matürasyon Anormallikleri	28
2.3. <i>In Vitro</i> Matürasyon	31
2.4. Pestisitler	35
2.4.1. Malathion	38
2.5. Oksidatif Stres, ROS ve Serbest Radikaller	41
2.5.1. Oksidatif Stres'in Kadın İnfertilitesi ve Oosit Matürasyonu'na Etkileri	44
2.6. Antioksidanlar	46
2.6.1. Astaksantin	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM	52
3.1. Gereç	52
3.1.1. Cihazlar	52
3.1.2. Hayvan Materyali	53
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
3.2. Yöntem	55
3.2.1. Deney Tasarımı	55
3.2.2. Oosit Eldesi ve <i>In Vitro</i> Matürasyon (IVM)	58
3.2.3. Malathion ve Astaksantin İçin Etkin Doz Belirleme	60
3.2.4. Mayotik İş İplikleri ve Kromozomların Değerlendirilmesi	61

3.2.5. Hücre İçi ROS Seviyelerinin Tespiti.....	62
3.2.6. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Ölçülmesi.....	62
3.2.7. Apoptoz'un Değerlendirilmesi.....	63
3.2.8. ERK1/2 Fosforilasyonu Floresan Yoğunluğunun İncelenmesi.....	63
3.2.9. ERK1/2 İlişkili Gen İfadelerinin qPCR ile Belirlenmesi	63
3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme	65
4. BULGULAR	66
4.1. Mayotik Matürasyon Oranları.....	66
4.2. Mayotik İğ İplikleri ve Kromozomlar	71
4.3. Hücre İçi ROS Seviyeleri.....	73
4.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli	76
4.5. Apoptoz	79
4.5. ERK1/2 Fosforilasyonu.....	81
4.6. ERK1/2 İlişkili Gen İfadeleri	86
5. TARTIŞMA	88
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	98
KAYNAKLAR	100
EKLER.....	129
Ek 1 (AYDIN ADÜ-HADYЕК).....	129
Ek 2 (Tez Önerisi Onay Belgesi)	130
Ek 3 (Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası).....	131
BİLİMSEL ETİK BEYANI	132
ÖZ GEÇMİŞ	133

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
ACh	: Asetil kolin
AChE	: Asetil Kolin Esteraz
Akt	: Protein Kinaz B
ARE	: Antioksidan Yanıt Elemanı
AREG	: Amphiregulin
AST	: Astaksantin
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bax	: Bcl-2 ile İlişkili X Proteini
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma 2
BMK1	: Büyük MAPK 1
BMP15	: Kemik Morfogenezi Protein 15
BSA	: Sığır Serum Albümini
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	: Katalaz
cdc25B	: Siklin Bağımlı Kinaz 25B
cDNA	: Kopya DNA
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
CO₂	: Karbon Dioksit
CSF	: Sitostatik Faktör

Cx37	: Konneksin 37
Cx43	: Konneksin 43
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Fenilindol
DCDHF-DA	: 2,7-Dichlorodihydrofluorescein Di-Acetate
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DOC1R	: Ağız Kanserinde Silinen 1 ile İlgili
DUSP	: Dual-Spesifik Fosfatazlar
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EREG	: Epiregulin
ERK	: Hücre Dışı Sinyal ile Düzenlenen Kinaz
ERK1/2	: Hücre Dışı Sinyal ile Düzenlenen Kinaz 1 ve 2
FBS	: Fetal Sığır Serumı
FCS	: Fetal Dana Serumı
FITC	: Flüorescein İzotiyosiyanat
FSH	: Follikül Uyarıcı Hormon
GAPDH	: Glikeraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
GDF9	: Büyüme ve Farklılaşma Faktörü 9
GDP	: Guanozin Difosfat
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GnRH-a	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Analogları
GTP	: Guanozin Trifosfat
GV	: Germinal Vezikül
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
Has2	: Hyaluronan Sentaz 2

hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
HIF	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör
HMG	: İnsan Menapozal Gonadotropini
ICSI	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IL-1β	: İnterlökin-1 Beta
IU	: Uluslararası Birim
IVF	: <i>In Vitro</i> Fertilizasyon
IVM	: <i>In Vitro</i> Matürasyon
İ.p.	: İntraperitoneal
JNK	: c-Jun N-Terminal Kinazlar
KEAP1	: Kelc Benzeri ECH İlişkili Protein 1
kg	: kilogram
KOK	: Kumulus-Oosit Kompleksi
LH	: Luteinleştirici Hormon
LHR	: LH Reseptörü
MAL	: Malathion
MAP2K	: MAPK Kinaz
MAP3K	: MAPK Kinaz Kinaz
MAPK	: Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz
mg	: Miligram
MI	: Mayoz I
MII	: Mayoz II
MISS	: Mitojen ile İndüklenen Sinyal Yolu
MKP	: MAPK Fosfatazları
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre

mM	: Milimolar
MPF	: Matürasyon Teşvik Edici Faktör
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
ng	: Nanogram
NOX	: NADPH Oksidaz
Nrf2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 İlişkili Faktör 2
°C	: Santigrat Derece
OCP	: Organoklorin Pestisitler
OHSS	: Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu
OMYS	: Oosit Matürasyon Yetmezliği Sendromu
OP	: Organofosfatlar
p38	: p38 Kinaz
PBI	: Birinci Polar Cisimcik
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PCO	: Polikistik Over
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PDE3A	: Fosfodiesteraz 3A
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGH	: Primordiyal Germ Hücresi
pH	: Hidrojenin Gücü
PI3K	: Fosfotidilinozitol 3-Kinaz

PKAI	: Protein Kinaz A Tip 1
PMSG	: Kısrak Serum Gonadotropini
PSS	: Çevresel Sinir Sistemi
Ptgs2	: Prostaglandin-Endoperoksid Sentaz 2
PTP	: Protein Tirozin Fosfataz
Ptx3	: Pentraxin 3
RAF	: Hızla İvmelenen Fibrosarkom
RAS	: Rat Sarkoma
RNA	: Ribonükleik Asit
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RSK	: p90 Ribozomal S6 Kinaz
RSS	: Reaktif Kükürt Türleri
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAC	: İğ İpliği Oluşumu Kontrol Noktası
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SPSS	: İstatistiksel Paket Programı
Tnfaip6	: Tümör Nekroz Faktör Alfa Kaynaklı Protein 6
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
ZP	: Zona Pellusida
α-MEM	: Alfa Minimum Esansiyal Besiyeri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Dişi üreme sistemi anatomisi ve ovaryum histolojisi.	4
Şekil 2. 3 haftalık bir embriyoda PGH pozisyonu.	6
Şekil 3. Primordiyal follikül.	8
Şekil 4. Unilaminar primer follikül.....	9
Şekil 5. Multilaminar primer follikül.....	10
Şekil 6. Sekonder follikül.	11
Şekil 7. Olgun follikül.	12
Şekil 8. Ovulasyon'un şematik gösterimi.	13
Şekil 9. Oosit matürasyon sürecinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 10. Oosit GV aşaması arrest'inin moleküler mekanizması.	16
Şekil 11. Oosit GVBD'nin moleküler mekanizması.....	18
Şekil 12. Oosit matürasyonu sırasında organel dağılımının şematik gösterimi.....	21
Şekil 13. Oosit matürasyonu sırasında iç ipliğinin kortikal bölgeye göçü.	22
Şekil 14. MAPK sinyal yolağının şematik gösterimi.	24
Şekil 15. Oosit matürasyonunda yer alan sinyal ağı.	25
Şekil 16. Kumulus hücre genişlemesinde ERK1/2'nin etkisi.....	26
Şekil 17. Mayoz bölünme sırasında ERK1/2'nin rolü.	27
Şekil 18. Organofosfat pestisitlerin dişi kemirgen üreme sistemi üzerindeki etkileri.	38
Şekil 19. Malathion'un Malaokson'a dönüşümünün kimyasal gösterimi.	39
Şekil 20. Malathion'un hücreler üzerindeki etkileri.	41
Şekil 21. Hücre içi oksidatif stres hasarı.....	43
Şekil 22. ROS'un <i>in vitro</i> oosit matürasyonu ve embriyo gelişimi üzerindeki etkileri.	45
Şekil 23. Oositlerde apoptoz moleküler mekanizması.....	46

Şekil 24. Antioksidanların sınıflandırılması.	48
Şekil 25. Karotenoidlerin sınıflandırılması.....	49
Şekil 26. Astaksantin'in kimyasal yapısı.	50
Şekil 27. Hücre membranı üzerinde Astaksantin yerleşiminin gösterimi.....	51
Şekil 28. Deney tasarımının şematik gösterimi.	57
Şekil 29. Artan MAL konsantrasyonları ile elde edilen matürasyon oranları grafiği.....	68
Şekil 30. MAL'a maruz kalan oositlerde farklı konsantrasyonlarda AST dozlarına bağlı matürasyon oranları grafiği.	69
Şekil 31. Deney gruplarına ait MII oosit oranları grafiği.	71
Şekil 32. Deney gruplarına ait anormal iğ ipliği oranları grafiği.....	73
Şekil 33. Deney gruplarına ait ROS floresan yoğunlukları grafiği.....	75
Şekil 34. Deney gruplarına ait MMP floresan yoğunlukları grafiği.	78
Şekil 35. Deney gruplarına ait pozitif annexin-v yüzdelikleri grafiği.	80
Şekil 36. Deney gruplarına ait ERK floresan yoğunlukları grafiği.	83
Şekil 37. Deney gruplarına ait pERK floresan yoğunlukları grafiği.	85
Şekil 38. Deney gruplarına ait Has2, Ptx3, Ptgs2 mRNA ekspresyonları grafiği.	87

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Çalışmada kullanılan deney hayvanları.....	53
Resim 2. 6-8 haftalık dişi farelere intraperitoneal PMSG enjeksiyonu.....	55
Resim 3. Enjeksiyondan 48 saat sonra ovaryum eldesi ve temizlenmesi.....	56
Resim 4. Ovaryum'un mekanik parçalanması ve KOK eldesi.....	58
Resim 5. KOK izolasyonu ve ağız pipeti ile çalışma medyumlarına taşınması.....	59
Resim 6. <i>In vitro</i> matürasyon kültürüne alınmış GV oosit içeren KOK'lar.....	59
Resim 7. Deneyde kullanılan çalışma petrilere.....	60
Resim 8. İğ ipliği ve kromozom incelemesi için hazırlanan preparatlar.....	61
Resim 9. MII oositlerin mitotracker ile inkübasyonu öncesi ve sonrası.....	62
Resim 10. İnkübasyon öncesi ve sonrası kumulus oosit kompleksi.....	67
Resim 11. Malathion maruziyeti sonrası oositlere ait mikrograflar.....	67
Resim 12. Astaksantin takviyesi sonrası oositlere ait mikrograflar.....	68
Resim 13. Deney gruplarına ait IVM sonrası oositler.....	70
Resim 14. Deney gruplarına ait iğ ipliği ve kromozomların immünfloresan gösterimi.....	72
Resim 15. Deney gruplarına ait ROS yoğunluklarının floresan mikroskop gösterimi.....	74
Resim 16. Deney gruplarına ait MMP'nin konfokal mikroskop görüntüsü.....	77
Resim 17. İnkübasyon sonrası elde edilen negatif ve pozitif annexin-v oositler.....	79
Resim 18. Deney gruplarına ait KOK'larda ERK1/2'lerin immünfloresan gösterimi.....	82
Resim 19. Deney gruplarına ait KOK'larda pERK1/2'lerin immünfloresan gösterimi.....	84

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Deneyde kullanılan cihazlar.	52
Tablo 2. Deneyde kullanılan kimyasal madde ve kitler.	54
Tablo 3. Deneyde kullanılan primer baz dizileri.	64

ÖZET

ASTAKSANTİN TAKVİYESİ'NİN MALATHION TOKSİSİTESİ'NE MARUZ BIRAKILMIŞ FARE OOSİT MATÜRASYONU'NA EGFR ARACILI ERK1/2 SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN ETKİLERİ'NİN İNCELENMESİ

Tozun B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2024.

Amaç: Bu projede, malathion toksisitesine maruz kalan oositlerde astaksantin desteğinin, *in vitro* matürasyon sürecine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, 6-8 haftalık dişi BALB/C farelere PMSG enjeksiyonu yapılarak 48 saat sonra ovaryumları toplanmış ve izole edilen kumulus-oosit kompleksleri (KOK) *in vitro* matürasyon medyumunda kültüre edilmiştir. Malathion ve astaksantin etkin dozları belirlenerek deney grupları oluşturulmuştur. İmmünofloresan görüntüleme ile iğ ipliği ve kromozom yapıları incelenmiş, ERK1/2 aktivasyonu analiz edilmiş, hücre içi ROS seviyeleri ve mitokondriyal membran potansiyeli ölçülmüş, apoptoz oranları değerlendirilmiştir. ERK1/2 ile ilişkili gen ekspresyonları ise RT-PCR ile incelenmiştir. Veriler, varyans analizi ve ki-kare testi ile SPSS programında değerlendirilmiştir.

Bulgular: Elde edilen deney sonuçlarına göre, malathion'un oosit matürasyon oranlarını düşürdüğü, kusurlu iğ ipliği ve dağınık kromozom oranlarını artırdığı, hücre içi ROS seviyelerini yükselttiği, mitokondriyal aktiviteyi azalttığı, erken apoptotik süreçleri tetiklediği ve ERK1/2 aktivasyonunu engellediği gözlemlenmiştir. Ancak, astaksantin takviyesinin malathion'a bağlı olarak gelişen olumsuz bulgulara karşıt bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışma, malathionun BALB/C farelerden izole edilen kumulus-oosit kompleksleri (KOK) üzerindeki zararlı etkilerini ve astaksantin bu etkilere karşı koruyucu potansiyelini ortaya koymuştur. Malathion, oosit canlılığı ve matürasyonunu olumsuz etkilerken, astaksantin bu etkileri iyileştirmiştir. Bu bulgular, astaksantin infertilite tedavisinde potansiyel bir destekleyici olarak kullanılabileceğini önermektedir.

Anahtar kelimeler: Astaksantin, ERK1/2, *In Vitro* Matürasyon, Malathion, Oosit.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ASTAXANTHIN SUPPLEMENTATION ON MALATHION TOXICITY-EXPOSED MOUSE OOCYTE MATURATION VIA EGFR MEDIATED ERK1/2 SIGNALING PATHWAY

Tozun B. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Histology and Embryology (Medicine) Program, Master Thesis, Aydın, 2024.

Objective: This project aims to investigate the effects of astaxanthin supplementation on the *in vitro* maturation process of oocytes exposed to malathion toxicity.

Material and Methods: In this study, 6-8 week-old female BALB/C mice were injected with PMSG, and 48 hours later, their ovaries were collected. The isolated cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured in an *in vitro* maturation medium. Effective doses of malathion and astaxanthin were determined to establish the experimental groups. Spindle and chromosome structures were examined using immunofluorescence imaging, ERK1/2 activation was analyzed, intracellular ROS levels and mitochondrial membrane potential were measured, and apoptosis rates were assessed. Gene expressions related to ERK1/2 were analyzed by RT-PCR. The data were evaluated using variance analysis and chi-square test with SPSS software.

Results: Based on the obtained experimental results, it was observed that malathion decreased oocyte maturation rates, increased the percentage of defective spindle fibers and scattered chromosomes, elevated intracellular ROS levels, reduced mitochondrial activity, triggered early apoptotic processes, and inhibited ERK1/2 activation. However, it was determined that astaxanthin supplementation counteracted the adverse effects induced by malathion.

Conclusion: This study demonstrates the harmful effects of malathion on cumulus-oocyte complexes (COCs) isolated from BALB/C mice and the protective potential of astaxanthin. Malathion adversely affects oocyte viability and maturation, while astaxanthin ameliorates these effects. These findings suggest that astaxanthin could be a supportive agent in infertility treatments.

Keywords: Astaxanthin, ERK1/2, In Vitro Maturation, Malathion, Oocyte.

1.GİRİŞ

1.1.Problemin Tanımı ve Önemi

İnfertilite, dünya genelinde milyonlarca bireyin karşılaştığı önemli bir halk sağlığı sorunudur ve kadınlarda görülen infertilite bu sorunun neredeyse yarısını oluşturmaktadır. Kadınlarda infertilite tanısı alanların, yaklaşık %8,6-15,2'sinin mayotik olarak yetersiz en az bir oosit ürettiği bilinmektedir. Oositlerin %25'inden fazlası matürasyon göstermediğinde ise, başarılı fertilizasyon ve klinik gebelik oranlarında bir düşüş gerçekleşir (Beall ve diğerleri, 2010; Bhattacharya ve diğerleri, 2010).

Kadınlarda görülen infertilite çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Yaş, kronik hastalıklar, genetik ve hormonal dengesizlikler gibi içsel faktörlerin yanı sıra, yaşam tarzı, sigara, alkol ve uyuşturucu tüketimi gibi dışsal etmenler de önemli rol oynamaktadır. Ayrıca ağır metaller, kimyasal maddeler ve pestisitler gibi çevresel faktörler de kadınların infertilite riskini artırabilir (Kumar ve diğerleri, 2019).

Pestisitler, insan, hayvan, bitki ve cansız yüzeylerdeki zararlıları öldürmek veya kontrol altına almak için kullanılan kimyasal bileşiklerdir ve tüm canlılar için potansiyel zehir riski taşırlar; bu nedenle dikkatli kullanılmaları gerekmektedir. Organofosfatlar (OP) ise hem tarımda hem de haşere kontrolünde yaygın olarak kullanılan pestisit sınıflarındandır (Howard ve Pope, 2002). Bu grubun örneklerinden biri olan malathion, dünya genelinde sivrisinek mücadelesinde, tarımda ve bazı cilt hastalıklarının tedavisinde (Malathion losyonu) sıkça kullanılmaktadır (Luo ve diğerleri, 2016). Yaygın kullanımı nedeniyle, içme suyu (Shayeghi ve diğerleri, 2012), yiyecekler (Raghu ve diğerleri, 2014) ve gıda maddelerinde (Francis ve diğerleri, 2017) bulunan yüksek seviyedeki malathion kalıntılarına maruziyet kaçınılmazdır.

Lipofilik bir yapıya sahip malathion, hücre zarına kolayca bağlanarak yapısal hasarlara ve hücre içi serbest radikal seviyelerinin artışına neden olur (Rieger ve diğerleri, 2017a). Artan oksidatif stres, oositlerde mayoz bölünme sırasında iğ ipliklerinin düzenlenmesi ve kromozomların ayrılması gibi önemli mitokondriyal işlevlerde hasara yol açar (Z. Jiang ve Shen, 2022). Ayrıca, mitokondriyal hasar apoptoz içsel yolunu aktive eder ve oositlerde apoptoz sürecini başlatır (Chaube ve diğerleri, 2005).

Fertilite için oosit matürasyonunun başarılı olabilmesi, kumulus-oosit komplekslerinde (KOK) kumulus hücrelerinin genişlemesi, besinlerin ve sinyallerin transferi yoluyla mayoz bölünmenin durdurulması ve yeniden başlatılmasını gerektirir (S. Liu ve diğerleri, 2015). Oosit matürasyonunda, epidermal büyüme faktörü (EGF), epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) aktive eder. EGFR'in aşağı akış sinyali, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar 1 ve 2'yi (ERK 1/2) fosforile ederek aktive eder, böylece kumulus hücresi genişleme faktörlerinin salgılanması ve mayotik olgunlaşma teşvik edilmiş olur (Z. Liu ve diğerleri, 2010; Sugimura ve diğerleri, 2015).

Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz/mitojenle aktive olan protein kinaz (ERK/MAPK) sinyali, ökaryotik hücrelerde yaygın bir serin/treonin protein kinaz ailesidir (Fan ve Sun, 2004a). Birçok çalışma, EGFR aracılı ERK1/2 sinyali aktivasyonunun oosit olgunlaşmasında kritik rol oynadığını bildirmiştir. ERK/MAPK aktivasyonu, KOK'larda mayotik yeniden başlatmayı, iğ iplikçiği oluşumunu ve MII fazında duraklamayı düzenler (Tong ve diğerleri, 2003; Verlhac ve diğerleri, 1994). Oksidatif stresin artışı, granüloza hücrelerinde ERK1/2 sinyalinin bozulmasına neden olur ve bu durum oositlerin olgunlaşmasını, kumulus hücresi genişlemesini ve ovulasyonu başarısız kılabilir (Fan ve diğerleri, 2009).

Astaksantin (AST) ise, karotenoidlerin ksantofil ailesine mensup bir üye olup, deniz canlılarının kabuklarında doğal olarak bulunan ve yağda çözünen kırmızı/turuncu bir pigmenttir (Hu ve diğerleri, 2018; Zheng ve diğerleri, 2013). Astaksantin molekülü, iyonon halkalarının uçlarında bulunan polar bölge sayesinde serbest radikalleri nötralize ederken, merkezinde 13 bağ yapmış polar olmayan bir bölgeye sahiptir. Bu yapı, yüksek enerjili elektronların ortamdan uzaklaştırılmasına yardımcı olur. İyonon halkalarının uçlarındaki polar bölge, astaksantin hücre zarından geçişini de oldukça kolaylaştırır (Tume ve diğerleri, 2009). Hidrofilik ve lipofilik özellikleri bir arada barındıran astaksantin, bu sayede hücre membranının iç ve dış yüzeylerine eşit afinitede bağlanabilir. Bu özellik, hücre yüzeyindeki ve çift tabakalı membranın iç kısmındaki serbest radikalleri etkisiz hale getirmesini sağlar. Ayrıca, mitokondriyal redoksu ve işlevsel bütünlüğü tamamen korur, bu nedenle β -karoten ve C vitamini gibi yalnızca membranın tek bir bölgesinde konumlanabilen antioksidanlardan çok daha eşsizdir (Yamashita, 2015).

1.2.Araştırmanın Amacı

Astaksantin'in antioksidan etkileri göz önüne alındığında, malathion kaynaklı oosit hasarına karşı dişi üreme parametrelerini koruyabileceği açıktır. Bu nedenle, bu proje, Malathion toksisitesine maruz kalmış oositlerin, astaksantin takviyesi ile birlikte matürasyon süreçlerinde oksidatif stres, iğ ipliği ve kromozomal yapı, mitokondriyal aktivite gibi parametrelerin yanı sıra kumulus hücrelerinde bulunan ve oosit matürasyonunu düzenleyen EGFR aracılı ERK1/2 aktivasyonu açısından araştırılmasını hedeflemektedir. Literatür incelemesiyle birlikte, dişi farelerde üreme parametrelerinde astaksantin malathion ile indüklenen matürasyon hasarına karşı etkilerini değerlendiren bir çalışma olmadığı görülmüş olup, bu durum projenin özgün kısmını oluşturmaktadır.

1.3.Araştırmanın Hipotezleri

H1: Malathion maruziyeti, kumulus hücrelerinde EGFR aracılı ERK1/2 aktivitesini düşürerek *in vitro* matürasyonu (IVM) olumsuz yönde etkiler ve oosit matürasyon oranlarını düşürür.

H2: Astaksantin takviyesi, malathion'un neden olduğu olumsuz etkileri azaltır, kumulus hücrelerinde bulunan EGFR aracılı ERK1/2 aktivitesini artırır ve oosit matürasyon oranlarını yükseltir.

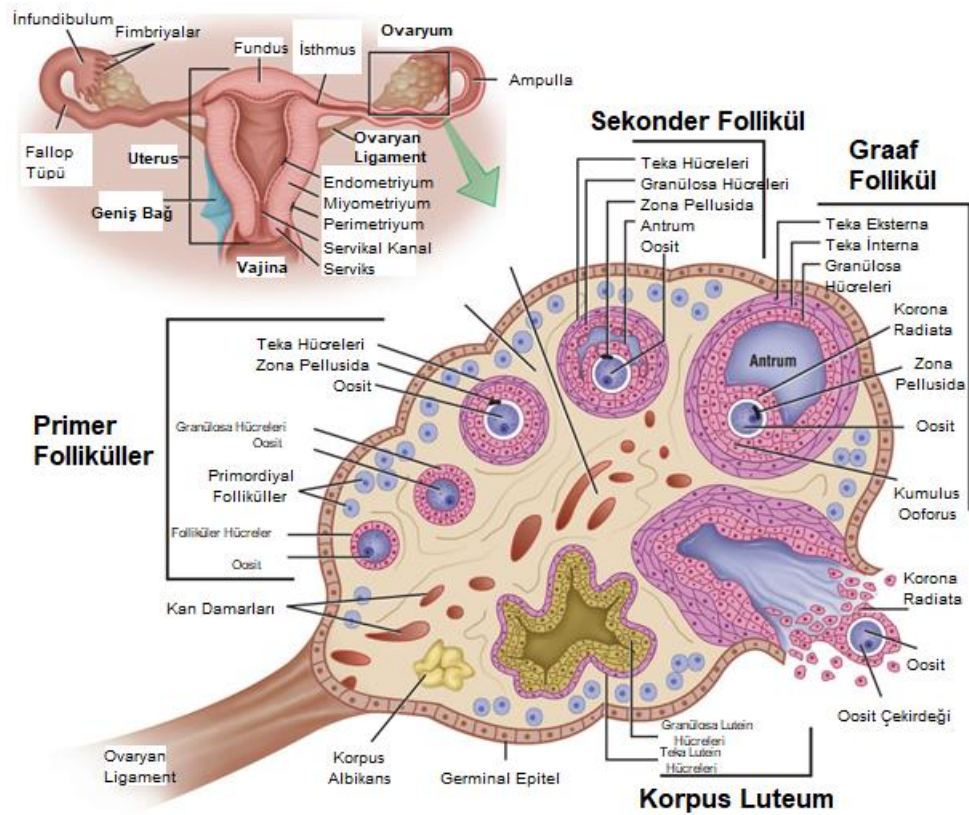
H3: Malathion maruziyeti ile meydana gelen iğ ipliği ve kromozom anormallikleri astaksantin takviyesi ile düzeltilir.

H4: Malathion'un etkisi altında bulunan oositlerde astaksantin kullanımı, ROS seviyelerini düşürür, mitokondri membran potansiyelini iyileştirir, apoptozu azaltır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

Ovaryum, dişi üreme sisteminde iç genital organlar arasında yer alan, dişi ana üreme hücresi olan ovum'u ve dişiye özgü cinsiyet hormonları olan progesteron ve östrojeni üretmekle görevli bir çift organdır. Anatomik olarak pelvis'in yan duvarlarına yakın, fallop tüplerinin distalinde yer alan, ligamentler yardımıyla uterusu ve pelvis duvarına bağlanmış şekilde asılı durmaktadırlar (Şekil 1). Pembe/gri arası bir renge sahip olan ovaryumların dış yüzeyi puberte öncesinde düzgün iken puberte sonrası ovulasyonların başlamasıyla birlikte gittikçe pürüzlü bir görünüm almaya başlar. Ortalama olarak bir badem büyüklüğünde olan ovaryum 3-4 cm boyda, 1,5-2 cm genişlikte ve 1 cm kalınlıkta olmasıyla birlikte, yaklaşık 5 gr ağırlığındadır.



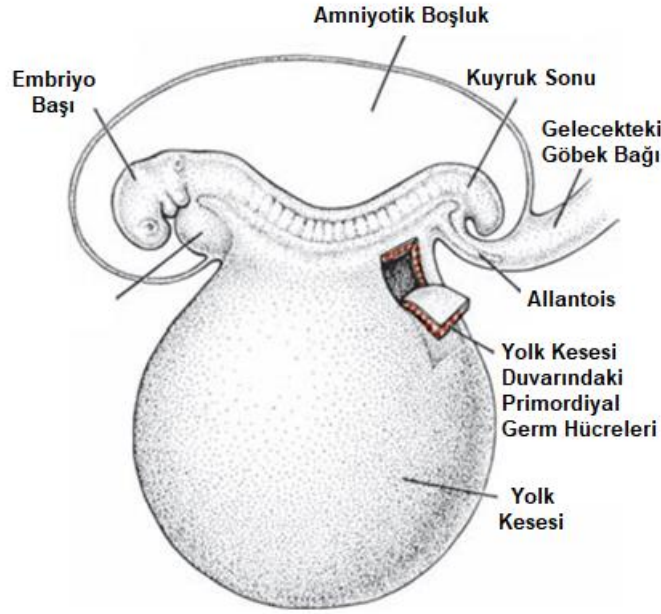
Şekil 1. Dişi üreme sistemi anatomisi ve ovaryum histolojisi (Eroschenko, 2013).

Ovaryum'un en dış katmanına bakıldığında periton zarı ile örtülü olduğunu görülmektedir. Ancak puberte ile birlikte tek katlı yassı epitel olan periton zarı, yerini yine yer yer tek katlı yassı epitel olmakla birlikte çoğunlukla tek katlı kübik epitelden oluşan germinal epitele bırakır. Histolojik olarak incelendiğinde germinal epitel tabakasının hemen altında kollajen liflerce zengin sıkı bağ dokusu yapısında olan tunica albuginea yer almaktadır. Onun da altında ise, artık ovaryumun esas dokusu olarak nitelendirebileceğimiz dışta korteks içte medulla olmak üzere birbirinden keskin çizgilerle ayrılamayan iki katman ile karşılaşırız. Medulla bölgesi, ovaryumun merkezinde yer alan, hilus adı verilen bir bölgeden ovaryuma giren kan ve lenf damarlarını, sinirleri, intertisiyel hücreleri barındıran gevşek bağ dokusu yapısında bir katmandır. Ovaryumun fonksiyonel bölgesi olan korteks tabakası ise, ovaryumun periferinde yer alır ve hücrece zengin bir bağ dokusu içene gömülü halde bulunan follikülleri içerir (Şekil 1). Folliküller intrauterin hayatta oluşmaya başlayarak puberteyle birlikte gelişme evresine girer, oogenez süreci ile birlikte ovumun oluşmasına ve steroidonegenez süreciyle birlikte canlının endokrin sistemine katkı sağlar (Kuruş, 2020; Ross ve Pawlina, 2011).

2.1.1. Oogenez ve Ovaryan Folliküllerin Intrauterin Gelişimi

Embriyonik hayatın başlayabilmesi için erkek ve dişi germ hücrelerinin zigotu oluşturabilecek yeterliliği edinebilmeleri gerekmektedir. Bu yeterlilik gametogenez adı verilen bir hücresel gelişme ve olgunlaşma süreci ile gerçekleşir. Bu süreç erkek germ hücreleri için spermatogenez, dişi germ hücreleri için ise oogenez olarak adlandırılır. Gametogenez'in temelleri intrauterin hayatta atılmaktadır. Germ hücrelerinin kökeni olan primordiyal germ hücreleri (PGH), embriyonik yaşamın 3. haftasında vitellus kesesinin allantoise bakan yüzeyinde bulunan endoderm hücreleri arasında belirmeye başlar (Şekil 2). 4. hafta ile birlikte ameboid hareketler gösteren PGH'ler, tek tek veya gruplar halinde intermediyet mezoderm tabakası içerisinde bir çift olarak gelişmekte olan gonadal kabartılara doğru göç etmeye başlarlar. Göç sırasında yoğun mitotik aktivite göstererek sayılarını arttıran PGH'ler dışilerde, 5. hafta itibariyle ulaştıkları hedefleri içerisinde de proliferasyonlarına devam ederek oogonium adı verilen hücrelere farklılaşırlar. Gonadal kabartı içerisinde bulunan oogoniumlar, intermediyet mezoderm kökenli somatik hücrelerle ileride primordiyal follikülleri oluşturmak üzere bir arada bulunmaktadır. Gelişimin 12-13. haftasına gelindiğinde ise hala sürekli olarak mitotik aktivite gösteren oogoniumlar yavaş yavaş, primer oositlere farklılaşarak mayoz

bölünme sürecine başlar. Ancak primer oositler, mayoz I'in profaz evresinin diploten safhasında duraklatılır. 17-20. hafta içerisinde primer oositler gonad içerisinde bulunan tek sıra halindeki yassı somatik hücreler tarafından çevrenir ve bu birliktelik primordiyal follikül olarak adlandırılır. Ancak primordiyal folliküller inaktiftir.



Şekil 2. 3 haftalık bir embriyoda PGH pozisyonu (Sadler, 2012).

Gebeliğin 5. ayına gelindiğinde, ovaryum içerisinde bulunan germ hücrelerinin sayısı yaklaşık olarak 7 milyon'a kadar ulaşmaktadır. Buna paralel olarak hücre ölümü de gerçekleşerek oogoniumların ve primer oositlerin atreziye uğramasına sebebiyet verir. Doğuma yakın bir zamanda fetus ovaryumunda ortalama olarak 1 milyon kadar primordiyal follikül kalır. Doğum sonrası ve pubertal dönem arasında ise follikül kaybının devam etmesiyle sayı daha da azalır. Puberte ile birlikte ovaryan rezerv içerisinde sadece 300-500 bin inaktif primordiyal follikül'ün kaldığı bilinmekte olup, menapoz dönemine kadar bu folliküllerin yalnızca ortalama 400 kadarı olgun follikül aşamasına geçebilmektedir (Kuruş, 2020; Ross ve Pawlina, 2011; Sadler, 2022).

2.1.2. Ovaryan Folliküllerin Histolojisi

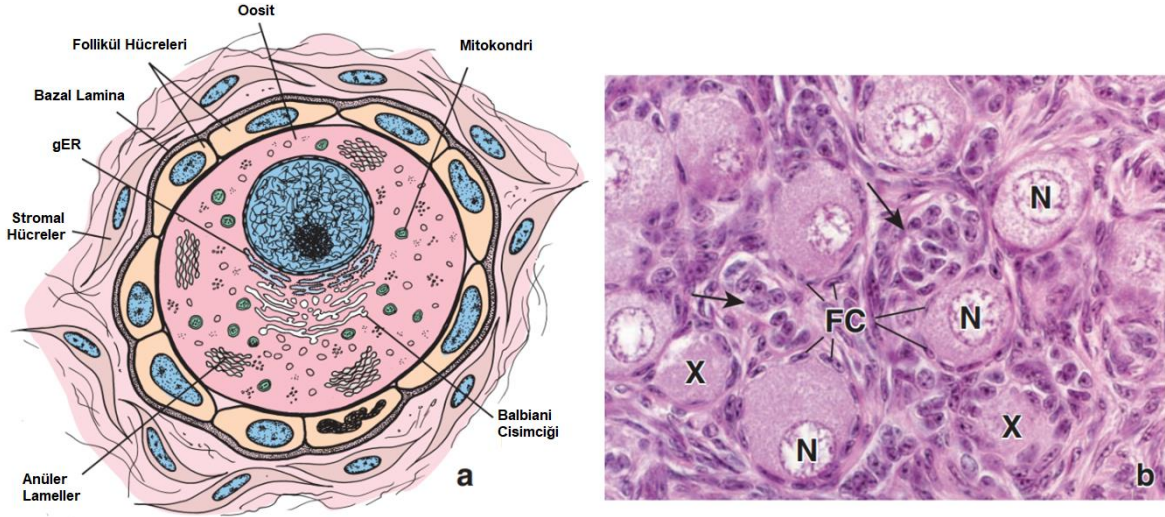
Ovaryum korteksi incelendiğinde her gelişim evresine ait follikül gözlemlenebilmektedir. Folliküller, intrauterin hayatta oluşan ve ovaryan rezervi oluşturan primordiyal folliküller, puberte sonrası dişi üreme becerisini destekleyen gelişmekte olan folliküller, olgun/graff folliküller olmak üzere sınıflandırılabilir. Folliküller farklı gelişim evrelerine göre içlerinde barındırdıkları oositleri koruyan ve besleyen bir mikroçevre meydana getirirler. Bu mikroçevre içerisinde farklı fonksiyonlar için özelleşmiş olan hücre grupları ve bu hücre grupları arasında birikerek oosite destek sağlayan follikül sıvısı yer almaktadır (Çelik, 2011; Ross ve Pawlina, 2011).

2.1.2.1. Primordiyal Folliküller

Fonksiyonel olarak inaktif bir şekilde bulunan primordiyal folliküller, folliküler gelişim basamakları içerisinde ilkin görülen aşamayı temsil eder. Aynı zamanda pubertel dönem öncesi ovaryum içerisinde görülebilen tek follikül tipidir ve ovaryum'un rezervini oluşturur. Primordiyal folliküllerin gelişimi için FSH/LH gibi gonadotropin hormonlarına ihtiyaç duyulmaz ve temelde lokal olarak salgılanan faktörler vasıtasıyla yönlendirilir. Ovaryum içerisinde korteks tabakasının stromasında, germinal epitel ve tunika albuginea'nın hemen altında konumlanmış olup, ortalama 30 µm çapındaki primer oositler ve onları çevreleyen tek tabaka halindeki yassı folliküler hücreler (pregranüloza hücreleri) tarafından meydana gelir. Folliküler hücreler birbirlerine desmozomlarla bağlıdır, dışarıdan bazal lamina ile çevrelenmiştir ve böylelikle primer oositler ve folliküler hücreler birbirine sıkı bir şekilde yaklaşmış halde bulunur.

Primordiyal follikül içerisinde bulunan primer oositler'in nukleusları oldukça büyüktür, kromatinleri ince dağılmıştır ve nukleolusları birden fazla sayıda olabilmektedir. Aynı zamanda nukleus etrafında kümelenmiş olarak bulunan, "Balbiani Cisimciği" olarak adlandırılan ve golgi kompleksi, endoplazmik retikulum, mitokondriyon ve lizozomları ihtiva eden bir yapıya sahiptir (Şekil 3). Bununla birlikte sitoplazma içerisinde dağılmış olan çok sayıda küçük vezikül ile küresel formda ve küçük boyutlarda mitokondriyonlar mevcuttur. Ek olarak, insanlara ait oositlerde bulunan, nükleer zarf kesitleri dizilerinden de bahsetmek mümkündür. Anüler

lameller olarak da isimlendirilen bu dizilerdeki her tabaka porlu bir yapıdadır ve nükleer porlar ile özdeş bir morfolojik yapı gösterir (Çelik, 2011; Kuruş, 2020; Ross ve Pawlina, 2011).



Şekil 3. Primordiyal follikül'ün şematik (a) ve mikrografik (b) gösterimi. FC: Yassı folliküler hücreler, X: Oosit, N: Oosit nükleusu, Ok: Folliküler hücrelerin teğetsel görünümü (Ross ve Pawlina, 2011).

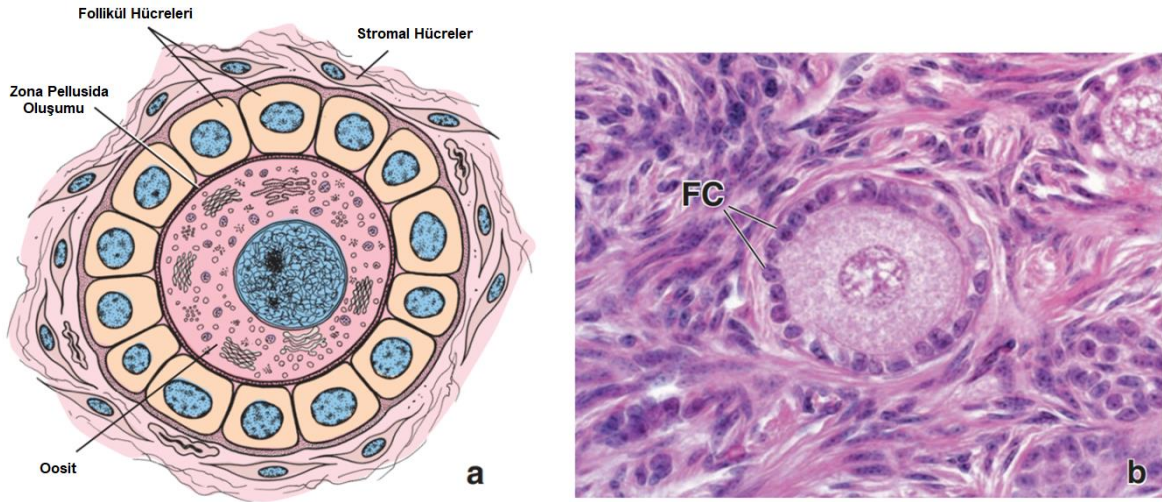
2.1.2.2. Gelişmekte Olan Folliküller

2.1.2.2.1. Primer Folliküller

Pubertel döneme girişle birlikte, canlıda gerçekleşen endokrin değişiklikler ovaryan rezervi oluşturan primordiyal folliküllerin gelişimini tetikler. Bu tetiklenme her bir menstrual döngü başına 10-15 kadar primordiyal follikül için geçerlidir. Bu sırada, follikülü oluşturan hücrelerde, oositte ve folliküle komşu stroma üzerinde değişiklikler meydana gelir. Öncelikle oosit büyümeye başlar ve onu çevreleyen pregranüloza hücreleri sayılarını arttırarak kübik bir forma dönüşür. Follikül hücrelerinin kübik yapıda görünmeye başladığı bu evre, artık primer follikül olarak isimlendirilir. Ancak primer folliküller, follikül hücrelerinin katman sayısına göre ikiye ayrılmaktadır; unilaminar primer folliküller ve multilaminar primer folliküller.

Unilaminar primer folliküller, oositin etrafında bulunan follikül hücrelerinin tek bir tabaka halinde olmasıyla karakterizedir. Bu evre ile birlikte oosit büyüdükçe birtakım özel

protenlerin ekspresyonu başlar. Böylelikle oosit ve follikül hücreleri arasında glikoprotein yapıda, ekstrasellüler bir kılıf olan zona pellusida (ZP) meydana gelir. Zona pellusida türe spesifik bir akrozom reaksiyonu indükleyicisi ve spermatozoa bağlanma reseptörü olarak işlev görmektedir (Şekil 4).

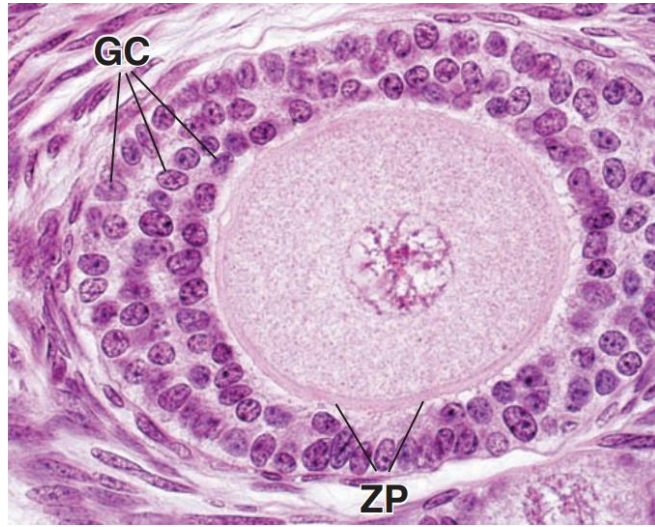


Şekil 4. Unilaminar primer follikül'ün şematik (a) ve mikroskopik (b) gösterimi. FC: Folliküler hücreler (Ross ve Pawlina, 2011).

Multilaminar primer folliküller (preantral folliküller) ise, follikül hücrelerinin yüzeyinde bulunan FSH reseptörlerinin FSH etkisi ile tetiklenmesi sonucu proliferasyonun artması ve tek sıra halindeki kübik hücre tabakasının çok sayıda bir katmana dönüşmesiyle oluşur (Şekil 5). Bu aşamadan sonra folliküler hücreler granüloza hücreleri, çok katmanlı tabaka da granüloza hücre tabakası olarak isimlendirilmektedir. Zona pellusida tabakasının da kalınlaşmasıyla birlikte artık tüm follikül ortalama olarak 100-150 µm çapa ulaşmaktadır. Bu sırada primordiyal follikül ile ovaryan korteks stroması arasında bulunan bazal lamina mevcudiyetini korumaya devam ederken, granüloza hücrelerinin birbirleri ve oositle aralarında oluklu bağlantıların gelişmesiyle hücreler arası haberleşme artar.

Eş zamanlı olarak follikül çevresinde bulunan stromal hücrelerin farklılaşmasıyla birlikte teka folliküli adı verilen, hücreler topluluğu olan bir kılıf meydana gelmektedir. Teka folliküli içte vasküler bir yapı gösteren, kübik yapıda hücreler bulunduran, salgılama fonksiyonu için gelişmiş bir teka interna tabakası ile dışta bağ dokusu hücreleri, düz kas hücreleri ve kollajen fibrillerce zengin bir teka eksterna tabakası olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu tabakalar

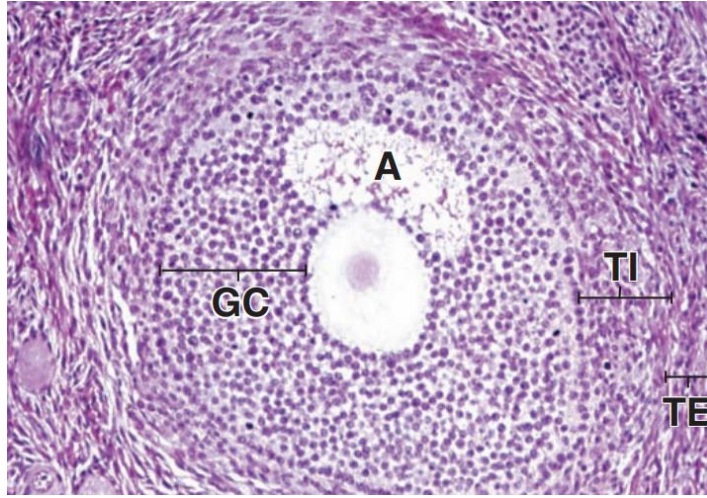
arasında ve teka eksterna ile hemen dışında bulunan ovaryan stroma arasındaki sınırlar belirgin değildir. Ancak teka interna ve granüloza hücreleri arasındaki sınır oldukça nettir ve ovaryum kaynaklı östrojen hormonu bu iki yapıda bulunan hücrelerin iş birliği sonucu üretilmektedir. Membranlarında çok sayıda LH reseptörü barındıran teka interna hücreleri, LH stimülasyonu ile birlikte gerekli androjenleri sentezleyerek granüloza hücrelerine yönlendirir. Granüloza hücreleri ise dışarıdan gelen bu androjenleri aromataz enziminin etkisiyle işleyerek östradiol hormonu sentezini gerçekleştirir (Çelik, 2011; Kuruş, 2020; Ross ve Pawlina, 2011).



Şekil 5. Multilaminar primer follikül'ün mikrografik gösterimi. GC: Granüloza hücreleri, ZP: Zona pellusida (Ross ve Pawlina, 2011).

2.1.2.2.2. Sekonder (Antral) Folliküller

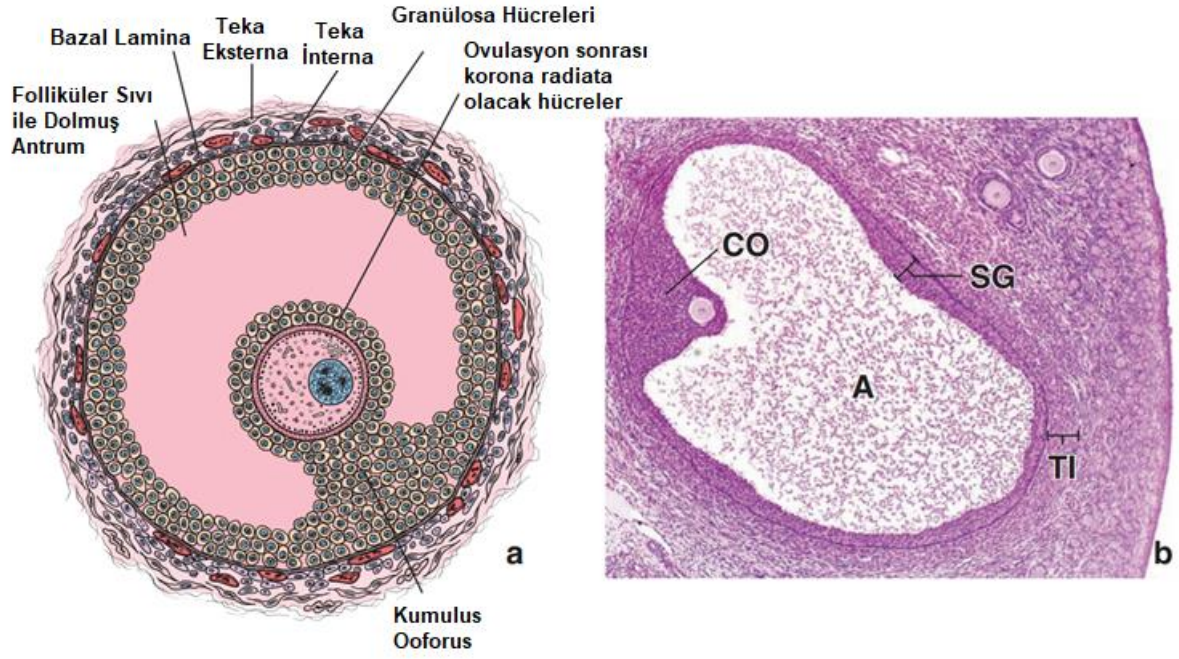
Sekonder follikül aşamasında folliküller yaklaşık 200 μm 'lik bir çapa ulaşmaktadır. Hacimleri artmakta olan bu folliküllerde granüloza hücre tabakaları 6-12 katına ulaştığında hücreler arasında Call-Exner cisimleri adı verilen boşluklar oluşur. Follikül sıvısı olarak tanımlanan, bol miktarda hyalüronan içeren bir sıvı bahsedilen bu boşluklar içerisinde birikmeye başlar. Zamanla bu boşluklar birleşerek hilal şeklinde antrum olarak isimlendirilen tek bir bütün boşluk meydana getirir (Şekil 6). Böylesi bir yapıya sahip follikül artık sekonder veya antral follikül olarak tanımlanmaktadır. Bu aşamada oosit yaklaşık olarak 125-130 μm 'lik bir çapa yani en son boyutlarına ulaşarak büyümesini durdurur (Çelik, 2011; Kuruş, 2020; Ross ve Pawlina, 2011; Sadler, 2022).



Şekil 6. Sekonder follikül'ün mikrografik gösterimi. A: Antrum, GC: Granüloza hücreleri, TI: Teka interna, TE: Teka eksterna (Ross ve Pawlina, 2011).

2.1.2.3. Olgun (Graff) Folliküller

Antrum'un giderek büyümesiyle birlikte yaklaşık 10 mm ve üzeri bir çapa ulaşan follikül sekonder follikül ile kıyaslandığında olgunluk açısından net bir şekilde ayrılabilir hale gelmektedir. Oosit antral boşluk içerisinde bir kenara doğru çekilmiş halde konumlandırılır (Şekil 7). Antrumun dışında kalan ve nispeten eşit kalınlıkta bulunan stratum granüloza hücreleri mural granüloza tabakasını, primer oosit'i çevreleyen ve ovulasyon sırasında oositle birlikte atılan granüloza hücreleri ise korona radiata'yı oluşturmaktadırlar. Korona radiata hücreleri ve mural granüloza hücrelerini birbirine bağlayan ve antruma doğru bir çıkıntı yapan kısım ise cumulus ooforus olarak isimlendirilir. Böyle bir görünüme sahip olan follikül olgun bir follikül olarak değerlendirilir ve büyük boyutları nedeniyle ovaryum yüzeyinde çıkıntılar oluşturacak şekilde korteks boyunca uzanır. Follikül ulaşabileceği en geniş boyutlara yaklaşırken granüloza hücrelerinde mitoz bölünme azalmaya başlar. Stratum granülozum kalınlığı antrumun genişlemesiyle ters orantılı bir şekilde incelir. Kumulus ooforus'ta bulunan granüloza hücreleri arasındaki genişlik artmaya başlayarak oosit ve etrafındaki kumulus hücreleri ile diğer granüloza hücreleri arasındaki bağ zayıflar ve follikül ovulasyona hazırlanmaya başlar (Çelik, 2011; Kuruş, 2020; Ross ve Pawlina, 2011; Sadler, 2022).



Şekil 7. Olgun follikül'ün şematik (a) ve mikrografik (b) gösterimi. A: Antrum, CO: Kumulus ooforus, SG: Stratum granülozum, TI: Teka interna (Ross ve Pawlina, 2011).

2.1.3. Ovulasyon

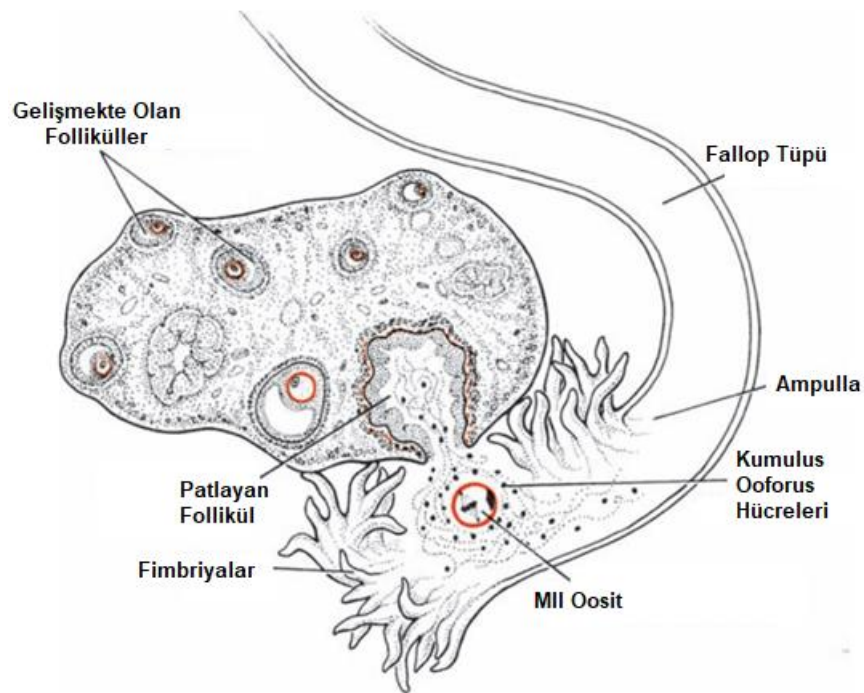
Ovulasyona uğrayacak olan follikül menstrual siklusun en başında seçilerek gelişimi desteklenir. Ovulasyondan yaklaşık olarak 34-36 saat öncesinde LH seviyelerinde bir artış gerçekleşir ve son 9-24 saat içerisinde de en yüksek düzeye ulaşır. LH artışı mayoz I'ın profaz evresinin diploten safhasında bekleyen primer oositler üzerinde mayotik tetiklenmeye neden olarak bölünmenin devam etmesini sağlar. Bunun sonucunda da preovulatuvar follikül içerisinde perivitellin aralıkta birinci polar cisimciği görünen, mayoz II evresinde tekrar duraklatılmış sekonder oosit bulunmaktadır.

LH seviyesindeki bu artış aynı zamanda follikül yapısında da değişikliklere neden olur. Teka hücreleri ve granüloza hücreleri birtakım hidrolitik enzimler ve sitokinler salgılamaya başlar. Follikül'ün ovaryum dışına bakan yüzeyinde açık renkli, stigma olarak isimlendirilen küçük bir çıkıntı oluşur. Follikül gelişimi ile pozitif korelasyon gösteren östrojen hormonundaki artışın stromal hücrelerin kollejenaz üretimini tetiklemesiyle stigma bölgesine komşu olan teka tabakası ile germinal epitel incelmeye başlar ve bu bölgede bulunan membrana granüloza yapısı dejenerasyona uğrar. Aynı zamanda follikül sıvısının yapmış olduğu basınç nedeniyle stigma

bölgesinde kan dolaşımı azalarak bu bölgede bulunan hücrelerin nekroza gitmesi ile yapı bütünlüğü gittikçe zayıflar.

Bu sırada sekonder oosit ve onu saran kumulus hücreleri membrana granüloza ile olan bağını keserek follikül sıvısı içerisinde serbestçe yüzer hale gelir. Follikül, plazminojen aktivatör, siklooksijenaz-2 ve çeşitli metalloproteinazlar gibi birtakım faktörün etkisiyle yapısal bütünlüğü bozulmuş olan stigma bölgesinden yırtılır ve böylelikle follikül sıvısı içerisinde serbest halde yüzen kumulus-oosit kompleksinin ovaryum dışarısına atılması sağlanır (Şekil 8).

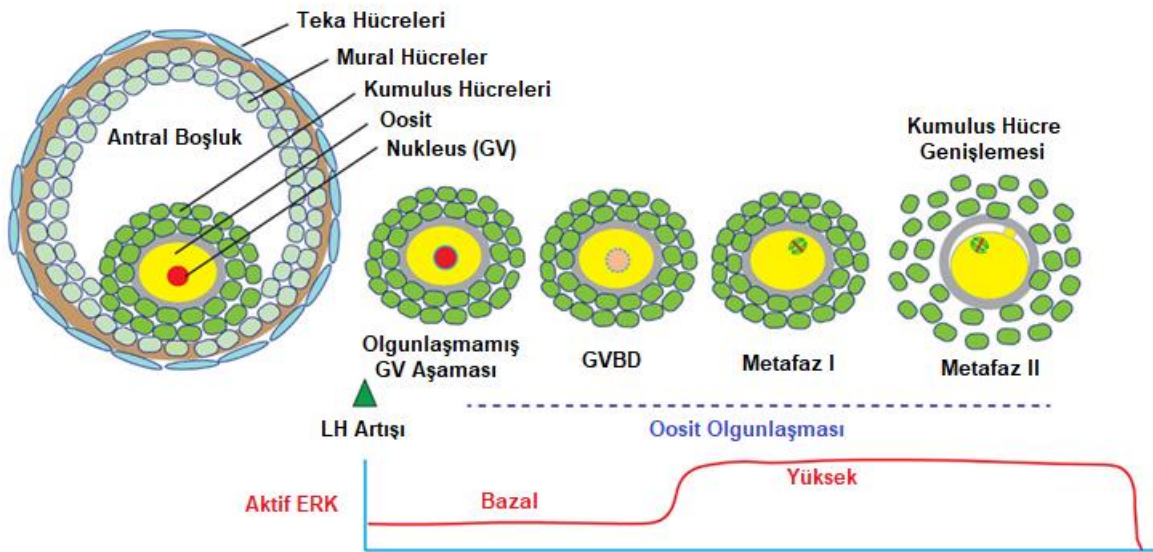
Ovulasyon öncesinde sekonder oosit çevresinde bulunan kumulus hücreleri LH piki ile birlikte çeşitli ekstrasellüler matriks ve bol miktarda hyaluronik asit sentezlemeye başlar. Bu sayede ovulasyon sonrasında kumulus oosit kompleksi'nin tuba uterina'nın fimbriaları tarafından kolay bir şekilde yakalanması ve hareketinin kolaylaşması amacıyla kumulus oosit kompleksinin genişlemesi gerçekleşir. Aynı zamanda kumulus hücrelerinin etrafında bulunan hyaluronik asit, ancak sperm tarafından salgılanacak olan hyaluronidaz enzimi ile eritilerek spermin sekonder oosite yaklaşabilmesi sağlanır. Bu aşamaya kadar mayoz II'nin metafaz evresinde bekleyen sekonder oosit fertilizasyon ile birlikte hızlıca mayotik sürecine devam ederek ikinci kutup cisimciğini dışarıya atmasıyla oogenez sürecini de tamamlamış olur (Çelik, 2011; Jones ve Lopez, 2013; Ross ve Pawlina, 2011).



Şekil 8. Ovulasyon'un şematik gösterimi (Sadler, 2012).

2.2. Oosit Matürasyonu

Oosit matürasyonu, ovaryan rezervi oluşturan ve mayoz I'in profaz evresinin diploten safhasında arrest'e uğrayan primer oositlerin, pubertal dönem ile birlikte artan gonadotropinler ve özellikle LH'nin etkisiyle, sırasıyla germinal vezikül yıkımı (GVBD), mayoz I'in tamamlanması, mayoz II'nin başlayarak metafaz II evresine kadar ilerletilmesi (Şekil 9) ve bu evrede tekrar arrest'e uğramasını kapsayan bir dizi süreci tanımlamaktadır (Delilbaşı, 2008; Kuyucu ve Tap, 2009). Oosit matürasyonu, folliküler gelişime paralel olarak ilerler ve mayoz bölünme için önemli bir aşama olan kromozom yoğunlaşması ve ayrılması süreçlerini kapsayan nükleer matürasyon ile nükleer matürasyon sürecinde de etkin olan, ayrıca ooplazmanın fertilizasyon ve sonrasındaki embriyo gelişim aşamaları için düzenlenmesi sürecini kapsayan sitoplazmik matürasyon olarak farklı iki başlık altında değerlendirilebilir. Bir embriyonun kalitesi ve sağlıklı gelişimi, maternal embriyonik dönemde başlayan ve puberteye kadar devam eden oldukça kapsamlı ve uzun bir gelişme sürecine bağlı olmakla birlikte, oositin nükleer, sitoplazmik ve membranöz matürasyonu ile de doğrudan ilişkilidir (Delilbaşı, 2008; Y. Jiang ve diğerleri, 2023). Oosit'in diploten safhasındaki arrest'ten çıkarak mayoz bölünmeye devam edebilmesi ve nükleer matürasyonunu başarıyla tamamlayabilmesi onun mayotik yeterliliğini nitelemektedir (Kuruş, 2020).



Şekil 9. Oosit matürasyon sürecinin şematik gösterimi (Das ve Arur, 2022).

2.2.1. Oosit Nükleer Matürasyonu

2.2.1.1. Oosit GV Arrestinin Sürdürülmesi

Memeli oositlerinde hücre içi siklik adenozin trifosfat (cAMP) konsantrasyonunun yüksek olması, mayotik arrestin devamlılığı için oldukça önemlidir. cAMP seviyelerinde bir azalma olması durumunda mayoz bölünmenin kaldığı yerden başlaması tetiklenmiş olur (Conti ve diğerleri, 2002; Mehlmann, 2005). Oositler, mayotik arrest'i sürdürebilmek adına cAMP seviyesini temelde iki yöntem ile yüksek tutmaktadır. İlk yöntem, granüloza hücrelerinde üretilen cAMP'lerin ekzojen olarak oosite aktarılması ile birlikte oosit içi endojen cAMP üretiminin gerçekleştirilmesidir (Hinckley ve diğerleri, 2005).

Ekzojen alım, granüloza hücrelerinin kendi aralarında ve oosit ile kurmuş oldukları gap junction (GJ/oluklu bağlantı)'lar aracılığıyla gerçekleşir. GJ'lar hücreler arası iletişimde hayati bir rol oynarlar ve konneksin (Cx) ailesi proteinlerinden oluşurlar (Kidder ve Vanderhyden, 2010). GJ'lar normal şartlarda açık konumdadırlar ve yaklaşık 1000 Da'dan küçük moleküllerin komşu hücrelere geçişine imkân sağlarlar. Glikoz ve aminoasitler dahil oosit metabolizması üzerinde destekleyici bir etkiye sahip besinler, oosit pH'ını düzenlemede etkili olan iyonlar ve mayotik arrestin devamlılığı için gerekli olan cGMP ve cAMP gibi moleküllerin granüloza hücrelerinden oosite geçişine izin verirler (Winterhager ve Kidder, 2015). Granüloza hücrelerinin arasında bulunan ana konneksin tipi Cx43'tür. Bununla birlikte kumulus hücreleri ve oosit arasında lokalize olan konneksin tipi ise Cx37 olup, gonatropinlerin artışı ile birlikte aktive olan sinyal yolları sayesinde açılıp kapanması düzenlenebilir (T. Y. Li ve diğerleri, 2007; Solc ve diğerleri, 2010).

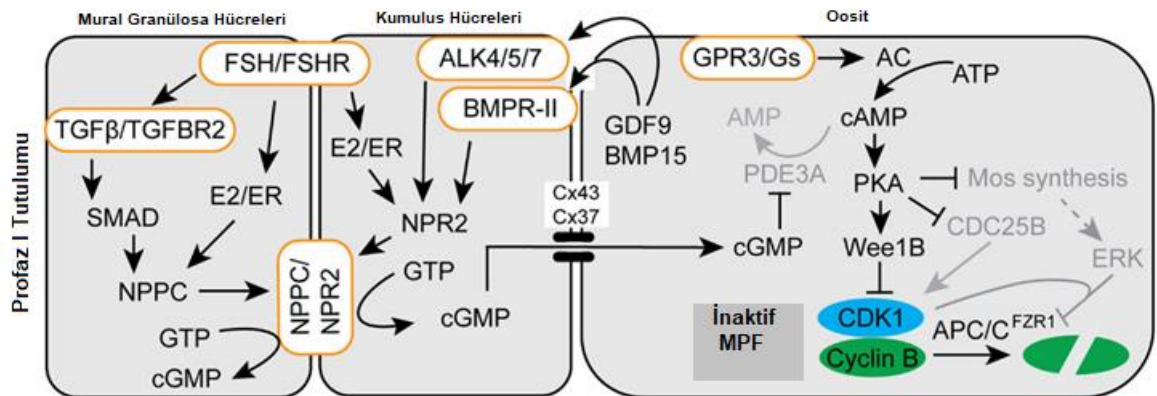
Endojen üretim ise, hücre içi ATP'lerin cAMP'ye dönüştürülmesi için gerekli olan ve kendi kendini aktive eden "G proteinine bağlı reseptörler-Uyarıcı G proteini-Adenilat Siklaz (GPCRs-Gs-AC)" kaskadının aktive olması ile gerçekleşir. Bu kaskadın kesintisiz aktivasyonu ile birlikte hücre içi cAMP üretimi devamlı olarak yukarı doğru düzenlenir (Kwon ve Schuetz, 1986).

Oosit içi cAMP konsantrasyonunun yüksek tutulması için gerekli olan ikinci mekanizma ise, cAMP hidrolizini katalizleyen fosfodiesteraz (PDE) enzimlerinin kontrollü inhibisyonudur (Strączyńska ve diğerleri, 2022). PDE'lar, cAMP'yi düzenleyen önemli enzimlerdir. Memelilerde 11 farklı PDE izozimi (PDE1-11) tanımlanmıştır. Teka hücrelerinde, kumulus hücrelerinde ve mural granüloza hücrelerinde lokalize olan PDE4D ve PDE4B'nin aksine,

PDE3A yalnızca oositlerde bulunur (Vigone ve diğerleri, 2018). PDE3A inhibisyonu cGMP molekülü ile sağlanmaktadır. Bunun için gerekli olan cGMP, granüloza hücrelerinde bulunan natriüretik peptid reseptörü 2 (Npr2)'nin c-tipi natriüretik peptid (CNP) ile etkileşime girerek aktive olmasıyla üretilir. Bir guanilat siklaz reseptörü olan Npr2, granüloza hücrelerinde bulunan guanozin trifosfat (GTP)'in cGMP'ye dönüşümünde etkilidir. Granüloza hücrelerinden oositlere GJ'ler aracılığıyla aktarılan cGMP, PDE3A aktivitesini inhibe eden suda çözünebilir ikinci bir haberci olarak görev alır. Böylelikle PDE3A inhibisyonu ile birlikte cAMP yıkımı engellenmiş olur (Q.Y. Sun ve diğerleri, 2009).

Bahsedilen bu iki yol, LH seviyesinde meydana gelen artış mayozun yeniden başlamasını uyarana kadar, mayoz I'in diploten safhasında oositleri durdurmak için sinerjik olarak çalışır (Wood ve diğerleri, 2003).

Oosit içinde bulunan yüksek cAMP düzeylerinin mayotik matürasyonu inhibe etmesi, hücre içi sinyal iletimi ve fosforilasyon mekanizmaları ile gerçekleşmektedir. Yüksek cAMP seviyeleri, nükleer kinaz Wee1B/Myt1'i fosforilleyerek stimüle eden protein kinaz A (PKA)'yı aktifleştirir. Daha sonra PKA, hücre bölünme döngüsü 25B (CDC25B) olarak isimlendirilen bir fosfatazı fosforilleyerek inaktive eder. İnaktive olan CDC25B, MPF (M-fazı teşvik edici faktör) olarak da bilinen bir kompleksin inaktivasyonuna neden olur. MPF, katalitik alt birim siklin bağımlı kinaz 1 (CDK1) ve düzenleyici alt birim siklin B'den oluşan bir heterodimerdir. MPF inaktivasyonu, daha önce inaktive olan CDC25B'nin CDK1 üzerindeki serin ve treonin kalıntılarını fosforile etme yeteneğini kaybetmesiyle gerçekleşir. Böylelikle MPF kompleksini bir araya getiren bileşenler ayrı tutularak oosit GV aşamasında (Şekil 10) durdurulur (Lincoln ve diğerleri, 2002; Sha ve diğerleri, 2018).



Şekil 10. Oosit GV aşaması arrest'inin moleküler mekanizması (Das ve Arur, 2022).

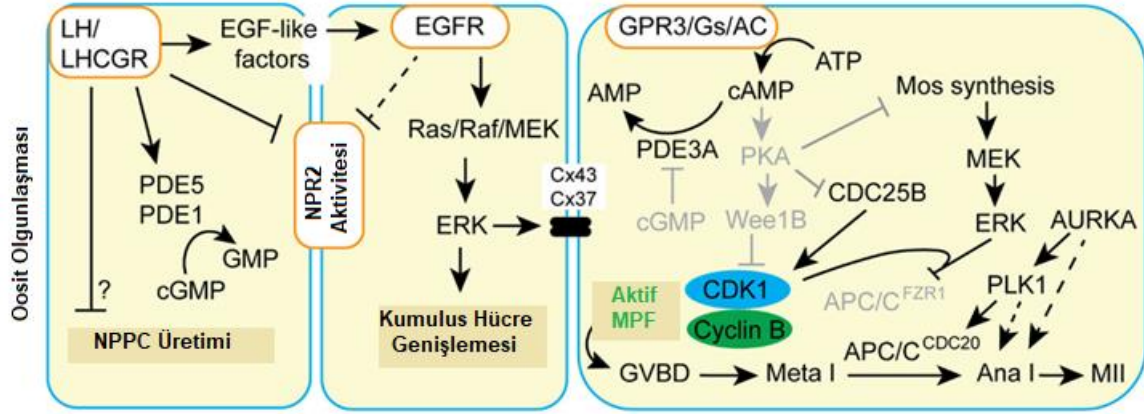
2.2.1.2. MPF Aktivasyonu ve Germinal Vezikül Yıkımı

Menstrual döngü ortasında seviyesi artan LH, graaf follikülüne ait granüloza hücrelerinin membranlarında bulunan reseptörlerine (LHR) bağlanarak bir dizi süreci etkiler ve böylelikle mayozun yeniden başlaması tetiklenmiş olur. LH dalgası, granüloza hücrelerinde cAMP sentezinin birçok kat artmasına neden olur ve bu da yerel epidermal büyüme faktörü β (EGF β) ailesi büyüme faktörlerinin (amfiregulin, epiregulin, betasellulin) aktivasyonuna (Gilchrist ve diğerleri, 2016a; Hsieh ve diğerleri, 2007; Richani ve Gilchrist, 2018) ve cGMP sentezinin azalmasına ve/veya hidrolizinin artmasına neden olarak, granüloza hücrelerinden oosite cGMP akışını azaltır. cGMP'deki azalma, hidrolitik PDE3A aktivitesinin inhibisyonunu zayıflatır ve bu da oositlerde cAMP seviyesinin düşmesine, dolayısıyla mayozun yeniden başlamasına yol açar.

Öte yandan LH artışı, oosit ile somatik kumulus ve granüloza hücreleri arasındaki iletişimin bozulmasına dayalı olarak cAMP moleküllerinin oosite akışını durduran alternatif, iyi tanımlanmış bir mekanizmayı tetikler (Dekel ve diğerleri, 1981; Eppig, 1985; Phillips ve Dekel, 1991; Sela-Abramovich ve diğerleri, 2006a). LH'nin bu geçit etkisinin iki ardışık adımdan oluştuğu gösterilmiştir: Cx43'ün fosforilasyon durumunun anında geçici olarak düzenlenmesi ve daha sonra transkripsiyonel veya translasyonel modifikasyonlar yoluyla CX43 protein seviyesinde bir azalma (Granot ve Dekel, 1994; Irit Granot ve diğerleri, 2002; Kalma ve diğerleri, 2004).

Mural granüloza ve kümülüs hücrelerinde bulunan spesifik bir “membran LH reseptörü” aracılığıyla etki eden LH dalgalanması şeklindeki sinyal, mayozun yeniden başlamasına yol açan bir dizi reaksiyon başlatır (E. Anderson ve Albertini, 1976; Vaccari ve diğerleri, 2008). PKA yoluyla etki eden LH, NPR2'nin aktivitesini sınırlandırırken cGMP'yi bozan fosfodiesteraz 5'i aktive eder. Böylece cGMP sentezinin engellenmesi, granüloza hücrelerinin dış katmanlarındaki cGMP seviyesinin hızlı bir şekilde azalmasına neden olur. Her üreme döngüsü sırasında LH artışı, CNP aktivitesinde bir azalmaya neden olur, bu da granüloza hücrelerinde ve dolaylı olarak oositte cGMP seviyesinde bir azalmaya neden olur. Buna bağlı olarak PDE3A aktive olur ve oosit içindeki cAMP seviyesinde bir azalmaya neden olur, bu da MPF'nin aktivasyonuna ve sonuç olarak mayoz bölünmenin yeniden başlamasına (Şekil 11) yol açar (Gilchrist ve diğerleri, 2016b).

Oosit içi düşük cAMP seviyesinin neden olduğu MPF aktivasyonu, sırasıyla PKA'nın inaktivasyonu, CDC25B'nin aktivasyonu ve dolayısıyla MPF katalitik alt birimi CDK1'in tirozin kalıntıların (Tyr 14 ve Tyr 15) fosforilasyonu ve siklin B'ye tekrar bağlanmasıyla gerçekleşir (Meraldi ve diğerleri, 2004).



Şekil 11. Oosit GVBD'nin moleküler mekanizması (Das ve Arur, 2022).

Mayozun yeniden başlaması sırasında aktif MPF, lamin fosforilasyonuna ve depolimerizasyona yol açar. Mayozun yeniden başlamasının ilk gözle görülür belirtilerinden biri nükleer zarfın bozulması ve nükleolusun kaybolmasıdır (Masui, 2001). Literatürde bu olguya germinal vezikül yıkımı (GVBD) adı verilmektedir. Aynı zamanda, kromatin (yoğunlaşma) değişiklikleri meydana gelir ve bu da metafaz plakası şeklinde uzaysal olarak düzenlenmiş kromozomların ortaya çıkmasına neden olur. Birinci mayotik bölünmenin (MI) metafazı olarak bilinen bu aşamada, siklin B'nin proteolitik bozunmasına bağlı olarak MPF aktivitesinde geçici bir düşüş vardır (Dorée ve Hunt, 2002; Masui, 2001). Birinci mayoz bölünmenin tamamlanmasından sonra, ikinci mayoz bölünmenin iğ ipliği ve metafaz plağı oluşur. Bu, siklin B'nin sürekli sentezi ve MPF'nin aktivitesinin tekrar artması sayesinde CDK1 ile bağlantısı nedeniyle mümkündür (Abe ve diğerleri, 2011).

2.2.2. Oosit Sitoplazmik Matürasyonu

Sitoplazmik matürasyon organellerin, oositlerin matürasyonu ile sonrasındaki fertilizasyon ve erken embriyogenez dönemi için elzem olan transkripsiyon faktörlerini,

mRNA'ları ve proteinleri yeniden düzenlemesi ve depo etmesi süreci olarak tanımlanabilir (Watson, 2007). Sitoplazmik matürasyon oldukça kompleks bir süreçtir ve hala tartışmalara sebep olan noktalara sahiptir. Hücre iskeleti ve organellerin doğru zamanda ve doğru konumda olmaları oositlerin fertilizasyon ve embriyonik gelişim için sahip olması gereken yüksek gelişim potansiyelini kazanmasını sağlar (Sirard ve diğerleri, 2006). Bunun için organellerin konumları, biyokimyaları ve morfolojilerinin sürece uygun adaptasyonlar kazanması gerekir. Bahsedilen bu adaptasyonlar günümüzde gelişen görüntüleme teknikleri sayesinde kapsamlı bir şekilde değerlendirilebilmektedir.

2.2.2.1. Sitoplazmik Organellerin Yeniden Düzenlenmesi

Sitoplazmik matürasyon, bol miktarda RNA transkripsiyonu ve protein sentezi ile birlikte enerjiye ihtiyaç duyulan bir dizi kompleks süreçler bütünüdür. Bu sebeple, esas görevi ATP sentezlemek olan mitokondriler, matürasyon sırasında kullanılan enerjinin sağlanabilmesi adına oldukça etkin bir rol oynamaktadır (Krisher ve Bavister, 1998; Stojkovic ve diğerleri, 2001).

Mitokondrilerin matürasyon süreci boyunca enerji ihtiyacının çok olduğu bölgelere göçü önemli bir adaptasyondur. İmmatür olan oositlerde mitokondri ağırlıklı olarak oval veya küresel bir morfoloji göstermekte olup, germinal vezikül etrafında kümelenir (Familiari ve diğerleri, 2006). Germinal vezikül yıkımı sırasında, perinükleer bölgeden uzaklaşması söz konusudur. MII fazına geçmiş olan matür bir oositte ise, sitoplazmik hacmin neredeyse çoğunu kaplamaktadır (Dumollard ve diğerleri, 2006). Diğer türlerin aksine, insan oositlerinin mitokondrileri, matürasyon sonunda düz endoplazmik retikulum (SER) kesecikleri ve tübülleri ile hacimli agregatlar meydana getirir (Familiari ve diğerleri, 2006; Motta ve diğerleri, 2000; A.H. Sathananthan ve Trounson, 2000). Bu mitokondriyal-SER kümeleri ve mitokondriyal vezikül kompleksleri, fertilizasyon öncesi ve erken embriyogenez aşamasında gerekli olacak maddelerin veya zarların bir rezervuarının hazırlanmasında rol oynayabilir (Motta ve diğerleri, 2000).

Mitokondrinin sitoplazmik dağılımı ve organizasyonu oosit matürasyonu boyunca dinamikdir ve bu değişikliklerin mitokondrinin işleviyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Mitokondrinin ana işlevinin ATP olması nedeniyle mitokondriyal organizasyon ile ATP konsantrasyonu arasında bir ilişki bulunmaktadır (Stojkovic ve diğerleri, 2001). GV-arrestli oositlerle kıyaslandığında, oosit matürasyonu sırasında sitozolik ve mitokondriyal ATP

seviyelerinde üç belirgin artış görülür. İlk artış, GVBD sırasında meydana gelir. İkinci artış, iğ ipliği göçü ile birlikte ortaya çıkar ve üçüncü artış, mayoz I'den (MI) mayoz II'ye (MII) geçişte gerçekleşir (Yu ve diğerleri, 2010).

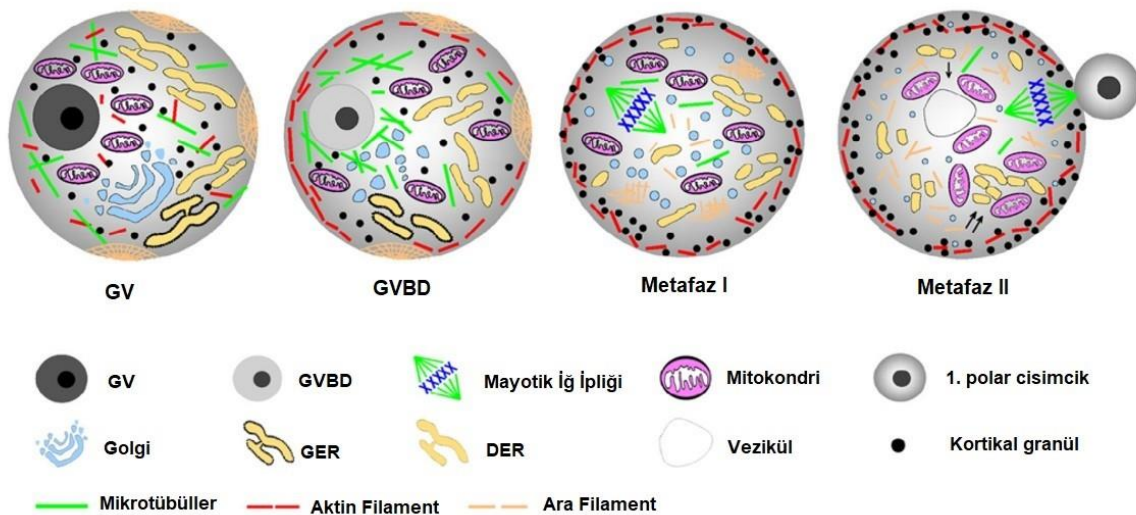
Oosit matürasyonunda enerji metabolizmasının kritik rolü nedeniyle, oosit içi ATP konsantrasyonu insan (Slotte ve diğerleri, 1990; Van Blerkom ve diğerleri, 1995) ve fare (Leese ve diğerleri, 1984) oositlerinin gelişim potansiyeli hakkında bir bilgi sunmaktadır. ATP, nükleer ve sitoplazmik matürasyon süreci için son derece önemlidir. İğ ipliği oluşumu ve kromozom hareketleri, enerji kaynağı olarak ATP'yi kullanan motor proteinlerinin ekspresyonuna ve aktivitesine bağlıdır (Duran ve diğerleri, 2011).

Bir diğer organel olan golgi aygıtı, proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonu ve kargolanmasıyla ilgili birçok hücre içi trafik olayında etkin bir görev üstlenmektedir. GV oositlerde, Golgi aygıtı ooplazma boyunca devamlı bir membranöz sistem şeklinde dağılmıştır, fakat sitoplazmanın iç kısımlarında kortekse göre biraz daha yoğundur. GVBD'de nükleer zarf parçalanır, kromozomlar kondanse olur ve Golgi aygıtı, oositin orta kısmında küçük granüller bir yapı gösterecek şekilde parçalanmaya uğrar. MI'da Golgi aygıtı oosit boyunca daha da parçalanma göstererek dağılır ve bu dağılım, MII oositlerinde ilk polar cisimciğin ekstrüzyonunu takiben korunur (Moreno ve diğerleri, 2002).

Kortikal granüller ise, oosit matürasyonu aşamasında Golgi komplekslerinden türetilmektedir (Austin, 1956; Gulyas, 1980). Erken foliküler büyüme sırasında Golgi kompleksleri hipertrofi geçirir ve proliferasyon ile sayılarını arttıırırlar. Golgi komplekslerinden kortikal granüllerin oluşumu bu sırada meydana gelmektedir (Abbott, 2001; Gulyas, 1980; Szollosi, 1967).

Bu adaptasyonun başında, oositlerin subkortikal bölgesine doğru transfer olan hipertrofik Golgi kompleksleri küçük kesecikler meydana getirir. Bu kesecikler daha sonra birleşerek matür kortikal granülleri oluşturur ve sonunda Golgi komplekslerinden ayrılır. Memelilerde bulunan kortikal granüller 0,2-0,6 µm arasında değişen bir çapa sahiptir ve ultrastrüktürel düzeyde birbirine benzer bir morfoloji sergilerler (Gulyas, 1980). Kortikal granüller, matüre olmamış oositlerin sitoplazması boyunca rastgele dağılmış olarak gözlenmektedir. Matürasyonun sonunda bu oositler MII aşamasına ulaştığında kortikal granüller kortekste son konumlarını alırlar. Kortikal granüller, fertilizasyonu takiben içeriklerini perivitellin boşluğuna bırakmak için ekzositoza uğrar (Hosoe ve Shioya, 1997; Yoshida ve diğerleri, 1993). Bu

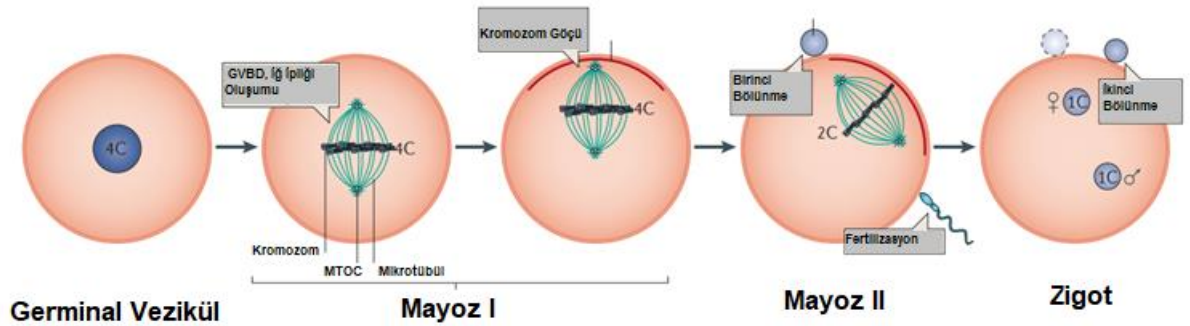
salgılama süreci için kalsiyuma ihtiyaç duyulmaktadır ve kortikal reaksiyon olarak da adlandırılır (Schuel, 1978).



2.2.2.2. Hücre İskeleti'nin Yeniden Yapılandırılması

Ökaryotik hücreler üç esas tipte hücre iskeleti filamentleri içerir: mikrofilamentler, ara filamentler ve mikrotübüller. Hücre iskeleti, hücrenin gereksinimlerine göre değişmeden sabit kalabilen veya düzenlemelere tabi tutulabilen dinamik ve uyarlanabilir bir yapıdır. Hücre iskeletinin üç filaman türü, spesifik alt birimler tarafından oluşturulur. Mikrotübüller küresel ve kompakt tübülün alt birimlerinden oluşurken, mikrofilamentler benzer şekilde küresel ve kompakt aktin alt birimlerinden oluşmaktadır. Ara filamentler, mikrotübüldeki α ve β tubulin alt birimlerine ve aktin monomerine benzer bir tetramer halinde düzenlenmiş uzun ve lifli polipeptit alt birimlerinden oluşur. Bu üç tip "hücre iskeleti polimeri" zayıf, kovalent olmayan etkileşimlerle korunmaktadır ve yeni oluşumlara ya da kovalent bağların kırılmasına gerek kalmadan hızlıca birleşebilir ve ayrışabilir (Theurkauf ve diğerleri, 1992).

Mikrotübül ve mikrofilamentler GV aşamasında ooplazma boyunca homojen bir dağılım gösterirken, GVBD sonrasında mikrotübüller kromozomların etrafında yoğunlaşarak kortekse doğru göç etmeye başlamakta (Şekil 13), mikrofilamentler ise oositlerin subkortikal bölgesinde, özellikle oositin mayotik iğ çevresinde yoğun bir şekilde birikmektedir. MII aşamasındaki olgun fare oositlerinde, mikrotübüller ve mikrofilamentler asıl olarak kortikal sitoplazmik bölgede birikmektedir (Gümüş ve diğerleri, 2010; Q.-Y. Sun ve Schatten, 2006; Verlhac ve diğerleri, 2000). Ayrıca mikrotübüller, simetrik, bipolar, fiçı görünümünde ve oosit yüzeyine paralel konumlanmış, tam organize mayotik iğcikler halinde gözlenmektedir (Gümüş ve diğerleri, 2010; Sathananthan, 1994; Verlhac ve diğerleri, 2000).



Şekil 13. Oosit matürasyonu sırasında iğ ipliğinin kortikal bölgeye göçü (R. Li ve Albertini, 2013).

İğ ipliklerinin yeniden düzenlenmesi mikrofilament ağı tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir (Longo ve Chen, 1985; Verlhac ve diğerleri, 2000). Göçten önce, mikrofilamentler birçok ince filamandan oluşan bir ağ yapısı oluşturur. Bu yapı oldukça dinamiktir ve sürekli yeniden şekillenir. İğ ipliklerinin göçü başladığında, mikrofilamentler yavaş yavaş iğ iplikleri boyunca hizalanır ve fare oositlerinin korteksine doğru hareket eder (Schuh ve Ellenberg, 2008).

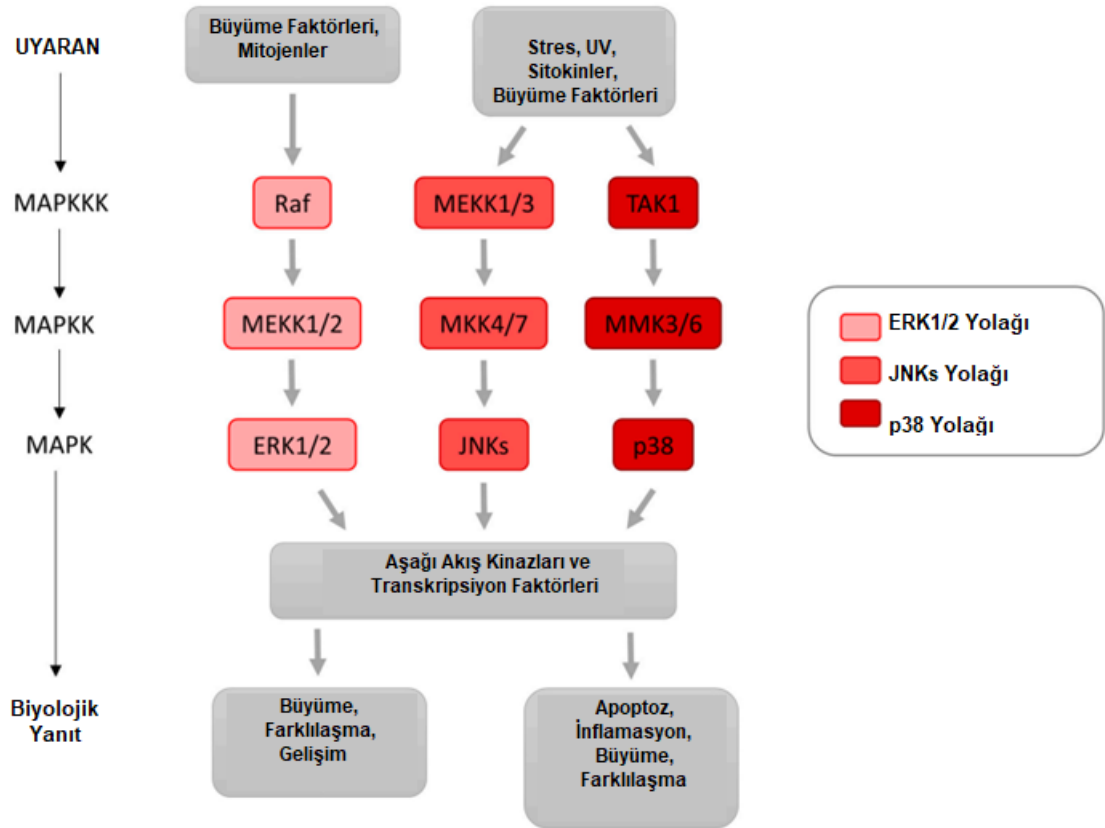
Filogenetik olarak yüksek organizmalarda oosit mayozu iki temel asimetrik bölünmeden oluşur. Her bölünmede maternal genom doğru şekilde ayrılmalı ve sitoplazmanın yüksek düzeyde asimetrik bölünmesi sağlanmalıdır. Asimetrik bölünmelerin temel amacı, embriyonik gelişim için oositteki maternal depoların çoğunun ovum içinde korunmasıdır (Brunet ve Verlhac, 2011).

2.2.3. Oosit Matürasyonu ve EGFR Aracılı ERK1/2 Sinyal Yolu

ERK'ler, hücre dışı sinyalleri hücre içi hedeflere ileten sinyal kaskadının terminal yürütücüleri olan mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesinin üyeleridir (Pearson ve diğerleri, 2001; Roskoski, 2012). Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadları, hücre büyümesi, farklılaşması, gelişimi, hücre döngüsü, hayatta kalma ve hücre ölümü gibi çeşitli hücresel süreçlerde önemli rol oynayan başlıca hücre içi sinyal iletim yollarıdır. Bu kaskadlar, ekstraselüler sinyal ile ilgili kinazlar (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinazlar (JNK), p38 kinaz (p38) ve büyük MAP kinaz 1 (BMK1/ERK5) yolunu içerir (Junttila ve diğerleri, 2008).

Benzer şekilde, ERK1/2, JNK, p38 ve BMK1, bir prolin kalıntısı tarafından yönlendirilen serin/treonin kinazlardır. MAPK üyeleri, aktivasyon döngüsünde bir amino asit ile ayrılmış iki korunan treonin ve tirozin kalıntısına sahip olup, TXY motifini oluşturur. TXY motifinin ortasındaki amino asit (X), farklı MAPK gruplarını tanımlar. Örneğin, 'X' ERK'lerde glutamik asit olup 'TEY' motifini oluştururken, JNK'lerde prolin ve p38 MAPK'larda glisin bulunmaktadır (Pearson ve diğerleri, 2001; Widmann ve diğerleri, 1999).

Her MAPK en az üç katmanlı korunan bir kinaz kaskadı tarafından aktive edilir. Ökaryotlarda, sinyal iletim adımları sırasıyla MAPK kinaz kinaz (MAP3K), MAPK kinaz (MAP2K) ve MAPK'nın aktivasyonunu takip eder (Şekil 14). Aktive olan MAPK'lar çeşitli substrat proteinlerini fosforile eder, bu da çeşitli hücresel aktivitelerin düzenlenmesiyle sonuçlanır (Z. Chen ve diğerleri, 2001; Kyriakis ve Avruch, 2001; Pimienta ve Pascual, 2007).



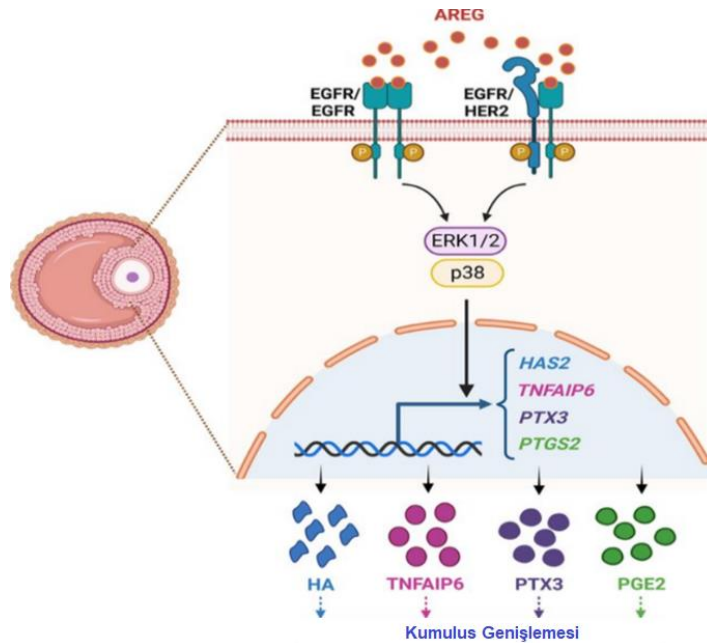
Şekil 14. MAPK sinyal yolağının şematik gösterimi (Kalous ve diğerleri, 2018).

Dual-spesifik fosfatazlar (DUSP'ler, aynı zamanda MAPK fosfatazları veya MKP'ler olarak da adlandırılır) ERK'yi defosforile eder ve inaktive eder (Yao ve Seger, 2004). Ayrıca, tirozin-spesifik protein fosfatazlar (PTP) veya protein serin/treonin fosfatazları da en azından *in vitro* koşullarda ERK'yi defosforile eder ve inaktive eder (Alessi ve diğerleri, 1995; Anderson ve diğerleri, 1990). Böylece, MKP'ler ERK aktivitesinin büyüklüğünü ve yer-zaman profilini şekillendirir.

ERK yolu, esas olarak büyüme faktörleri (epidermal büyüme faktörü, EGF ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü, PDGF) ve sitokinler (IL-1 β ve TNF- α) tarafından aktive edilir ve bu yolun aktivasyonu tirozin kinaz reseptörlerinin uyarılmasıyla ilişkilidir (Sproul ve Graves, 2013; Stadler, 2005). Bu büyüme faktörleri ve sitokinlerin reseptörleri ligandları ile bağlandığında, GDP (Güanozin difosfat) bağlı Ras (Rat sarkoma), GTP (Güanozin trifosfat)'ye dönüştürülür ve bu da Ras'ı aktive eder. Ardından, aktifleşmiş Ras, sitoplazmik Raf'ı

MAPK gap junction'ların kapanmasına ve oosit ile foliküler hücreler arasındaki iletişimin bozulmasına neden olur (Kidder ve Vanderhyden, 2010; Sela-Abramovich ve diğerleri, 2005). Bu nedenle, mural granülosa hücreleri tarafından üretilen cGMP ve cAMP oosite ulaşamaz. PDE3A aktif hale gelir ve cAMP'yi yıkar (Norris ve diğerleri, 2010). Oosit içindeki cAMP seviyelerindeki azalma, PKA'yi inhibe eder ve cdc25B'nin inhibisyonunu kaldırır (Sela-Abramovich ve diğerleri, 2006b; Vaccari ve diğerleri, 2009). Bu fosfataz aktif olduğunda, çekirdeğe taşınarak MPF'yi defosforilasyon yoluyla aktive edebilir (J. Li, ve diğerleri, 2012). MPF'nin aktivasyonu mayotik yeniden başlamayı tetikler ve oosit ilk mayotik bölünmeyi tamamlayarak metafaz II'de (Şekil 15) duraklar (Sela-Abramovich ve diğerleri, 2006b).

ERK1/2 aktivasyonu ayrıca, kumulus hücrelerinde ekspansiyon ve musifikasyon için gerekli olan genlerin ifadesini de tetiklemektedir (Şekil 16). Bu genler arasında, hyaluronan üretiminden sorumlu ve kumulus hücrelerinin genişlemesine yardımcı olan hyaluronan sentaz 2 (Has2), prostaglandinlerin üretimini teşvik eden ve yine kumulus hücre genişlemesine yardımcı olan prostaglandin-endoperoksid sentaz 2 (Ptgs2), hyaluronan ile etkileşime girerek kumulus hücre matriksini düzenleyen tümör nekroz faktör alfa kaynaklı protein 6 (Tnfaip6) ve hyaluronanın kumulus hücreleri arasında birikimini teşvik eden pentraxin 3 (Ptx3) yer almaktadır (Su ve diğerleri, 2003).

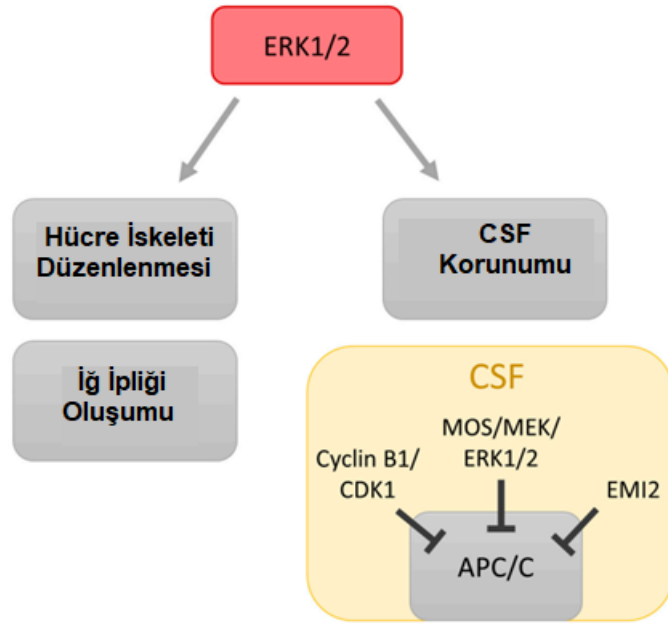


Şekil 16. Kumulus hücre genişlemesinde ERK1/2'nin etkisi (Fang ve diğerleri, 2023).

ERK1/2 inhibisyonu ve fare oositlerinde yapılan deneyler, mikrotübül organizasyonu ve mayotik iğ ipliği oluşumunda ciddi bozulmalara neden olmuştur (Fan ve Sun, 2004b; Y.-L. Zhang ve diğerleri, 2015). ERK1/2 veya bunların yukarı akış kinazı MOS silindiğinde ise, fare oositlerinde kardeş kromatidlerin erken ayrılması ve partenogenetik aktivasyon gözlenmiştir (Paronetto ve diğerleri, 2004; Verlhac ve diğerleri, 1996).

ERK1/2 substratları MISS (Mitojen ile indüklenen sinyal yolu) ve DOC1R (Ağız Kanseri Silinen 1 ile İlgili)'in, MII fare oositlerinde mikrotübül organizasyonunu düzenlediği belirlenmiştir (Lefebvre ve diğerleri, 2002; Terret ve diğerleri, 2003). ERK1/2'nin, oositlerin metafaz II aşamasından çıkışını engelleyen bir protein kompleksi olan sitostatik faktörün (CSF) bir parçası olduğu açıkça kanıtlanmıştır. Bu kompleks, siklin B'nin stabilizasyonu yoluyla oositlerin metafaz II aşamasından çıkışını engeller (Şekil 17) (Paronetto ve diğerleri, 2004; Verlhac ve diğerleri, 1996).

MOS'un oositlerde CSF aktivitesi için gerekli olduğu bulunmuştur (Posada ve diğerleri, 1993). MOS eksik farelerden elde edilen oositler MII'de duraklamamış, bunun yerine spontan partenogenetik aktivasyon ve başarısız gelişim göstermiştir (Hashimoto ve diğerleri, 1994). Ayrıca, bu tür oositlerin matürasyonu sırasında ERK1/2 aktif hale gelmemiş ve matürasyon teşvik edici faktör (MPF) aktivitesi MII'de erken azalmıştır (Choi ve diğerleri, 1996).



Şekil 17. Mayoz bölünme sırasında ERK1/2'nin rolü (Kalous ve diğerleri, 2018).

Omurgalı oositlerinde ERK1/2 tarafından aktive edilen ve translasyonun düzenlenmesinde etkin olan p90 ribozomal S6 kinaz (RSK) tarafından indüklenen CSF duraklaması, ERK1/2 yolu ve mayotik hücre döngüsündeki ip ipliği oluşumu kontrol noktası arasında bir bağlantı sağlar (Maller ve diğerleri, 2002; Schwab ve diğerleri, 2001). ERK1/2'nin, oositlerin sitoplazmik matürasyonunda önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. Koyun oositlerinde *in vitro* matürasyon sırasında ERK1/2 aktivitesi engellendiğinde sitoplazmik matürasyonda bozulma ortaya çıkmış ve bu durum sonrasında bölünme oranı ve blastosist gelişiminde azalmaya yol açmıştır (Ni ve diğerleri, 2015).

ERK1/2 aktivitesinin seviyesi, MII oositlerinin yaşlanması sırasında da önemli bir rol oynar. Domuz oositlerinin *in vitro* kültürü 72 saate kadar uzatıldığında, oosit yaşlanmasını indüklemek için ERK1/2 aktivitesinde yaşlanmanın ilk 12 saati içinde belirgin bir azalma meydana gelmiş ve bu azalma uzatılmış kültür sırasında devam etmiştir. Yaşlanmış MII domuz oositlerinde ERK1/2 aktivitesinin erken azalmasının, anormal anafaz II'ye sahip oositlerin oranlarının partenogenetik aktivasyon sonrası önemli ölçüde artması nedeniyle erken embriyo gelişimini olumsuz etkilediği öne sürülmüştür (Ebeling ve diğerleri, 2010; Ma ve diğerleri, 2005).

Bugüne kadar tanımlanan memeli oositlerinin mayotik matürasyonu sırasında ERK1/2'nin işlevleri şunları içerir: mikrotübüllerin ve iğ ipliği oluşumunun düzenlenmesi (Sun ve diğerleri, 2008; Verlhac ve diğerleri, 1996), MPF'nin stabilizasyonu (Miyagaki ve diğerleri, 2011; Tiwari ve diğerleri, 2018), oositlerin sperm tarafından döllenmeden önce MII aşamasında bloke edilmesinden sorumlu olan sitostatik kompleksin bir parçası olarak rol oynar (Suzuki ve diğerleri, 2010; Verlhac ve diğerleri, 1996).

2.2.4. Oosit Matürasyon Anormallikleri

İnfertilite tanısı alan tüm kadınların yaklaşık %8,6-15,2'sinin mayotik olarak yetersiz olan en az bir tane oosit ürettiği bilinmektedir. Tüm oositler içinde en az %25'i ve daha fazlasında matürasyon görülmediği takdirde ise başarılı fertilizasyon ve klinik gebelik oranları paralel olarak azalmaktadır. Ancak dikkat edilmesi gereken nokta, matüre olmamış oositlerin ara sıra denk gelişim ile sürekli olarak anormal ve matüre olmayan oosit üretiminin birbirinden net olarak ayırt edilmesidir.

Anormal oosit üretimine sahip birçok vaka olgusunda göze çarpan birkaç ortak özellik vardır. Bunlar; primer infertilite, matüre olmayan oosit üretiminin sürekliliği, IVM yapılsa dahi matürasyonun elde edilememesi ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)'na rağmen fertilizasyonun gerçekleşmemesi.

Matür oosit elde etmek, mayotik yeniden başlamaya ve sürdürülmesine, yani mayotik yetkinliğe bağlı bir durumdur. Mayoz bölünmenin başlamasından önce oosit, mayoz'un tamamlanması için gerekli olan protein ve mRNA'ları depoladığı bir büyüme evresinden geçer. Mayotik ilerleme sırasında, bu temel düzenleyici proteinler oldukça sıkı bir şekilde kontrole uğrar. Bahsedilen bu kontrol, proteinlerin üretimi, fosforilasyonları, lokalizasyonları ve yıkımlarının düzenlenmesi yoluyla gerçekleştirilir. Bu önemli ve hassas aşamalarda gerçekleşen herhangi bir değişiklik matürasyon yetmezliğine neden olabilir.

İnsanlarda tekrarlayan oosit matürasyon yetmezliği ve anormal oosit üretiminin nedeni hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak hayvan modellerinde, mayotik süreçlerde etkin olan kilit değişiklikler, uyarıcılar ve inhibitörlerin kullanımı veya nakavtların geliştirilmesi ile deneysel olarak türetilmiş olup, birçok mayotik yetmezlik fenotipi sunmuştur. Bu çalışmalar yardımıyla, mayoz'un devamlılığını düzenleyen ve kontrol eden sinyal mekanizmaları hakkında büyük bir literatür zenginliğine ulaşılmışna rağmen, bu araçlar ile insan infertilitesi arasındaki ilişki hala net olarak kurulamamıştır. Oosit matürasyon anormallikleri, mayotik süreç içerisinde etkin olan mekanizmalarda gerçekleşebilecek aksaklıklar ve oosit'in mevcut durumu göz önüne alındığında dört farklı tip üzerinden değerlendirilmektedir (Beall ve diğerleri, 2010; Çelik, 2011).

Tip I – GV Arresti: Diploten arrest'inin son bulması ve mayozun yeniden başlaması, matürasyon-tetikleyici faktörün (MPF) aktivasyonu ile kontrol edilir. Mayoz I'in kaldığı yerden devam etmesi ve M fazına giriş, morfolojik olarak germinal vezikülün yıkılması (GVBD) ile karakterizedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar ile, MPF aktivasyonuna yol açan anahtar sinyal yollarında gerçekleşen aksaklıkların, GVBD öncesinde oosit arrest'ine neden olduğu gösterilmiştir.

Klinik çalışmalar ile raporlanan vakalarda gözlenen GV'de matürasyon engelinin bahsedilen MPF aktivasyonu için gerekli olan yollarında gerçekleşen bozulmadan kaynaklanıp kaynaklanmadığı bilinmemektedir çünkü bu oositlerin moleküler analizi yapılmamıştır.

Bu tipteki sendroma sahip yumurtalıklar ve oositler morfolojik olarak normal görünür. Ancak GV arrestinde kalan oositler üreten kadınların MPF aktivasyonundan sorumlu sinyal yolunda bir kusura sahip olabileceği düşünülebilir (Beall ve diğerleri, 2010; Çelik, 2011).

Tip II – MI Arresti: Mayoz I evresinden metafaz II arrestine kadar olan ilerleme, kromozomların yoğunlaşmasını, metafaz iğ ipliğinin oluşumunu, ilk metafaz plağı boyunca kromozomların hizalanmasını ve ardından homolog kromozomların ayrılması ve genetik ayrışmayı gerektirir. İlk mayotik bölünmenin sonuçlanması, birinci polar cisimcik (PBI)'in varlığı ile karakterizedir. PBI oluşmadan önce oositin arrest'e girmesi, morfolojik olarak MI arresti olarak sınıflandırılır. MI arresti, ya mayotik ilerlemeyi sağlayan sinyal transdüksiyon yolundaki bir hatadan ya da iğ ipliği oluşumu kontrol noktasının (SAC) aktivasyonuna neden olan herhangi bir anormallikten kaynaklanabilir. Hem fare modellerinde hem de MI arresti görülen vaka raporlarında, genellikle normal iğ ipliği organizasyonuna sahip olanlar ve kromozomal anormallikler gösterenler olmak üzere iki fenotip gözlemlenir (Beall ve diğerleri, 2010; Çelik, 2011).

Tip III – MII Arresti: MII'nin morfolojik olarak sınıflandırılması, çoğunlukla oosit matürasyonunun gerçekleştiğini, metafaz II'de arreste girdiğini ve fertilizasyona uygun olduğu varsayımını doğurur. Ancak, fertilizasyon denemesi sonrası embriyo oluşturma yeteneği olmayan MII morfolojisine sahip oositler üreten kadınlar da vardır. Bu morfolojik matürasyon ile potansiyel arasındaki uyumsuzluk, ya PBI oluşumu ile metafaz II arasındaki herhangi bir aşamada arreste girmiş ve fertilizasyon yeteneği olmayan matüre olmamış oositlerin morfolojik sınıflandırmaya dahil edilmesinden ya da metafaz II'de normal olarak arreste girmiş ancak mayozu tamamlamaya yeteneği olmayan oositlerden kaynaklanabilir (Beall ve diğerleri, 2010; Çelik, 2011).

Tip IV – Karışık Arrest: Bazı infertil hastalar, mayozun birden fazla aşamasında arreste giren oositler üretirler. Hücre döngüsü ilerlemesi ve arrestinden sorumlu temel medyatörler yüksek oranda korunmuş olup, farklı fonksiyonları gerçekleştirmek için farklı homologlar kullanılarak mitoz ve her iki mayoz döngüsü sırasında kullanılırlar. Bu redundans nedeniyle, bir homologun fonksiyon kaybı, bir ilgili aile üyesi tarafından kısmen veya tamamen telafi edilebilir. Kısmi telafi, mayotik ilerleme sırasında karışık arrest fenotipine yol açabilir (Beall ve diğerleri, 2010; Çelik, 2011).

2.3. *In Vitro* Matürasyon

Kliniklere başvuruda bulunan hastalardan elde edilen oositlere *in vitro* matürasyon (IVM) uygulanması, kısırlık problemi yaşayan bireylerin tedavisinde kullanılmakta olan bir yöntemdir. IVM, her ne kadar son yıllarda bilinirliği ve rutin kullanımı artan bir uygulama olsa da aslında uzun yıllardır incelenen ve üzerinde çalışılan bir konudur. Önceleri matüre olmayan insan oositlerinin *in vitro* matürasyonu sonucu elde edilen veriler başarısız gibi gözüксе bile, son yıllarda alanında uzman kliniklerin bildirdiği sonuçların standart IVF siklusları ile elde edilen sonuçlara yakın olduğu gözükmemektedir. Bu nedenle IVM günümüzde dünya genelinde daha yaygın ve daha sık kullanılmaya başlanan bir üremeye yardımcı laboratuvar yöntemi olup, mevcut durumunun da geliştirilmesi için zamana ve araştırmaya ihtiyaç duymaktadır (Çelik, 2011).

Robert Edwards isimli bir bilim insanı, 1965’li yıllarda insan oositlerinin doğal ovaryumlardan elde edildikten sonra kendiliğinden matürasyona uğrayabildiklerini ve *in vitro* döllenebilme yeteneğine kavuşabildiklerini gözlemlemiştir (Edwards, 1965). Bu gözlem sonrasında yapılan uygulamalar, stimülasyona uğramış IVF sikluslarından elde edilen immatür oositleri rehabilite etmek ve kullanılabilir hale getirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ancak bahsedilen bu immatür oositler, matürasyona uğrayıp uğramadıklarını anlamak amacıyla çoğunlukla kendilerini saran kumulus hücrelerinden arındırılmış olup, çevrelerindeki granüloza hücrelerinden yoksun kültür edilmekteydiler. Bu nedenle kurtarma amacıyla elde edilen bu oositlerin hem fertilize olabilme kapasiteleri düşük olmakta hem de gelişen embriyolarda klivaj sorunları meydana gelmekteydi. Bu embriyoların ideal gelişim gösterememeleri oldukça normal karşılanan bir durumdur zira bu immatür oositler aslında kompetanslarını oluşturamamış oositlerdir, çünkü gonadotropinlerin kullanımına rağmen diğer oositler matürasyon aşamalarını tamamlayabilmişken, bu oositler *in vivo* matürasyonlarını tamamlayamamış olan oositlerdir (Çelik, 2011).

IVM tarihçesine bakıldığında, immatür oositlerin matüre edilmesiyle gerçekleştirilen ilk gebelik 1983’te rapor edilirken, 1991’de ise ovaryum stimülasyonu olmadan elde edilen oositlerden ilk gebelik elde edilmiştir. PCO tanısı alan hastalarda ise ilk kez 1994 yılında IVM ile gebelik sağlanmıştır. IVF tedavisi sonrası gerçekleşen ilk doğum, 1978 yılında fizyolojik siklus ile elde edilmiş olsa bile, bugün IVF uygulamalarında tedavi şansını arttırmak adına gonadotropinlerin kullanımı sonucu çok sayıda olgun follikül geliştirilebilmektedir. IVF

tedavisi sürecinde, olgun follikül oranını arttırmak adına gonadotropin salgılatıcı hormon analogları (GnRH-a), insan menapozal gonadotropini (HMG) ya da yüksek oranda saflaştırılmış FSH ile ovaryum stimülasyonu gerçekleştirilmektedir. Fakat bu işlem sonrasında bazı hastalarda ovaryumların fazla miktarda uyarılması ile birlikte ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS) adı verilen bir patolojinin çıkması söz konusudur. OHSS'nin kontrol altına alınamadığı durumlarda hastalarda böbrek yetmezliği, solunum problemleri, tromboemboli ve yaygın olmasa da ölüm ile sonuçlanabilecek olumsuz durumlar görülebilmektedir (Delilbaşı, 2008).

Sonraki dönemlerde tedavi sürecinin uzun olması, ekonomik olarak maliyetli olması, yan etkilerinin uzun vadede ortaya çıkışı gibi nedenler dolayısıyla fertilizasyona uygun oositlerin, *in vitro* matürasyon işlemi ile elde edilmesinin üzerine yoğunlaşmıştır (Delilbaşı, 2008). Aynı zamanda hastalık öykülerinde endometrium ya da meme kanseri gibi, hormonlara duyarlı bir kanser geçmişi olan hastalarda gonadotropinlerin neden olduğu, fizyolojik şartların üstünde görülebilecek östrojen düzeylerinden de sakınılmış ve daha güvenli bir infertilite tedavisi sağlanmış olmaktadır (Çelik, 2011).

Ancak matüre olmamış oositlerin kültür ortamında metafaz II oositlere ilerlemesi, bu oositlerin kompetanslarını da kazandıkları anlamına gelmemektedir. Bir oositin kompetansını kazanabilmesi için nükleer ve sitoplazmik matürasyonlarının birbiri arasında senkronizasyona sahip olması gerekmektedir. Nükleer matürasyondan bahsedildiğinde, germinal vezikülün yıkılması, mayozun tekrar başlaması, birinci polar cismin atılması ve de MII evresinde duraksamanın gerçekleşmesi süreçleri tanımlanmış olur. Sitoplazmik matürasyonu ise mikroskopik gözlemlerle değerlendirmek oldukça güçtür ve sitoplazmik matürasyon sırasında yaşanan problemler ileride kendini embriyo klivajında, gelişiminde ya da implantasyon sırasında gösterir (Çelik, 2011).

IVM uygulaması sırasında dikkat edilmesi gereken nokta toplanacak olan immatür oositleri, baskın follikülün salgılamış olduğu parakrin ve endokrin uyarılar nedeniyle olumsuz bir biçimde etkilenmeden önce elde etmek ve kurtarmaktır. Bu sebeptendir ki temel IVM uygulamalarında immatür oositlerin toplanması, baskın follikülün seçilme zamanına yakın bir dönemde gerçekleştirilmelidir. Aksi takdirde doğal siklusta folliküler dominans sağlandıktan sonra, diğer folliküllerin atreziye gitmesini sağlayan parakrin ve endokrin etkiler toplanması hedeflenen immatür oositler üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir. Bu nedenle, immatür oositlerin toplanma zamanı IVM başarısı için önemli bir noktayı oluşturmaktadır (Çelik, 2011).

İmmatür olarak toplanan oositler, kumulus hücreleri ile çevrili bir şekilde insan oositleri için gerekli olan 24-48 saatlik bir matürasyon süreci amacıyla kullanılan özel IVM besiyerleri içerisine konulur (Son ve diğerleri, 2005). IVM amacıyla kullanılan bu medyumlar farklı ticari formlarda bulunabilmektedir. Bu matürasyon medyumları içerisine kullanım öncesinde çoğunlukla rekombinant FSH ve hCG eklenmesi gerekebilir. Farklı çalışmalar içerisinde ekzojen protein kaynağı olarak matürasyon medyumuna hastadan elde edilen inaktive edilmiş serum ya da follikül sıvı ilavesi de yapıldığı bilinmektedir. Serumda ve folliküler sıvıda bulunan büyüme faktörleri, lipidler, glikoproteinler, steroidler, sitokinler oositin matürasyonunda rol alabilecek maddeler olup, sentetik serum ya da insan albumini eklenmesine üstün olabilirler (Çelik, 2011).

Matürasyon sürecini başarıyla tamamlayan oositler inseminasyon amacıyla çoğunlukla ICSI ile döllenirler. Çünkü oositler hem matürasyonun tespiti için kumulus hücrelerinden arındırılmış durumdadırlar hem de IVM sürecinde zona pellusidanın sertleştiği yönünde teorik bir çekince bulunmaktadır. IVM ile matüre olmuş oositler ile yapılan bir çalışmada, ICSI uygulaması sonrası IVF'e oranla daha yüksek fertilizasyon oranlarına ulaşıldığı gözlemlenmiştir (Hwang ve diğerleri, 2000). Bir diğer çalışmada ise IVF uygulaması sonrası ICSI'ye nazaran daha yüksek implantasyon ve gebelik oranları bildirilmiştir (Söderström-Anttila ve diğerleri, 2005). Bu nedenle sperm parametrelerinde herhangi bir anormallik olmadığı takdirde, ICSI uygulamasının mutlaka gerekli olup olmadığı ya da IVM uygulanmış oositlerin fertilizasyon için elzem olup olmadığı kesin olarak belirli değildir (Çelik, 2011).

IVM sırasında optimize edilmesi gereken bazı alanlar vardır; hangi hastaların IVM için seçilmesi gerektiğinin belirlenmesi, folliküler priming (kısa süreli gonadotropin tedavisi)'in gerekip gerekmediği, endometriumun hazırlanması ve desteğinin en iyi nasıl yapılacağı, uygulanacak inseminasyon yönteminin çeşidi (IVF/ICSI), embriyo transferinin zamanlaması gibi konular bunlara dahildir (Çelik, 2011). Bir diğer ihtiyaç duyulan optimizasyon alanı ise kültür sırasında kullanılacak besiyeri çeşidi ve içeriğidir. Zira *in vitro* oosit matürasyonunu olumsuz etkileyen temel nedenler üzerine uygulanabilecek takviyeler, matürasyon sırasında rol alan biyomoleküler mekanizmalar üzerinde koruyucu ve destekleyici etkiler sağlayabilir. Bu sebeple IVM'in optimizasyonu için çalışmaların yürütülmesine günümüzde hala ihtiyaç duyulmaktadır (Çelik, 2011; Delilbaşı, 2008).

IVM hedefli seçilen besiyeri, matürasyon sırasında oositlerin sitoplazmik ve nükleer gelişimlerine katkı sağlamalıdır. Bununla birlikte matüre olmuş oositlerde gen ifadesinin ve regülasyonunun da düzenlenmesi adına optimal kültür şartlarını da ihtiva etmelidir. Bu

ihtiyaçlar nedeniyle besiyeri içeriğinde mutlaka olması gereken maddeler ve dikkat edilmesi gereken parametreler bulunmaktadır.

Oosit *in vitro* matürasyonunda etkili olduğu düşünölen bileşenlerden birisi fetal dana serumudur (Fetal calf serum, FCS). Normal şartlarda fertilizasyon sırasında polispermiyi önlemek adına kortikal reaksiyon gerçekleşmekte ve bu da zona pellusidanın yapısında sertleşmeye neden olmaktadır. FCS feuitin olarak adlandırılan proteini barındırır. Bu protein zona pellusidanın sertleşmesini önleyerek fonksiyon görmektedir. Bu durum FCS'nin oosit matürasyonu ve fertilizasyonunda önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Ancak ICSI uygulamasının ortaya çıkışı ve yaygınlaşması ile FCS'nin rolü sorgulanır olmuştur.

Uygulama sırasında kullanılan besiyerlerinin pH değeri, oositin ve daha sonra gelişecek embriyoya ait hücrelerin içsel pH'sını etkileyeceğinden dolayı önemli bir faktördür. Aynı zamanda *in vitro* matürasyon aşamasında mayoz bölünmenin tamamlanması için içsel pH'nın artışı da söz konusudur. Bu sebeple besiyerinin pH dengesi besiyerine eklenebilecek çeşitli tamponlarla veya CO₂'li inkübatör yardımıyla sağlanmalıdır.

Bununla birlikte ositler ve somatik hücreler için temel enerji kaynağı olan glukoz, pirüvat ve laktat da besiyerine değişik konsantrasyonlarda eklenebilecek faktörler arasında yer almaktadır. Oositlerin ihtiyaç duyduğu faktörlerden biri olan pirüvat, normal şartlarda kumulus hücreleri tarafından glukoz ve laktat moleküllerinin pirüvata dönüştürölmesiyle büyük ölçüde elde edilmektedir. Bu durum matürasyon aşamasında oosit çevresinde bulunan kumulus hücrelerinin önemini açıkça vurgulamaktadır. Denudasyona uğramış oositlerin besiyerine pirüvat eklendiğinde mevcut durumlarını korudukları ancak kumulus hücreleri ile birlikte kokültür uygulaması yapıldığında mayoz bölünme sırasında bir duraklama olmadığı gözlenmiştir.

Besiyerinde bulunması gerektiğı düşünölen diğeri moleküller ise aminoasitler ve vitaminlerdir. Aminoasitler proteinlerin yapı taşı olmakla birlikte tampon olarak da görev görürler ve enerji kaynağı olarak kullanılırlar. Embriyo gelişimi sırasında besiyerlerinin serum içirip içermedikleri dikkate alınarak gelişim evresine göre farklı konsantrasyonlarda aminoasit eklemesi yapılmalıdır. Bu konuda yapılan hayvan deneylerinde vitaminlerin matürasyon üzerindeki etkisi konusunda ise yetersiz bilgi bulunmakla birlikte, matürasyon esnasında nükleer ve sitoplazmik matürasyonu uyardığı yönünde de bilgiler mevcuttur (Delilbaşı, 2008).

Bu bilgilere ek olarak, *in vitro* oosit matürasyonu süresince karşılaşılan oosit matürasyon yetmezliğı tiplerine ve tespit edilen sebeplerine uygun olarak besiyerlerine takviyelerde

bulunulması çeşitli araştırmacılar tarafından değerlendirilen bir durumdur. Sendrom tipi, nedenleri ve bu konuya özel optimize edilmiş IVM medyumlarının literatüre kazandırılması ve klinik yansımalarını görebilmek adına hala çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4. Pestisitler

Pestisitler, tarım ve gıda ürünlerini korumak amacıyla zararlı organizmaların kontrol altına alınması ya da yok edilmesi adına kullanılan doğal veya sentetik kimyasal maddeler olarak tanımlanabilmektedir (Sharma ve diğerleri, 2019). Tarımsal üretime olan katkıları nedeniyle zaman içerisinde bu kimyasallara olan bağımlılığımız katlanarak artmış durumdadır. Ancak yararlı etkilerine rağmen, kullanımıyla birlikte toprak, su ve diğer doğal kaynaklara karışarak önlenemez bir şekilde ekosistem döngülerine dahil olmaktadır. Buna bağlı olarak, yoğun miktarda kullanılan bu pestisitlerin çevre, hayvan ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu sürekli artan kanıtlarla gösterilmekle birlikte yadsınamaz bir gerçek halini almıştır (Jayaraj ve diğerleri, 2016).

Pestisit kullanımı, insanlık tarihi içerisinde neredeyse tarımsal hayata geçişe kadar uzanmaktadır. Ancak milattan önceki dönemlerde kimyasal ürünlerden bahsetmek pek mümkün değildir. Dolayısıyla kullanılan ürünler direkt olarak mevcut hayvan, bitki ya da mineral kaynaklardan elde edilmekle birlikte, bu ürünlerin yakılmasıyla ortaya çıkan kötü kokunun haşerelere ve küflere karşı etkili olduğu inancı hakimdi. Kimyasal ürünlerin kullanımının ise ancak 1800'lerin sonuna doğru baktığımızda, inorganik tuzlarla birlikte başladığı bilinmektedir. Bu dönemlerde insanlar uzun süre meyve ve patates gibi gıdalarda mantar enfeksiyonlarına karşı bakır, sülfat ve kireçli arsenik gibi bileşikler kullanmıştır. Daha sonraki süreçlerde, bahsedilen bu bileşiklerin kullanımı insanlara karşı toksik etkileri nedeniyle yerini organik bileşiklere bırakmıştır. Ne var ki, 1940'lı yıllara gelindiğinde, kimya alanındaki gelişmelerle birlikte daha etkin ve güçlü olan sentetik organik bileşiklerin üretimi ve kullanımı yaygınlaşarak günümüzdeki halini almıştır (Moreira ve diğerleri, 2021).

Pestisitler sınıflandırılırken kimyasal yapıları, etki mekanizmaları, fonksiyonel grupları ve toksisite seviyeleri göz önünde bulundurulur. İlk sınıflandırma pestisitler, herbisitler, fungisitler, insektisitler ve rodensitler olmak üzere tarım zararlılarının çeşidine göre yapılmaktadır (Amaral, 2014; Mnif ve diğerleri, 2011). Kimyasal yapılarına göre ise, organik ve inorganik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bakır, bakır sülfat, demir sülfat, kireç ve kükürt

inorganik yapıdaki pestisitlere dahil olurken, organik pestisitler daha karmaşık bir içeriğe sahiptir (Kim ve diğerleri, 2017). Organik pestisitler bünyesinde klorohidrokarbonlar, organofosfatlar, karbamatlar, sentetik piretroidler, metabolit ve hormon analogları, sentetik üre, triazinler, benzimidazoller, metaldehitler, metal fosfitler gibi sayıları daha da arttırılabilecek çeşitli kimyasal bileşikler ihtiva etmektedir (C. Zhang ve diğerleri, 2018).

Organik pestisitler, haşereleler üzerinde çoğunlukla sinir sistemi ve kaslarda bulunan reseptörler, enzimler ve iyon kanallarını hedef alarak etkinlik göstermektedir. Örneğin, organoklorlu pestisitler MSS ve PSS’de iyon değişim ritmini bozarak aksiyon potansiyeli oluşumunu inhibe eder. Organofosfatlar ve karbamatlar, AChE enzimini baskılayarak muskarinik sinapslarda ACh birikmesiyle birlikte reseptör uyarımını arttırır. Yine piretroidler, aksonlar üzerinde voltaj kapılı sodyum kanallarının sürekli açık kalmasına sebep olarak sinirsel uyarımı engeller ve canlıyı felce sürükler (Gupta ve diğerleri, 2017; Leemans ve diğerleri, 2019; Zamkowska ve diğerleri, 2018).

Günümüzde artık, bahsedilen bu pestisitlerin kendisine veya kalıntılarına maruz kalmanın pek çok yolu mevcuttur. Su ve toprağa karışmış olan pestisitlere temas etmek, bu kimyasalları solumak, üretim yerlerinde bulunmak veya kullanım oranı yüksek olan tarımsal alanlara yakın ikamet etmek gibi etkenler pestisitlere maruziyetimizi arttırırsa da en yaygın temas doğrudan, üretimi sırasında pestisit kullanılan tarım ürünlerini tüketmektir (Mostafalou ve Abdollahi, 2013). Meyve ve sebzeler, sağlıklı bir diyetin önemli bileşenleri olarak otoriteler tarafından şiddetle tavsiye edilen gıdalar arasında yer alırlar. Ne var ki, bu gıdalar aynı zamanda diyet yoluyla maruz kaldığımız pestisit kalıntılarının da temel kaynağını oluşturur (Nassan ve diğerleri, 2018).

Organik pestisitlerin tarihsel sürecine bakıldığında piyasada ilkin organoklorinleri (OCP) görmekteyiz (Leemans ve diğerleri, 2019). Ancak OCP’lerin biyobozunurlukları çok düşüktür ve çevresel kirlilik için büyük tehdit teşkil etmektedir. Bu sebeple OCP’lere alternatif olarak, kararsız kimyasal yapıları nedeniyle hızlı hidrolize olan ve bu sebeple de nispeten daha az çevresel kalıntı bırakan organofosfatlar (OP) tercih edilmeye başlanmıştır (Soltaninejad ve Shadnia, 2014). OP’ler aynı zamanda geniş spektrumlu bir etkinlik göstermekle birlikte, hedef spesifikliği, geniş kullanım alanı ve ekonomik uygunlukları nedeniyle de piyasaya hâkim olmuştur. Ancak OP’lerin tarımsal alanda pek çok avantajı olmasına rağmen insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerine en az diğer pestisitler kadar dikkat edilmelidir (Costa, 2018).

OP'lerin toksik etkileri arasında en iyi bilineni kuşkusuz asetilkolinesteraz (AChE)'in baskılanması durumudur. AChE, periferik (PSS) ve merkezi (MSS) sinir sistemi içerisinde etkin rol oynayan asetilkolin (ACh)'i hidrolize uğratan bir enzimdir. OP'ler ile baskılanma sonucu, enzim substrat etkileşimi bozularak sinaptik aralıklarda kontrolsüz ACh birikimi gerçekleşir (Jokanović, 2001). Böylelikle reseptörlerde oluşan aşırı uyarılma zamanla yerini duyarsızlaşmaya bırakarak sinir sisteminde aksaklıklara ve böylelikle nöbetlere, kas felcine, solunum yetmezliğine, koma ve ölüme neden olabilmektedir (Jokanović ve Kosanović, 2010).

Bununla birlikte, OP bileşiklere akut veya kronik maruziyet sonucu redoks süreçlerinde değişikliklerin gerçekleştiği ve oksidatif stresin tetiklendiğini destekleyen çalışmalar mevcuttur (Ramirez-Vargas ve diğerleri, 2017). Pestisit hasarı direkt olarak, endojen serbest radikallerin üretimi ve hücrel antioksidanların yıkılmasının desteklenmesiyle birlikte hücre içinde ROS/antioksidan dengesizliği sonucu oluşmaktadır (Li ve diğerleri, 2017; Mostafalou ve Abdollahi, 2017a). ROS üretimi, OP'lerin sitokrom P450 tarafından metabolize edilirken yapısına bir moleküler oksijen atomunun eklenmesi ile gerçekleşir (Lukaszewicz-Hussain, 2010). Aynı zamanda OP'lere kronik ve aşırı maruziyetle birlikte mitokondriyal hasarın oluşması sonucu sitokrom c'nin sitozolde aşırı birikimi hücre içi kaspazları aktive ederek apoptoz süreçlerini de tetiklemektedir (Li ve diğerleri, 2017).

Pestisitlerin endokrin bozucu etkileri de mevcuttur. Hormonal düzenlenme sırasında herhangi bir noktada sisteme dahil olarak sürecin dengesizleşmesi veya bozulmasına neden olabilir (Senthilkumaran, 2015). Örneğin, hormonal üretim için gerekli olan reseptörlere tıpkı bir ligand gibi bağlanarak steroidlerin östrojene dönüşmesini tetikleyebilir ve östrojene duyarlı gen bölgelerinin aktive olmasını sağlayarak kontrolsüz üretim ve faaliyete sebep olabilir (Mostafalou ve Abdollahi, 2017b).

Bu anlatılanların ışığında pestisitlere maruziyet, başta ürüme bozuklukları (Şekil 18) ve infertilite olmak üzere, sinir sistemi hastalıkları, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, konjenital anomaliler de dahil olmak üzere sayılabilecek daha pek çok kronik hastalıkların başlıca sebeplerinden olabilmektedir (Mostafalou ve Abdollahi, 2013).



Şekil 18. Organofosfat pestisitlerin dişi kemirgen üreme sistemi üzerindeki etkileri (Venkidasamy ve diğerleri, 2021).

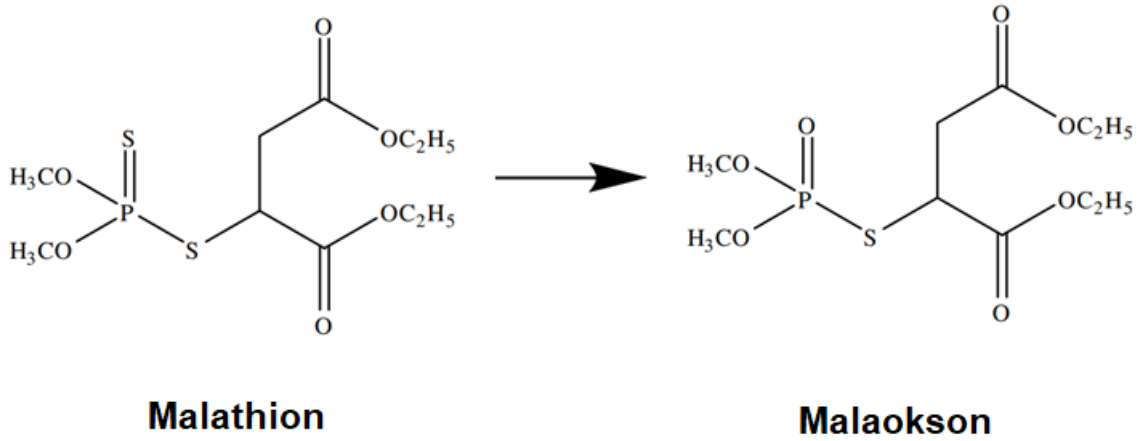
2.4.1. Malathion

Malathion (MAL), tarımda, endüstriyel alanlarda ve dış mekânlarda bulunan zararlıları kontrol etmek için kullanılan geniş etki alanına sahip, organofosfat sınıfı bir insektisittir. Aynı zamanda vektörel hastalıklarla mücadele kapsamında sivrisineklerin kontrol altına alınması gibi halk sağlığını etkileyen uygulamalarda da kullanılır. Bununla birlikte, hayvanlarda bulunan dış parazitler ve insanlarda bulunan baş ve vücut bitlerine karşı da kullanımı mevcuttur (Reed ve Rubin, 2014).

“dietyl 2-[(dimetoksi-fosforotiyol)tio]butandioat” olarak da adlandırılan MAL’ın kapalı formülü $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ ’dir. MAL, oda sıcaklığında merkaptan, sarımsak gibi karakteristik bir kokuya, renksiz veya soluk sarı arası bir görünüme sahiptir. Suda çözünübilirliği düşüktür ancak etil eter, benzen ve etanol gibi maddeler içerisinde çözünür, organik çözücülerin çoğuyla karıştırılabilir (Jensen ve Whatling, 2010a).

MAL, dahil olduğu OP’lere nazaran daha az akut toksisite göstermesi nedeniyle 50 yılı aşkın süredir yoğun kullanıma sahiptir (Ozsoy ve diğerleri, 2016). Ancak hakkında yapılan bilimsel çalışmalar MAL’un sebep olduğu akut ve kronik toksisitenin en az diğer pestisitler

kadar hasar verici olduğunu kanıtlar niteliğindedir (Reed ve Rubin, 2014). MAL hedef organizma tarafından emildikten sonra reaksiyonlar sonucu Malaokson adı verilen bir metabolit ortaya çıkabilmektedir (Şekil 19). Malaokson'un, Malathion'dan 61 kat daha toksik olduğuna dair bilimsel çalışmalar mevcuttur (Jensen ve Whatling, 2010a). MAL'a maruz kalmak karaciğer, böbrek, pankreas, testis, ovaryum ve beyin dahil olmak üzere birçok organda görülen fonksiyonel hasar ile ilişkilendirilmiştir (Özsoy ve diğerleri, 2016).



Şekil 19. Malathion'un Malaokson'a dönüşümünün kimyasal gösterimi (Jensen ve Whatling, 2010b).

Bunun yanı sıra MAL, birçok metabolik probleme de sebep olmaktadır (Esen ve Uysal, 2018). ACh'in baskılanması, apoptoz'un tetiklenmesi, genetik toksisite, immün sistemde bozulmalar, oksidatif stres ve inflamasyonun artması gibi durumlar toksik mekanizmalar arasında yer alır (Geng ve diğerleri, 2015; Guyton ve diğerleri, 2015; Ince ve diğerleri, 2017; Nicholas ve diğerleri, 1979). Ancak toksisite seviyesi MAL'a maruziyetin süresi, maruziyet şekli ve düzeyi, yaş ve genel sağlık durumu ile de yakından ilişkilidir (Rosas ve Eskenazi, 2008; Sánchez-Santed ve diğerleri, 2016).

AChE enziminin baskılanması yoluyla ACh'nin kontrolsüz birikimi MAL toksisitesinin temel mekanizmalarından birisidir. Bu birikim sonucunda MSS ve PSS'de reseptörlerin aşırı uyarılması meydana gelir. Böylelikle MAL'a maruz kalan kişide aşırı tükürük salgılama, sıkça dışkılama ve idrara çıkma, karın ağrısı, kusma ve gözyaşı bezlerinin aşırı çalışması gibi semptomlarla birlikte kas zayıflığı, kaslarda titreme ve sertlik, felç veya daha ilerisi solunum depresyonu gözlemlenebilir (Kwong, 2002; Takahashi ve Hashizume, 2014).

Ancak MAL maruziyeti ile oluşan geniş bir yelpazeye sahip semptomların hepsi AChE baskılanması ile doğrudan açıklanamamaktadır. Lipofilik bir yapıya sahip olan MAL, hücre zarı ile kolay bir şekilde ilişki kurarak yapısal hasarlara ve hücre içi serbest radikal seviyelerinin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca Rieger ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, MAL maruziyeti ile birlikte gerçekleşen hücre ölümü sırasında hücre içi süperoksit anyon miktarında bir artışın gerçekleştiğini ve askorbik asit tedavisiyle birlikte, AChE aktivitesi gözlemlenmeksizin, hücre ölümü oranlarında anlamlı bir azalma olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçlar, MAL'a maruziyet sırasında oksidatif stres'in gözle görülür bir biçimde arttığını göstermektedir (Rieger ve diğerleri, 2017a).

MAL maruziyeti ile birlikte olduğu kanıtlanan oksidatif stres, hücreler üzerinde membran bütünlüğünü bozmakta ve mitokondrilerde işlevsel hasarlara (Şekil 20) neden olmaktadır (Fortunato ve diğerleri, 2006; Said ve diğerleri, 2014). Ayrıca yapısal ve fonksiyonel olarak işlev gören protein, lipid ve DNA gibi biyomoleküller üzerinde de oksidasyon süreçlerini başlatır (Cooke ve diğerleri, 2003). Böylelikle hücre ölüm yollarının aktive olmasına, genetik mutasyonların veya kanserojen etkilerin artmasına sebep olmaktadır. Buna bağlı olarak pek çok farklı dokuda rapor edilen apoptoz indüksiyonunun MAL toksisitesi ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (dos Santos ve diğerleri, 2016; Masoud, 2003). Özetle, MAL maruziyeti ile birlikte oluşan oksidatif strese bağlı hücresel problemler vücut içerisinde pekçok yapı ve organı direkt olarak etkileyebilmekte (Şekil 20), çeşitli patolojilerin meydana gelmesine sebep olabilmektedir (Shieh ve diğerleri, 2019).

Bu patolojiler arasında hem erkek hem de kadın üreme sistemi toksisitesine bağlı oluşan infertilite de yer almaktadır. Günümüzde hala pestisitlerin kadın üreme sistemine olan belirgin etkileri, erkek üreme sistemine kıyasla daha azdır. Ancak MAL'un da dahil olduğu OP'ler ile yapılan çalışmalarda yumurtalıklarda işlevsel kayıpların olduğu, granüloza hücrelerinde apoptoz ve atrezi oranının arttığı ve buna bağlı olarak folikül kayıplarının gerçekleştiği bildirilmiştir (Bhardwaj ve Saraf, 2014). Koç ve diğerleri (2019), MAL maruziyetinin doza bağlı olarak yetişkin Wistar rat'larında ovaryum boyutlarını azalttığını, Özsoy ve diğerleri (2016) de, MAL maruziyetiyle birlikte ovaryumda bulunan SOD ve CAT aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla düştüğünü bildirmiştir (Koç ve diğerleri, 2009; Özsoy ve diğerleri, 2016). Ayrıca MAL'a maruziyetle birlikte; granüloza hücrelerinde çekirdek parçalanması, piknoz, membran bütünlüğünde kayıplar, kromatin kondenzasyonu ve vakuolizasyon (Bhardwaj ve Saraf, 2016); oositlerin hayatta kalma oranında azalma ve transkripsiyon, translasyon ve

mitokondriyal fonksiyonda görevli olan gen ifadelerinde problemlerin (Bonilla ve diğerleri, 2008a) meydana geldiği bildirilmiştir.



Şekil 20. Malathion'un hücreler üzerindeki etkileri (Badr, 2020).

2.5. Oksidatif Stres, ROS ve Serbest Radikaller

Azot, kükürt ve oksijen gibi moleküllerin reaktif türlerinin DNA, lipid ve protein gibi makromoleküllere oksidatif hasar verdiği iyi bilinen bir gerçektir (Pallavi ve diğerleri, 2012). Bahsedilen bu reaktif türlerin üretimi ile antioksidanlarca desteklenen savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulması durumuna oksidatif stres adı verilir (Pisoschi ve Pop, 2015). Oksidatif stres nedeniyle hayati önem taşıyan biyomoleküllerin hasara uğraması veya diğer reaktif türlerin üretiminin teşvik edilmesi hücrelerde nekroz, apoptoz gibi ölüm mekanizmalarının aktive olmasına sebep olmaktadır (Valko ve diğerleri, 2007).

Söz konusu bu reaktif türler, radikal olmayan oksidanlar ve serbest radikaller olarak ayrılmaktadır. Serbest radikaller elektriksel yük barındırdıkları ve eşleşme yapmamış bir elektrona sahip oldukları için diğer moleküllerle reaksiyonları sonucu oksidasyona sebep olup kendilerini nötralize ederler. Bu nedenle zarar verici bir potansiyele sahip kimyasal türler olarak da nitelendirilebilirler (Cheeseman ve Slater, 1993). Serbest olmayan türler ise, canlı organizmalarda başlıca üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar; reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve reaktif kükürt türleri (RSS) olarak sınıflandırılır (Lu ve diğerleri, 2010).

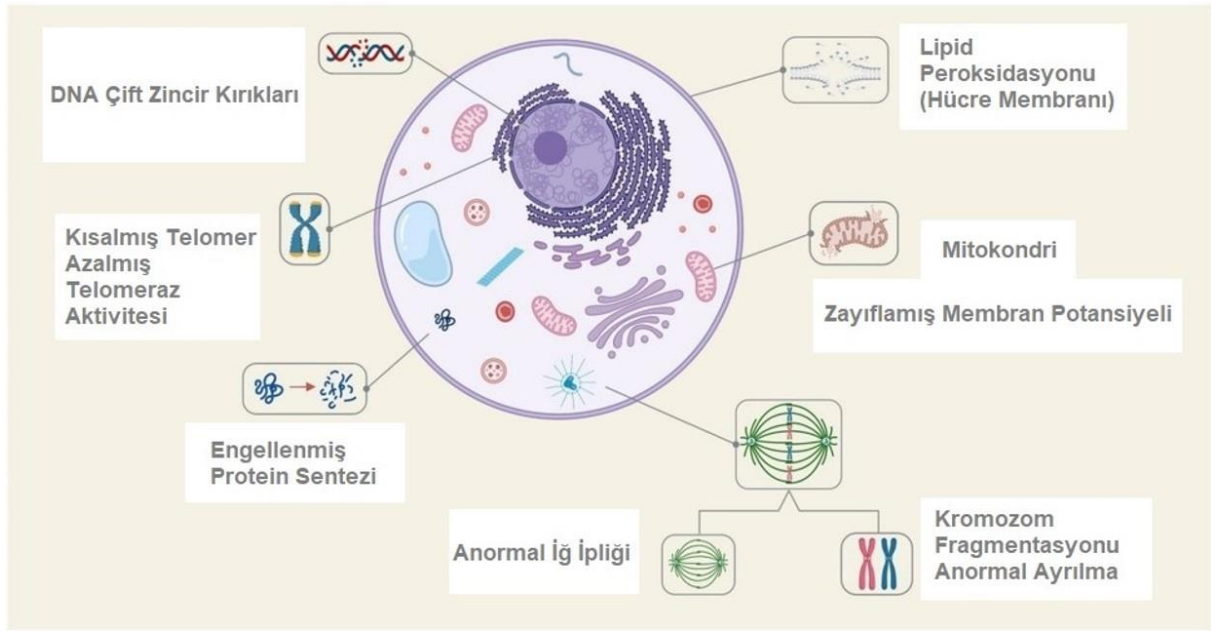
Oksidatif strese büyük rolü olan ROS, peroksizomlar ve endoplazmik retikulum'un yanı sıra, hücre içerisinde iki temel endojen kaynak sayesinde üretilmektedir; NADPH oksidaz (NOX) enzim ailesi ve mitokondri. NOX ailesi üyeleri hücre membranında konumlanmaktadır ve patolojik durumlarda en sık karşılaşılanlar NOX2 ve NOX3'tür (DeVallance ve diğerleri, 2019).

Mitokondri kaynaklı ROS ise, indirgenmiş NADH'ın oksitlenerek NAD⁺'ya dönüşmesi sırasında yani oksidatif fosforilasyonla oluşmaktadır (Ray ve diğerleri, 2012; Zhu ve diğerleri, 2019). Hücreler, bu iki temel kaynak ile üretilmiş olan süperoksit anyonunu, hidrojen peroksit (H₂O₂)'e dönüştürmek için süperoksit dismutaz enzimini kullanır. Oksitleme gücü oldukça yüksek olan hidrojen peroksit'in suya dönüşmesi adına hücre içerisinde birtakım antioksidan proteinlerin sentezi başlar. Bu sayede üretim ve tüketim dengede tutulmaya çalışılır (Beckhauser ve diğerleri, 2016; Nolfi-Donagan ve diğerleri, 2020; Veith ve Moorthy, 2018; Zhu ve diğerleri, 2019).

Anlatılanların aksine ROS ve RNS'lerin bulundukları yere, miktarlarına ve işlevlerine bağlı olmak kaydıyla yararlı etkilerinin de olduğu açıklanmıştır. Örneğin, düşük miktarlarda bulunduğu takdirde süperoksit ve nitrik oksit radikallerinin hücresel yanıtta görev aldığı bilinmektedir (Valko ve diğerleri, 2007). Bununla birlikte süperoksit dismutaz (SOD) ve H₂O₂'nin etkisiyle hücre içinde dengede tutularak, bazı yollarda önemli bir sinyal molekülü olarak görev alırlar. Bu sayede anjiyogenez'i düzenleyen HIF gibi transkripsiyon faktörlerinin üretimini, hücresel proliferasyonu düzenleyen MAPK'ları, hücre sağ kalımında görevli olan NF-kB yolağını ve hücresel büyümeyi düzenleyen PI3K yolağını aktive etmektedir. Ayrıca ROS'un immün sisteme de yardımcı bulunduğu ve yabancı organizmalar ile kseno bileşiklerin fagositozunda etkin olduğu gösterilmiştir (Murphy ve diğerleri, 2022; Sies ve diğerleri, 2022; H. Zhang ve diğerleri, 2021).

Ancak ROS miktarı dengede tutulamaz ise, DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu artmaya başlar (Şekil 21). Özellikle endoplazmik retikulum ve mitokondriyal zarlar ile hücre zarı bünyesinde bulunan lipidler, peroksidasyonun ana hedefleri arasında yer almaktadır. Peroksidasyon sırasında son ürün olarak açığa çıkan lipid peroksitler hücre için oldukça toksik bir etkiye sahiptir ve glutatyon tarafından, henüz tam olarak aydınlatılamamış bir mekanizma sayesinde dengede tutulabilmektedir (Gaschler ve Stockwell, 2017; Juan ve diğerleri, 2021; Ray ve diğerleri, 2012).

Lipidlerin yanı sıra proteinler de peroksidasyona uğrayan biyomoleküllerdir (Şekil 21). Protein peroksidasyonu sonrası açığa çıkan son ürünler direkt olarak toksik değildir ancak inaktif ve hatalı katlanmış proteinlerin birikmesine neden olabilmektedir (Zhu ve diğerleri, 2019). Hücre tarafından istenmeyen bu birikimin zamanla kontrol edilemez hale gelmesiyle apoptoz indüklenebilir ve DNA hasarı artabilir. Bununla birlikte, proteinlerde meydana gelen bu yapısal değişiklikler fonksiyonlarını da etkileyeceğinden dolayı normal hücre aktivitesinde de bozulmalar meydana gelir (Gaschler ve Stockwell, 2017).



Şekil 21. Hücre içi oksidatif stres hasarı (Yan ve diğerleri, 2022).

Öte yandan ROS, biyolojik sistemlerde hava ve su kirliliği, kötü beslenme alışkanlıkları, kontrolsüz ilaç kullanımı, alkol ve tütün ürünlerinin tüketimi, ağır ve geçiş metallerine maruziyet, endüstriyel çözücülere maruziyet, yüksek sıcaklıklar, ultraviyole ışık ve pestisitlere maruziyetle birlikte de artabilmektedir (Pham-Huy ve diğerleri, 2008).

Sonuç olarak organizmada kontrolsüz ROS artışıyla birlikte obezite, insülin direnci, hiperglisemi, kronik inflamasyon, dislipidemi gibi metabolik rahatsızlıkların yanı sıra kardiyovasküler hastalıklar, kanser, hipertansiyon, nörodegeneratif hastalıklar, yaşlanma, infertilite vb. hastalıklar da görülebilmektedir (Çolak ve Pap, 2021; Forrester ve diğerleri, 2018; Kotha ve diğerleri, 2022a; Padgett ve diğerleri, 2013).

2.5.1. Oksidatif Stres'in Kadın İnfertilitesi ve Oosit Matürasyonu'na Etkileri

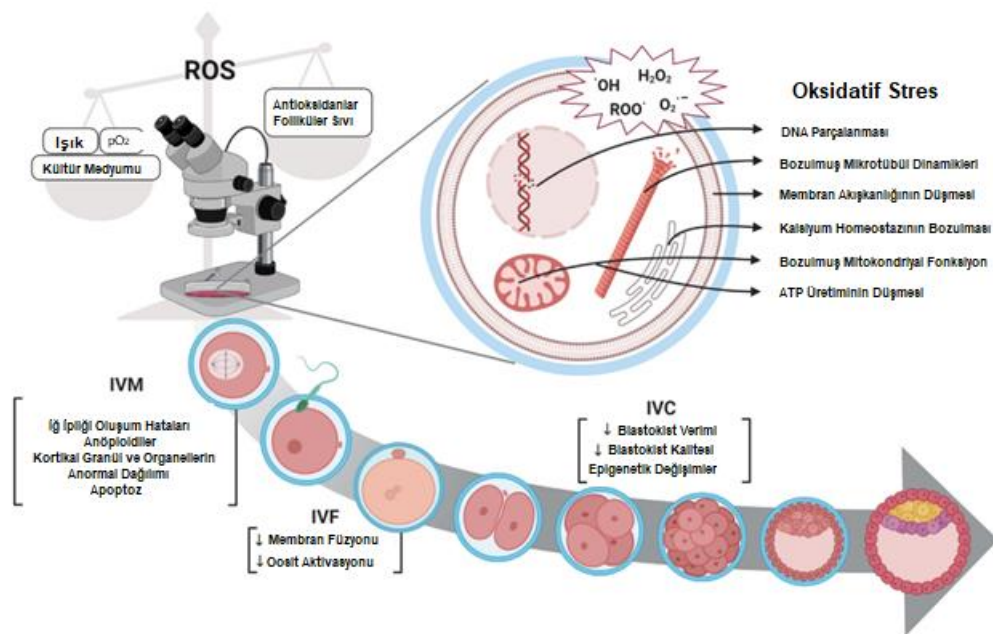
Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımlamasına göre infertilite, çiftlerin en az 1 yıl boyunca korunmasız ve düzenli aralıklarla koitusta bulunmalarına karşın çocuk sahibi olamamaları durumudur (Zegers-Hochschild, 2006). Bu konu hakkında yapılan mevcut çalışmalar, infertilitenin tüm çiftler arasında %17'lik bir kesimi etkilediğini ve sebebinin kadın veya erkekleri etkileyen çeşitli patolojiler olduğunu göstermektedir. Kadınlarda karşılaşılan infertilite ise neredeyse mevcut durumun yarısını oluşturmaktadır ve günümüzde dünya genelinde milyonlarca kadın önemli bir halk sağlığı sorunu olan infertilite ile karşı karşıyadır. Bu sorunun pek çok sebebi olmakla birlikte oksidatif stres kadın infertilitesi patofizyolojisinde önemli bir yere sahiptir. Buna ROS ve antioksidanlar arasındaki moleküler dengenin bozulması sebep olmaktadır (Betteridge, 2000; Bhattacharya ve diğerleri, 2010).

ROS'un fizyolojik seviyelerde bulunması, canlıda homeostazinin devam ettirilebilmesi ve farklı moleküler yolların düzgün işleyişi için gereklidir. Serbest radikallerin düşük ve dengeli seviyelerde tutulması oosit matürasyonunu, foliküllerin fizyolojik bir şekilde atreziye uğratılabilmesini, ovulasyon ve fertilizasyonu, luteal döngüleri ve hamilelik süreçlerini sağlıklı bir şekilde düzenleyebilmektedir (Riley ve Behrman, 1991).

Ancak aşırı ROS seviyeleri antioksidanlar tarafından dengede tutulamaz ise kadın genital sisteminde patolojik durumlar meydana gelebilmektedir. Oosit ve foliküller üreme sistemindeki oksidatif stres nedeniyle yapı ve fonksiyon açısından olumsuz etkilenir ve bu da endokrin fonksiyondaki düzensizlikler ve endometrium hasarı olarak yansır. Sonuç olarak da granüloza hücrelerinde artan apoptoz, hormonal üretimin sekteye uğraması, ovulasyon problemleri ve dahası ile karşılaşabiliriz. Bahsedilen bu durumlar endometriozis, polikistik over sendromu (PCOS), kanser ve açıklanamayan infertilite gibi rahatsızlıklara neden olmakla birlikte plasental problemler, düşük, erken doğum, tekrarlayan gebelik kaybı, preeklampsi, intrauterin büyüme geriliği, iç gebelik, gestasyonel diyabet gibi gebelikle ilişkili komplikasyonlara da sebep olabilmektedir (Webster ve diğerleri, 2008).

ROS'un fizyolojik seviyelerin üstünde bulunmasıyla birlikte oluşan bir diğer önemli kadın infertilitesi problemi ise oosit matürasyonu sırasında yaşanan sorunlardır (Şekil 22). ROS'un endojen üretiminin çoğunlukla mitokondrilerde gerçekleştiği bilinmektedir. Mitokondri ise oositlerde en çok bulunan organel olmakla birlikte fertilizasyonun gerçekleşmesi ve embriyo gelişiminin devamlılığı için gerekli olan enerjiyi temin eder

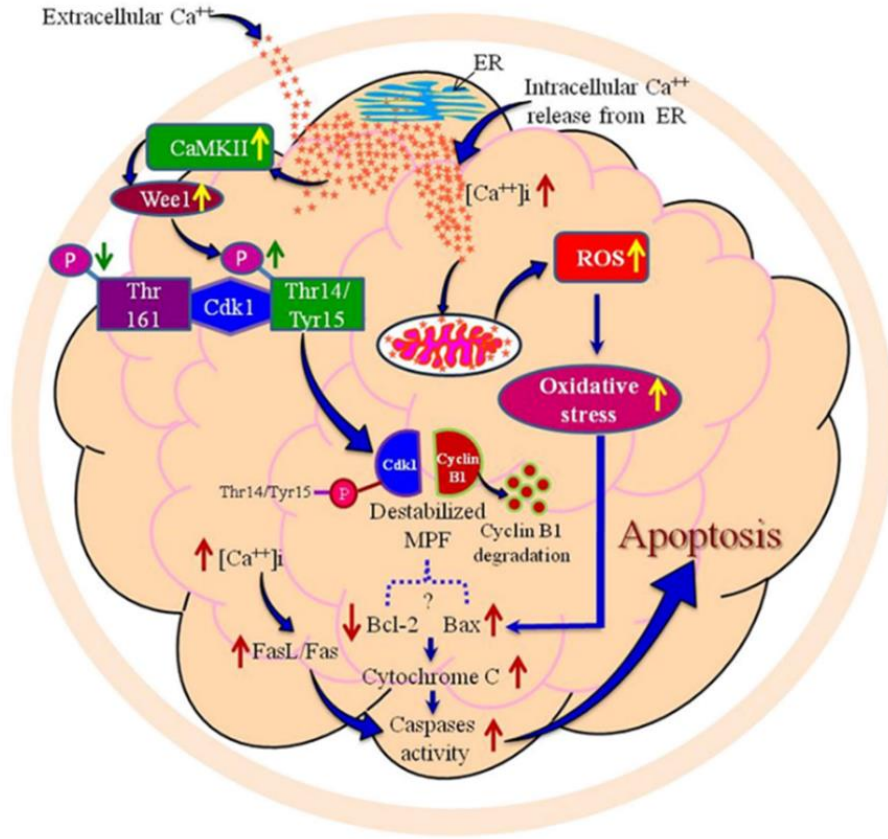
(Kirillova ve diğ erleri, 2021). Ayrıca mitokondri, oositlerde mayoz bölünme sırasında iğ ipliklerinin düzenlenmesi, kromozomların ayrılması ve matürasyonun desteklenmesi gibi önemli olaylarda da etkin rol oynar (Z. Jiang ve Shen, 2022). Bu sebeple oosit kalitesini incelemek için mitokondrilerin sayısına, hücre içindeki dağılımına ve mtDNA dizilimine dikkat etmek gerekir (Yang ve diğ erleri, 2021). Bu durum, oosit oksidatif stres modeli oluşturulan bir çalışmada, mitokondriyal membran potansiyelinde ve ATP seviyelerinde azalmayla birlikte mayotik iğ ipliklerinde belirgin bir hasarın oluştuğu sonucuyla da desteklenmektedir (X. Zhang ve diğ erleri, 2006). Aynı zamanda oksidatif stres hasar modelinde mitokondriyal hasarın artışı granüloza hücreleri için de geçerlidir (Tanabe ve diğ erleri, 2015). Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, oositler ve onu destekleyen granüloza hücreleri arasındaki iletişim ağını keserek nükleotid, piruvat ve aminoasit gibi moleküler haberleşmede etkin olan maddelerin çift yönlü geçişini engelleyerek matürasyon ve embriyogenezi (şekil 22) de büyük oranda olumsuz yönde etkilemektedir (May-Panloup ve diğ erleri, 2016).



Şekil 22. ROS'un *in vitro* oosit matürasyonu ve embriyo gelişimi üzerindeki etkileri (Soto-Heras ve Paramio, 2020).

Bununla birlikte oksidatif stres Bax üretiminde artışa neden olarak Bax/Bcl-2 oranını olumsuz yönde etkiler (Liu ve diğerleri, 2000). Paralel olarak mitokondri membran potansiyelinde yapmış olduğu değişiklikler nedeniyle de oosit sitozolünde sitokrom c

miktarında bir artış gerçekleşir (Chaube ve diğerleri, 2005; Gordo ve diğerleri, 2002). Sitokrom C'nin artışı oositte kaspaz aktivasyonunu tetikler. Aktive olan kaspaz-3, hücre içinde yapısal ve fonksiyonel birimleri etkileyerek oositin yapısal mimarisini bozar (Şekil 23). Böylelikle oosit içerisinde apoptotik süreçler başlatılmış olur (Chaube ve diğerleri, 2005).



Şekil 23. Oositlerde apoptoz moleküler mekanizması (Tiwari ve diğerleri, 2017).

2.6. Antioksidanlar

Antioksidanlar, oksidanların ve serbest radikallerin olumsuz etkilerini geciktiren, engelleyen, hücre içerisinden temizleyen ya da azaltan ve böylelikle canlıyı aldığı veya alacağı hasardan koruyan moleküller olarak nitelendirilebilir (Lobo ve diğerleri, 2010). Halliwell ve Gutteridge ise, antioksidanları “oksitlenebilir bir substrata nazaran düşük konsantrasyonlarda mevcut olduğunda bile, o substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktirebilen veya engelleyen herhangi bir madde” olarak tanımlamıştır. Ancak daha sonrasında tanımda bir

değişikliğe gidilerek, "hedef moleküldeki oksidatif hasarı geciktiren, önleyen veya ortadan kaldıran herhangi bir madde" olarak açıklanmaya başlanmıştır (Halliwell, 1995a, 1995b; Halliwell ve Gutteridge, 1995). Antioksidanlarla ilgili yapılan biyolojik çalışmalar, doymamış yağların oksidasyonunu engelleme hedefiyle başlamıştır (German, 1999). Ancak antioksidanların biyokimyasal süreçler içerisindeki önemi A, C ve E vitaminlerinin birer antioksidan olarak tanımlanmasıyla anlaşılmıştır (Jacob, 1996). E vitamininin lipid peroksidasyonuna karşı bu kuvvetli etkisini inceleyen çalışma, antioksidanların reaktif türleri temizleyerek oksidatif reaksiyonları engelleyen koruyucu ajanlar olarak nitelendirilmesini sağlamış ve bu konu üzerine yeni çalışmalar yapılmasını teşvik etmiştir (Wolf, 2005).

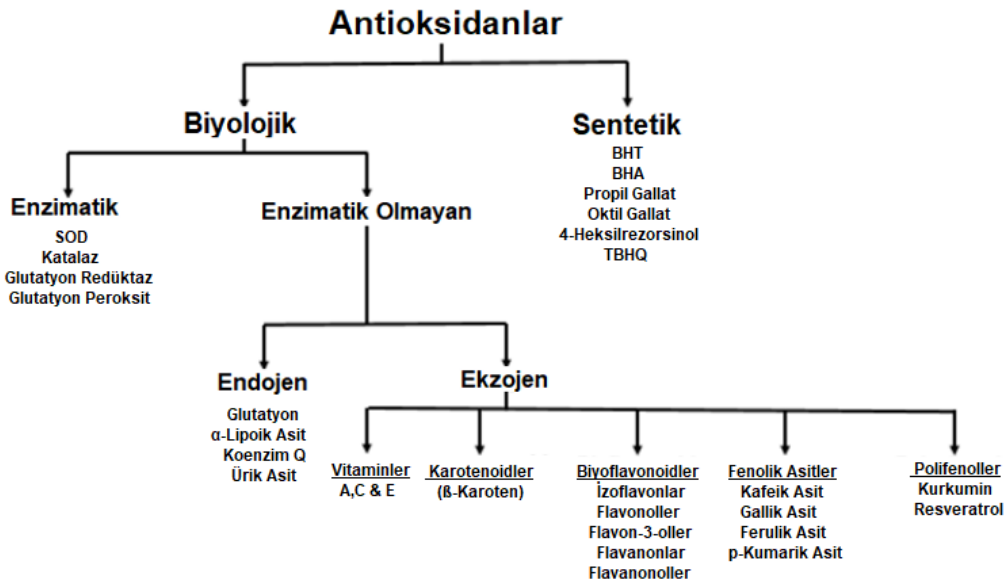
Antioksidanların hücre içerisindeki görevleri arasında enzim inhibitörü, elektron ve hidrojen donörü, singlet oksijen söndürücü, radikal temizleyici, peroksit ayrıştırıcı ve metal şelatlayıcı ajan olmaları yer almaktadır (Frei ve diğerleri, 1988).

Antioksidanların etki mekanizması farklı iki esas yöntem ile açıklanabilmektedir (Rice-Evans ve Diplock, 1993). İlki, antioksidanın hücre içinde bulunan serbest radikale bir elektron vermesiyle gerçekleşen zincir kırma mekanizmasıdır. İkincisi ise, zincir başlatıcı katalizörün baskılanması sonucu ROS/RNS oluşumunda görevli elemanların uzaklaştırılmasıyla gerçekleşir. Bunların yanı sıra metal iyonlarının şelatlanması, destek antioksidanların sisteme dahil edilmesi ve gen ekspresyonları üzerinde regülasyonların yapılması gibi yöntemlerle de etkinlik gösterebilirler (Krinsky, 1992).

Hücre sel savunmada antioksidanlar engelleyici, radikal temizleyici, onarıcı ve adaptasyon olmak üzere farklı seviyelerde etkinlik gösterirler. İlk görevi, direkt olarak serbest radikal oluşumunu inhibe eden engelleyicilikle birlikte hidroperoksitleri ve hidrojen peroksitleri alkol ve suya indirgemeleridir. İkinci olarak, mevcut aktif radikalleri temizleyerek zincir ilerleme reaksiyonlarını kırarlar. Bir diğeri, sitozol ve mitokondride konumlanan proteolitik enzimlerin oksidasyon sonucu değişmiş olan proteinleri tanınması ve onların yapısını bozarak ortamdaki uzaklaştırmasıdır. Aynı zamanda DNA onarım sistemleri içerisinde görev alan glikozilazlar ve nükleazlar ile oksidatif stresin DNA üzerinde oluşturduğu hasarı onarırlar. Son olarak da hücre içinde üretilen serbest radikale özel antioksidanın üretilmesini ve doğru hedefe yönlendirilmesini destekleyen adaptasyon yeteneği de söz edilebilir (Niki, 1993).

Doğal antioksidanlar kaynakları ve etki mekanizmaları gereğince enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır (Şekil 24). Enzimatik antioksidanlar biyokimyasal reaksiyonlar sırasında katalizör olarak görev alırlar. Enzimatik antioksidanlar

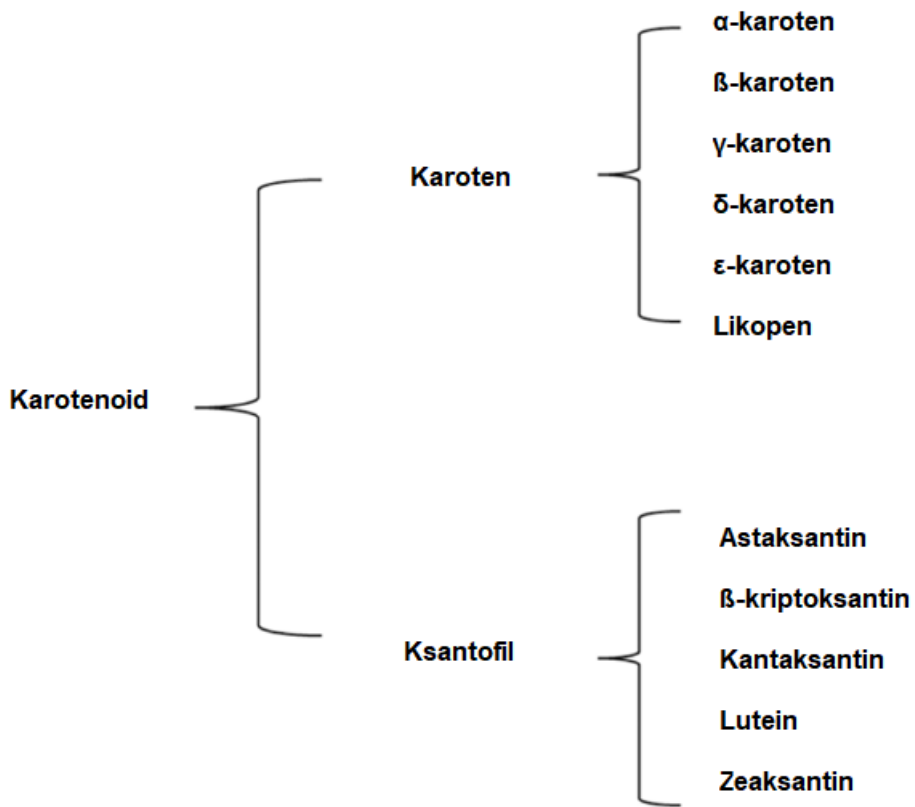
sahip oldukları metalik merkezler sayesinde, reaktif moleküllerin dengelenmesi için elektron transferi yaparken farklı değerlikler alabilirler. Böylelikle fazla ROS miktarını dengede tutarak hücresel yapıyı korurlar. SOD, katalaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz karşımıza en çok çıkan enzimatik endojen antioksidanlar arasında yer almaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise, direkt olarak reaktif türlerin kendileriyle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirmeye çalışır. Moleküler ağırlıkları nispeten daha düşük olan bu antioksidanların çalışma mekanizmaları çeşitlerine göre de değişiklik gösterebilmektedir. Endojen ve eksojen kaynaklı olarak ayrılabilen bu antioksidanlar da yine kendi aralarında çeşitli sınıflar halinde kategorize edilebilir. Glutatyon, koenzim Q, karotenoidler, polifenoller, fenolik asitler, bioflavonoidler ve A, C, E gibi vitaminler enzimatik olmayan antioksidanlar arasında yer almaktadır (Agarwal ve diğerleri, 2012).



Şekil 24. Antioksidanların sınıflandırılması (Kotha ve diğerleri, 2022b).

2.6.1. Astaksantin

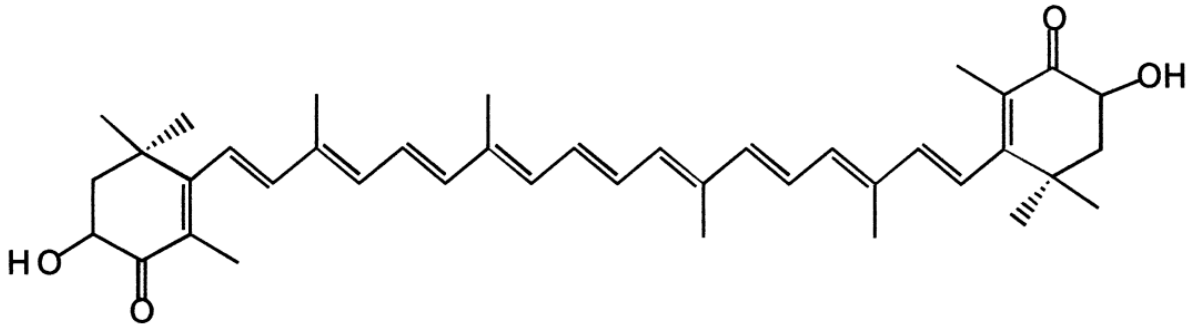
Astaksantin (AST), β -kriptoksantin, kantaksantin, lutein ve zeaksantin'in de dahil olduğu, ksantofil olarak adlandırılan bir karotenoid grubuna ait (Şekil 25) yağda çözünen kırmızı/turuncu bir pigmenttir (Hu ve diğerleri, 2018; Zheng ve diğerleri, 2013). Su ürünleri yetiştiriciliği, kozmetik, gıda ve ilaç endüstrisi gibi alanlarda sıkça kullanılan astaksantin fitoplankton, bakteri ve maya gibi mikroorganizmalar ile; karides, ıstakoz, alabalık, somon ve bazı kabuklular olmak üzere deniz canlılarından ekstrakte edilmektedir (Ambati ve diğerleri, 2014; Davinelli ve diğerleri, 2018; Yuan ve diğerleri, 2011).



Şekil 25. Karotenoidlerin sınıflandırılması (Si ve Zhu, 2022).

3,3'-dihidroksi- β,β' -karoten-4,4'-dion olarak da tanımlanan astaksantin, $C_{40}H_{52}O_4$ kapalı formülüne sahip olup moleküler ağırlığı 596,84 g/mol'dür. Astaksantin molekülü, iyonon

halkalarının uçlarında bulunan polar bölge sayesinde serbest radikalleri nötralize ederken, merkezinde ise 13 bağ yapmış polar olmayan bir bölgeye sahiptir (Şekil 26). Bu yapısı nedeniyle de yüksek enerjili elektronların ortamdan uzaklaştırılması daha kolay olabilmektedir. Bununla birlikte iyonon halkalarının uçlarındaki polar bölge astaksantin hücre zarından geçişini oldukça kolaylaştırır (Tume ve diğerleri, 2009). Aynı zamanda diğer antioksidanlarla kıyaslandığında yapısında oksijen bulunması ve lipofilik bir yapıda olması sebebiyle kan-beyin bariyerini aşabilir, merkezi sinir sisteminde koruyucu etkinlik gösterebilir (Tinkler ve diğerleri, 1994).

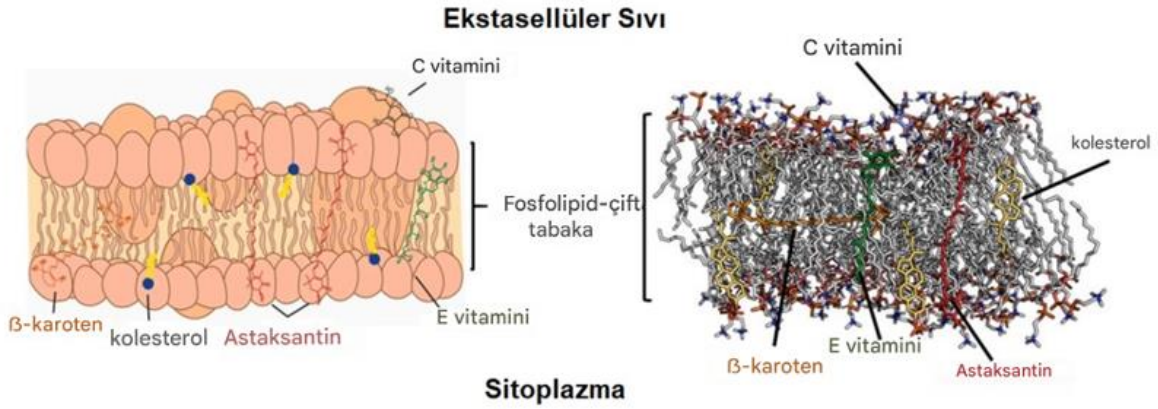


Şekil 26. Astaksantin'in kimyasal yapısı (Higuera-Ciapara ve diğerleri, 2006).

Astaksantin sentezinin doğada ilkin fitoplanktonlar ve algler tarafından gerçekleştiği bilinmektedir. Ancak daha sonra beslenme yoluyla kabuklular ve zooplanktonlarda birikmeye başlar ve besin zinciri ilerledikçe yüksek deniz canlılarına doğru geçiş yapar (Ambati ve diğerleri, 2014). Doğal astaksantin üretiminin en çok olduğu canlı ise *Haematococcus pluvialis* olarak bilinmekte olup, bu canlıdan ekstrakt elde etmek oldukça maliyetlidir. Bu sebeple günümüzde astaksantin eldesinin çoğunluğu sentetik yollarla gerçekleşmektedir. Ne var ki, sentetik astaksantin doğal formunun yalnızca yarısı kadar biyoaktivite göstermektedir (Capelli ve diğerleri, 2013; Fakhri ve diğerleri, 2018). Oysaki astaksantin'in radikal absorbans etkinliği açısından, E vitamini (α -tokoferol) gibi yaygın kullanıma sahip ve yapısal olarak iyi bilinen bir antioksidanla kıyaslandığında bile 100-500 kat daha fazla yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Kurashige ve diğerleri, 1990).

Karotenoid ailesine mensup diğer antioksidanlar gibi astaksantin de yağ asitlerinin yanında bağırsaklarda pasif difüzyon yoluyla emilir. Daha sonra safradan salgılanan asitle karışarak bağırsak içinde kümeler halini alır. Bağırsak mukozasında bulunan hücreler bu

kümeleri absorbe ederek şilomikronlarla birleştirir. Bu sayede karaciğere taşınan astaksantin, lipoproteinlerle özdeşleştirilerek hedef doku ve organlara gönderilir (Okada ve diğerleri, 2009; Zuluaga ve diğerleri, 2018). Hidrofilik ve lipofilik özellikleri bir arada barındıran astaksantin bu özelliği sayesinde hücre membranının iç ve dış yüzeyine aynı affinitede bağlanabilmektedir (Şekil 27). Böylelikle hücre yüzeyi ve çift tabakalı membranın iç kısmında bulunan serbest radikalleri aynı derecede etkisiz hale getirebilir. Ayrıca mitokondriyal redoksu ve işlevsel bütünlüğünü tamamen korur. Bu özelliği sayesinde β -karoten ve C vitamini gibi yalnızca membranın tek bir bölgesinde konumlanabilen antioksidanlara kıyasla oldukça eşsizdir (Yamashita, 2015).



Şekil 27. Hücre membranı üzerinde Astaksantin yerleşiminin gösterimi (Donoso ve diğerleri, 2021).

Astaksantin bulunduğu hücre içerisinde PI3K/Akt yolağını ve MAPK/ERK yolağını aktive etmektedir. Bahsedilen bu yolaklar birleşik halde bulunan KEAP1 ve Nrf2'nin ayrılmasına destek olur. Böylelikle nükleusa transfer edilen Nrf2, Nrf2 antioksidan yanıt elemanı (Nrf2-ARE) yolağını aktive ederek hücrede oksidatif strese karşı hem *in vitro* hem de *in vivo* koruma sağlar (Zarneshan ve diğerleri, 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

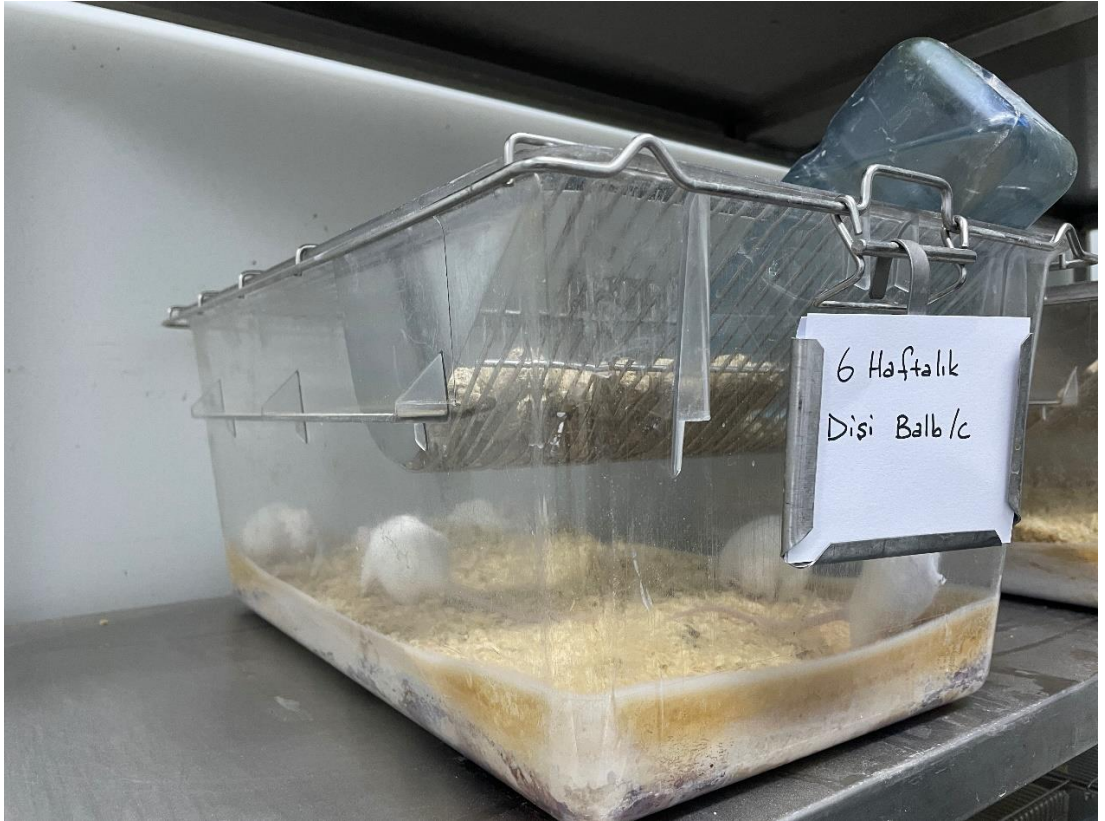
3.1.1. Cihazlar

Tablo 1. Deneyde kullanılan cihazlar.

Cihaz	Marka/Model	Menşei
Stereo Mikroskop	Zeiss / Stemi 508	Almanya
Floresan Mikroskop	Zeiss / Vert. A1	Almanya
Konfokal Mikroskop	Zeiss	Almanya
CO ₂ 'li İnkübatör	Nuve / EC160	Türkiye
Biyogüvenlik Kabini (II)	Biobase / BSC-1300IIA2-X	Çin
Otoklav	Nuve / NC40M	Türkiye
Buzdolabı	SEG	Türkiye
Su Banyosu	Isolab	Almanya
Hassas Terazı	Shimadzu / ATX224	Japonya
Vorteks	Isolab	Almanya
Sonikatör	Bandelin / Sonopuls	Almanya
Hot Plate	Jinyi / DB-H	Çin
Nanodrop	Nabi / Microdigital	Güney Kore
Real Time PCR	AB / StepOnePlus	ABD
pH Metre	Hanna Instruments / HI 2211	İtalya

3.1.2. Hayvan Materyali

Bu araştırma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki deney hayvanları bakım ve kullanım kurallarına bağlı kalınarak Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma dahilinde 50 adet dişi BALB/c fare kullanılmıştır. Bütün denekler standart laboratuvar diyeti ile beslenmiş olup, içme suyu isteklerine göre her zaman içebilecekleri şekilde (ad libitum) bulundurulmuştur. Denekler, her kafeste en fazla 6-8 hayvan bulunacak şekilde barındırılmıştır (Resim 1). Kafeslerde normal aktivitelerini yapabilen fareler $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, %50-70 nem ve 12 saat gece/gündüz olarak ayarlanmış odalarda tutulmuştur.



Resim 1. Çalışmada kullanılan deney hayvanları.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

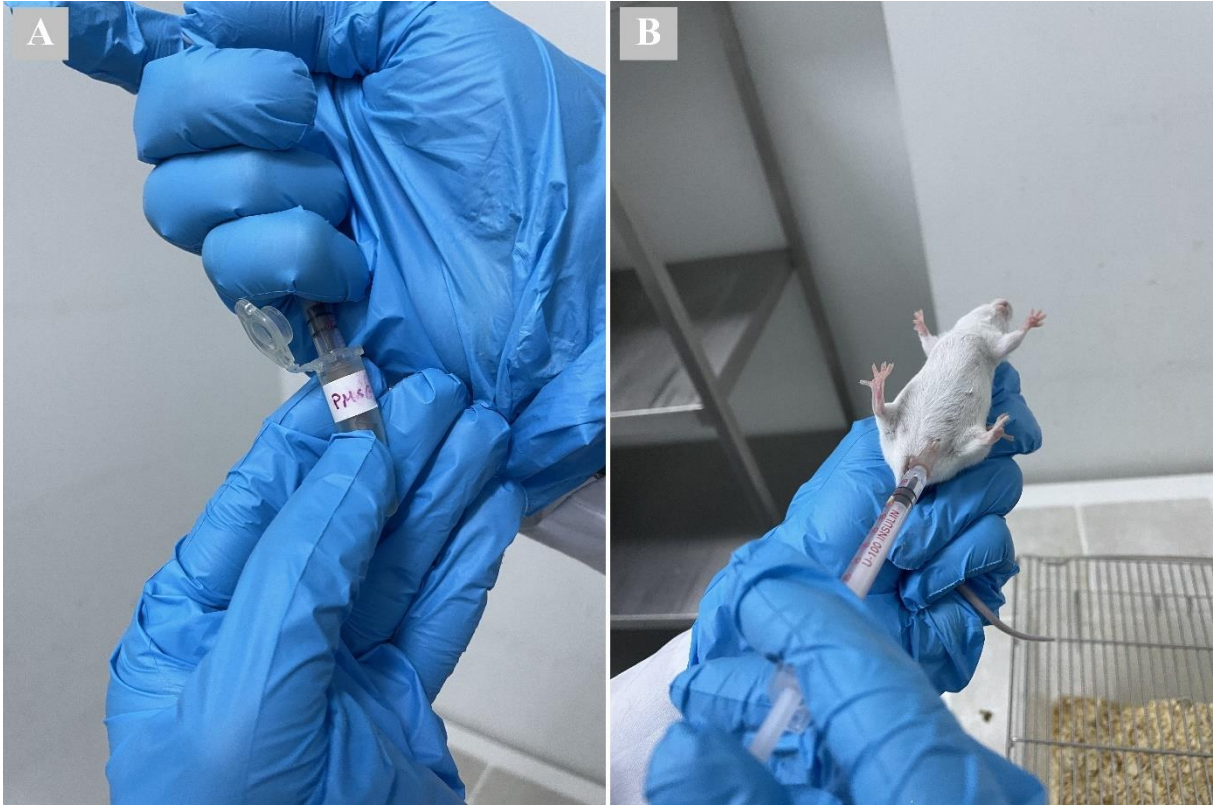
Tablo 2. Deneyde kullanılan kimyasal madde ve kitler.

Kimyasal Madde/Kit	Firma/Ürün Kodu	Kimyasal Madde/Kit	Firma/Ürün Kodu
MEM Alpha (1X)	Gibco, 32561-037	M2 Medium	Merck, M7167
Anti-α-Tubulin-FITC antibody	SIGMA F2168	Ticari Malathion	Agrobest
Astaxanthin	Yunbang, 472-61-7	Mitotracker CMXRos	ABP Biosciences, C042
BSA	Sigma, A7906	Paraformaldehyde	Emprove, 30525-89-4
Fluoromount-G, with DAPI	Invitrogen, 00-4959-52	PBS Tablets	VWR, E404
DCDHF-DA	Sigma, D6883	PMSG	Prospec, hor-272-b
DMSO	Serva, 39757.02	RNA Save	BI, 01-891-1B
FBS	Serana, R-FBSP-EU-025	Triton X-100	Amresco, 0694
Flush Buffer	CookMedical, K-SIFB-100	Tween-20	Sigma, P1379
FSH	Sigma, F4021	RT2 First Strand Kit	Qiagen
Goat Serum	Capricorn, GOA-1A	Rneasy Plus Micro Kit	Qiagen, 74034
Hyaluronidase	Sigma, H3506	FITC Annexin V	Biologend, 640914
Ketasol %10	Richter Pharma	Rompun %2 Ksilazin	Bayer
ITS	Gibco, 41400-045	SYBRGreen PCR Master Mix	Applied Biosystem

3.2. Yöntem

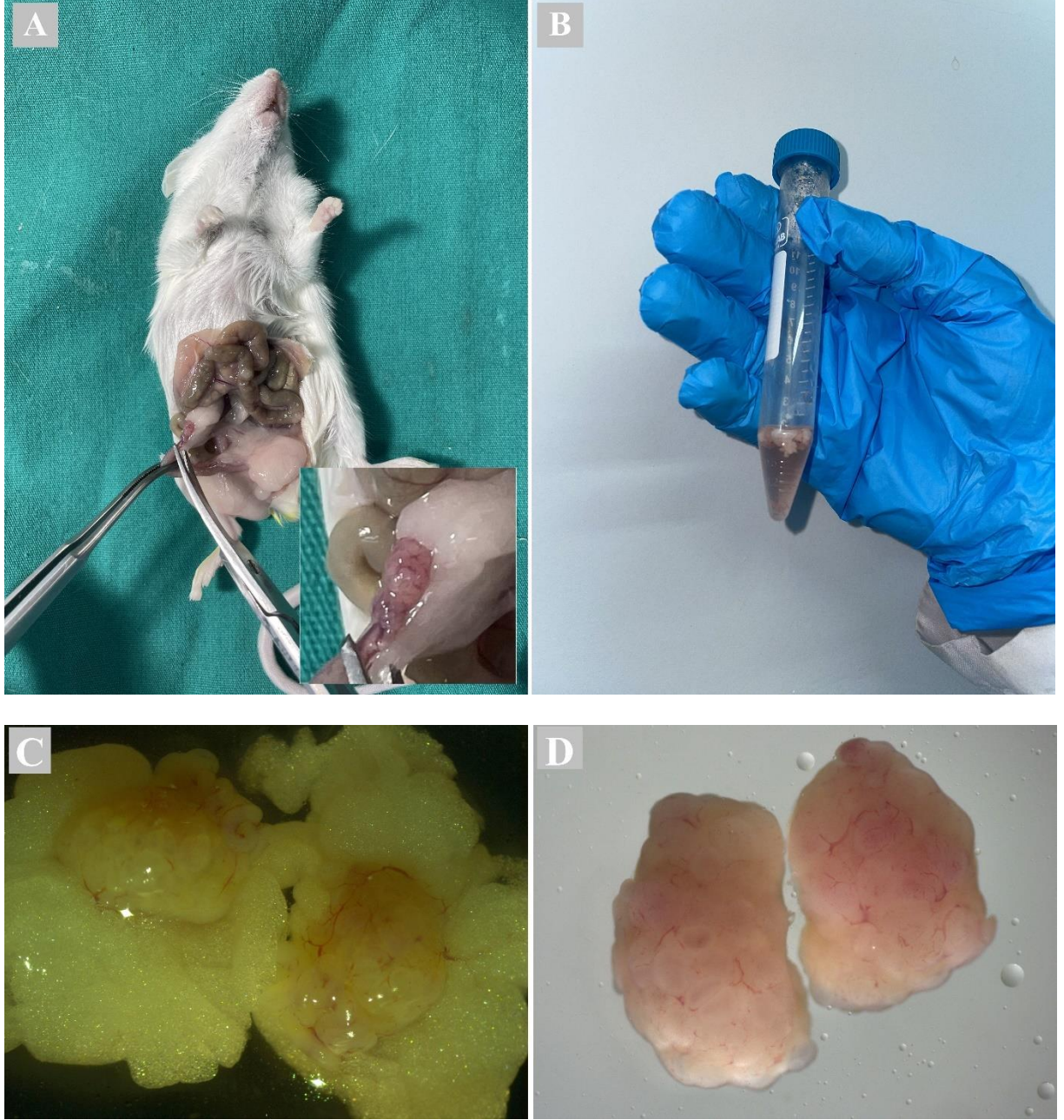
3.2.1. Deney Tasarımı

İmmatür oositler (Germinal vezikül/GV aşamasında), 10 IU (i.p.) Pregnant Mare's Serum (PMSG) enjekte edilmiş (Resim 2) farelerin ovaryumlarından elde edilmiştir.



Resim 2. 6-8 haftalık dişi farelere intraperitoneal PMSG enjeksiyonu.

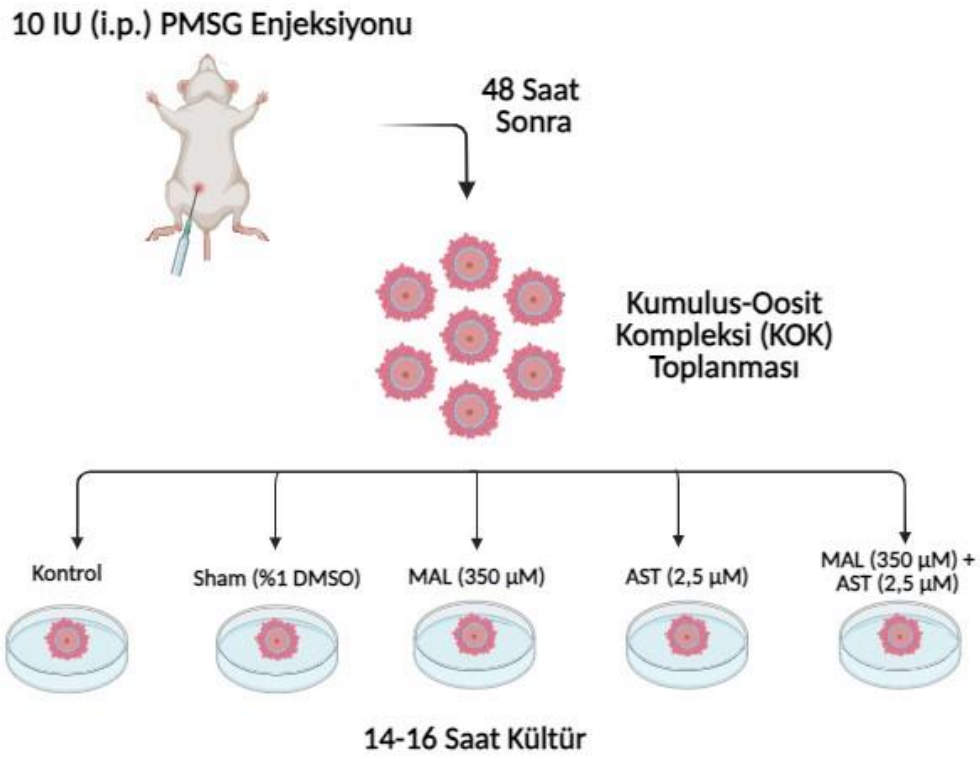
Ovaryumların cerrahi yöntem (laparotomi) ile eldesi (Resim 3), PMSG enjeksiyonundan 46-48 saat sonra, farelerin ketamin (150 mg/kg i.p) ve ksilazin (5 mg/kg i.p.) ile anestezi altına alınmasıyla gerçekleşmiştir. Operasyon sonrası dişi fareler, anestetik/trankilizan altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir.



Resim 3. Enjeksiyondan 48 saat sonra ovaryum eldesi (A-C) ve temizlenmesi (D).

50 adet 6-8 haftalık BALB/c dişi farelerden elde edilen KOK (cumulus oocyte complex-kumulus oosit kompleksi)'lar rastgele 5 eşit gruba (n=10) ayrılmıştır (Şekil 28). Gruplar;

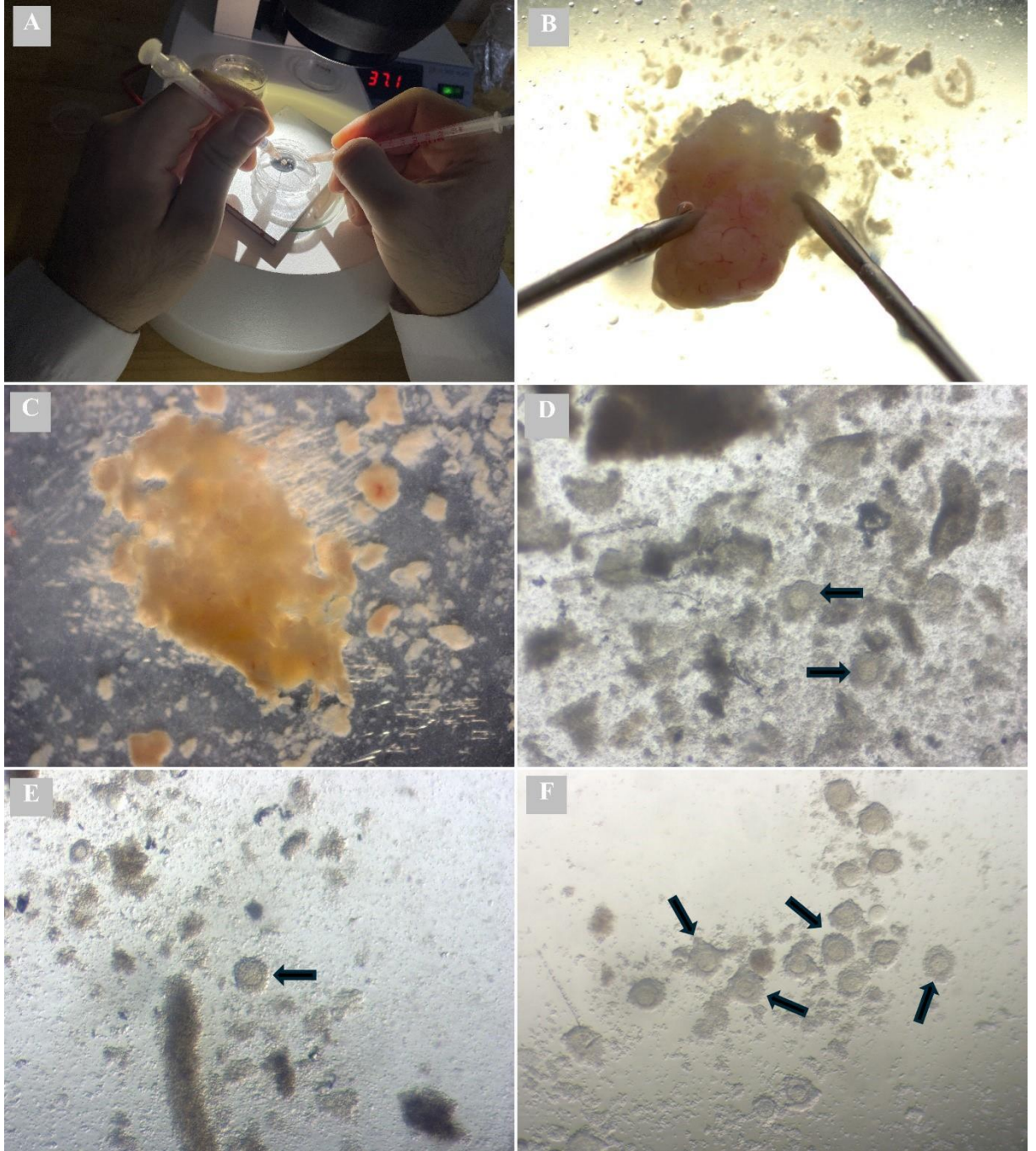
1. Hiçbir işlem görmemiş kontrol grubu (K),
2. Sadece DMSO ile inkübe edilecek sham grubu (S),
3. Sadece Malathion (MAL) ile inkübe edilecek grup (M),
4. Sadece Astaksantin (AST) ile inkübe edilecek grup (A) ve
5. MAL+AST ile birlikte inkübe edilecek grup (M+A).



Şekil 28. Deney tasarımının şematik gösterimi.

3.2.2. Oosit Eldesi ve *In Vitro* Matürasyon (IVM)

KOK'lar, temin edilen ovaryumlardan 23G iğne ve ağız pipeti yardımıyla stereo-mikroskop altında izole edilmiştir (Resim 4).



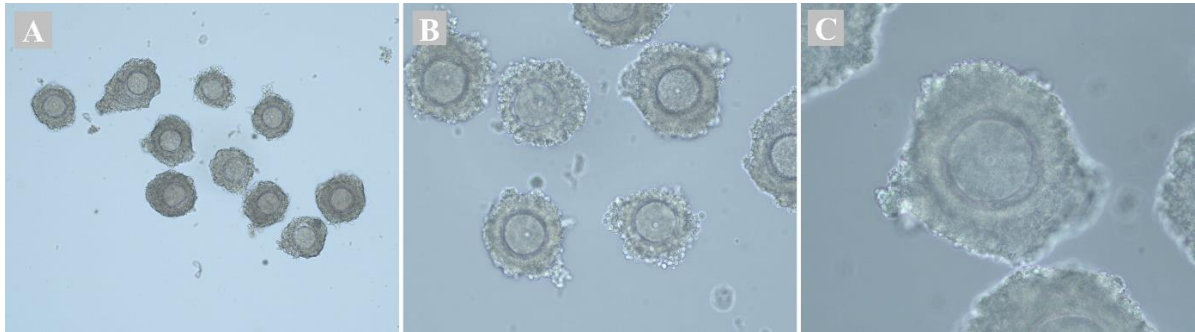
Resim 4. Ovaryum'un mekanik parçalanması (A-C) ve KOK eldesi (D-F). Ok: KOK.

KOK'lar daha önce bahsedilen çalışma gruplarına ait özel olarak hazırlanan medyumlarla oluşturulmuş kültür kaplarına alınarak (Resim 5 ve 6) 14-16 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmiştir.



Resim 5. KOK izolasyonu (A) ve ağız pipeti ile çalışma medyumlarına taşınması (B).

Oosit kültürü için kullanılan medyum temel olarak α -MEM + 3 mg/mL BSA + %10 FBS + 5 μ g/mL insülin + 5 μ g/mL transferin + 5 ng/mL selenyum + 10 mIU/mL yüksek oranda saflaştırılmış folikül uyarıcı hormon (FSH) ile hazırlanmıştır. 14-16 saat inkübasyonun sonunda KOK'lar hyaluronidaz enzimi içeren bir drop içerisine alınarak oositlerin kumulus hücrelerinden arındırılması sağlanmıştır. Daha sonra oosit matürasyon oranı morfolojik olarak invert mikroskop altında sınıflandırılarak belirlenmiştir (Lee ve diğerleri, 2018; Zeng ve diğerleri, 2018).

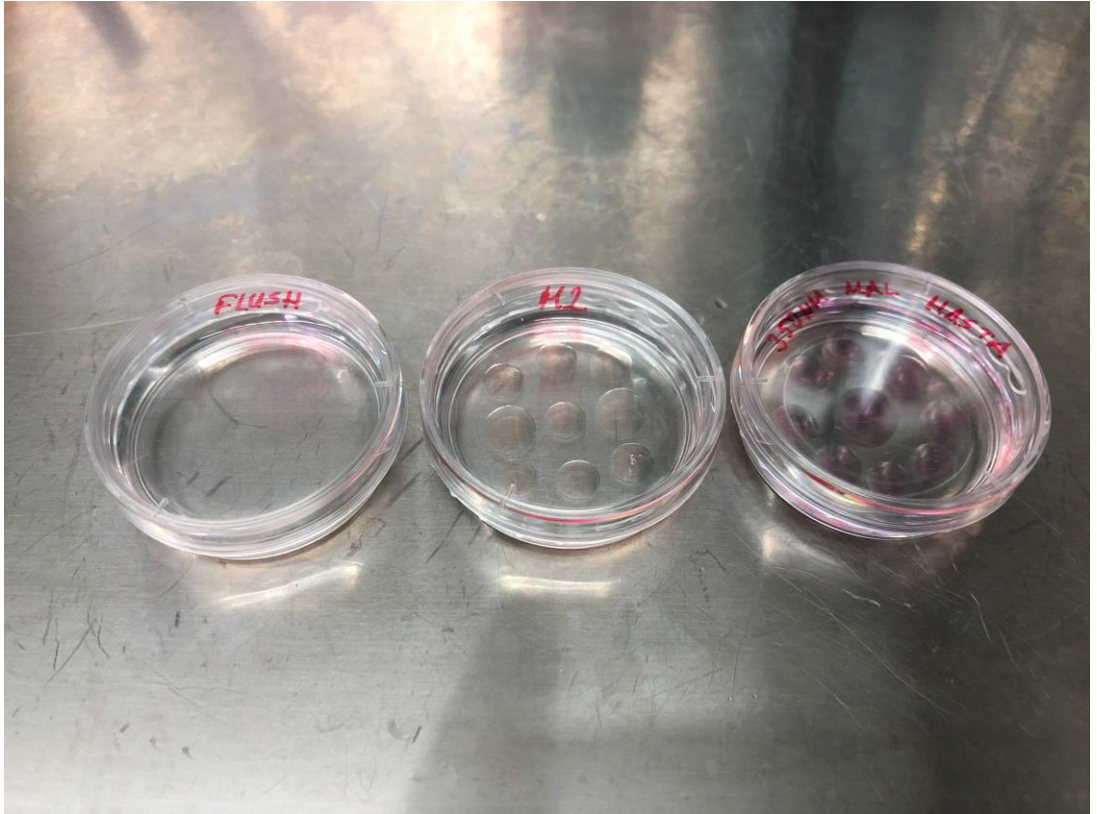


Resim 6. *In vitro* matürasyon kültürüne alınmış GV oosit içeren KOK'lar.

3.2.3. Malathion ve Astaksantin İçin Etkin Doz Belirleme

MAL'ın kumulus-oosit komplekslerinin (KOK) canlılığı ve oosit olgunlaşması üzerindeki etkisini değerlendirmek için %1 DMSO içeren 10 mM'lık bir MAL stok solüsyonu hazırlanmıştır. *In vitro* matürasyon (IVM) deneyleri için 0, 50, 100, 350, 500, 750 μ M MAL kullanılmış ve KOK'lar matürasyonları süresince insektisit MAL ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kontrol grubuna kıyasla, matürasyonu yaklaşık %50 oranında olumsuz etkileyen MAL etkin dozu 350 μ M olarak belirlenmiş olup (Resim 7) ilerdeki deney aşamaları bu belirlenen etkin doz ile devam etmiştir.

AST, %0.0005'lik konsantrasyonda DMSO içinde hazırlanan stok solüsyonundan farklı konsantrasyonlarda (1, 2.5, 5, 10 ve 20 μ M), malathion içeren IVM medyumunu içerisine eklenerek ön denemeler sonucunda etkin dozu 2,5 μ M olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde AST için belirlenen bu etkin doz da ilerdeki deney aşamalarında tekil olarak kullanılmıştır.



Resim 7. Deneyde kullanılan çalışma petrileri.

3.2.4. Mayotik İğ İplikleri ve Kromozomların Değerlendirilmesi

Kültür sonrası oositlerin iğ iplikleri ve kromozomları işaretlenerek immünfloresan mikroskopta görüntülenmiştir. Tubulin ve kromozom yapıları immünfloresan mikroskop altında çekilen fotoğraflarda normal (varil şeklinde iğ iplikleri ve kromozomlar iğ iplikleri üzerinde) ve anormal (kümelenmiş iğ iplikleri ve düzensiz, dağınık kromozomlar) olarak sınıflandırılmıştır.

Özetle; %4 paraformaldehit içeren PBS’de 15 dakika oda ısısında fikse edilen oositler %0,1 Tween-20 ve %0,1 BSA içeren PBS’de 3 kez yıkandıktan sonra oda ısısında %0,2 Triton X-100 ve %0,2 Tween 20 içeren PBS’de 30 dakika oda ısısında permeabilize edilmiştir. Daha sonra %1 BSA, %10 Goat Serum içeren PBS’de 1 saat oda ısısında bloklanıp gece boyu +4 °C’de primer antikor (α -tubulin FITC konjugeli) ile 1:200 konsantrasyonda inkübe edilmiştir. Ertesi gün oositler yıkama solüsyonunda 3 kez yıkanarak fazla antikordan arındırılmıştır. Sonrasında lam üzerine alınıp, kromozomların görünmesi için oda ısısında DAPI içeren kapatıcı medyum ve lamel ile kapatılarak (Resim 8) floresan mikroskopta incelenmiştir (Gumus ve diğerleri, 2023).



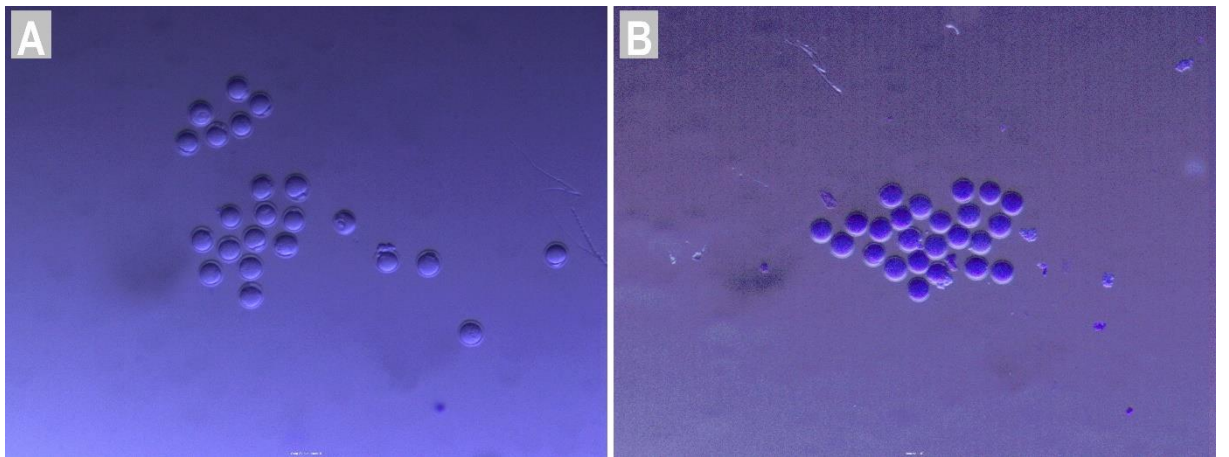
Resim 8. İğ ipliği ve kromozom incelemesi için hazırlanan preparatlar.

3.2.5. Hücre İçi ROS Seviyelerinin Tespiti

Hücre içi ROS seviyeleri 2,7-dichlorodihydrofluorescein di-acetate (DCDHF-DA) ile inkübe edilmesi sonrası belirlenmiştir. Oositler 15 dakika %0,3 BSA ve 10 mM DCDHF-DA içeren PBS’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, oositler %0,3 BSA içeren PBS’de üç kez yıkanmış ve floresan mikroskopta 40X büyütmede incelenmiştir. Fotoğraflanan oositlerin floresan yoğunluğu ImageJ yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Deneyler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3’er kez tekrarlanmıştır (Gumus ve diğerleri, 2023).

3.2.6. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Ölçülmesi

Mitokondriyal aktivite Mitotracker boya kiti ile inkübe edilmesi sonrası belirlenmiştir (Resim 9). Özetle, oositler %0,3 BSA ve 100 nM Mitotracker içeren PBS’de 30 dakika 37°C’de CO₂’li inkübatörde inkübe edilmiştir (Lee ve diğerleri, 2015). İnkübasyonun ardından, oositler %0,3 BSA içeren PBS’de üç kez yıkanmış ve lazer taramalı konfokal mikroskopta 40X büyütmede incelenmiştir. Fotoğraflanan oositlerin floresan yoğunluğu ImageJ yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Deneyler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3’er kez tekrarlanmıştır.



Resim 9. MII Oositlerin mitotracker ile inkübasyonu öncesi (A) ve sonrası (B).

3.2.7. Apoptoz'un Değerlendirilmesi

Gruplar arasında oositlerde izlenen apoptozis, Annexin V-FITC Apoptoz kiti kullanılarak floresan işaretleme sonrasında belirlenmiştir. Özetle, KOK inkübasyonu sonrasında denudasyon işlemi gerçekleştirilerek temizlenen oositler, yıkama sonrasında 5 µl annexin V-FITC içeren 200 µl'lik tamponda 15 dk oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, oositler uygun dalga boyunda floresan mikroskopta görüntülenerek gruplara ait annexin-V pozitif oosit yüzdesi belirlenmiştir. Deneyler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3'er kez tekrarlanmıştır (W. Li vd., 2019).

3.2.8. ERK1/2 Fosforilasyonu Floresan Yoğunluğunun İncelenmesi

MAL maruziyeti ve AST takviyesinin kumulus hücrelerinde eksprese edilen ERK1/2'nin fosforilasyon yoluyla aktivasyonunu değerlendirmek amacıyla immünfloresan mikroskopta yoğunluk incelemesi yapılmıştır. KOK'lar, %4 paraformaldehit içeren PBS ile 15 dakika oda sıcaklığında fikse edilmiş ve ardından %0,1 Tween-20 ve %0,1 BSA içeren PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Hücreler, %0,2 Triton X-100 ve %0,2 Tween-20 içeren PBS'de 30 dakika oda sıcaklığında permeabilize edilmiştir. Bloklama, %1 BSA ve %10 Goat Serum içeren PBS'de 1 saat oda sıcaklığında yapılmıştır. Sonrasında, hücreler 2 saat boyunca yine oda sıcaklığında 1:100 konsantrasyonda primer antikorlar (ERK1/2 ve pERK1/2) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler, yıkama solüsyonunda 3 kez yıkanarak fazla antikordan arındırılmıştır. Hücreler, 2 saat boyunca 37°C'de 1:2000 oranında sekonder antikor (Goat Anti-Rabbit FITC) ile inkübe edilmiş, ardından kromozomları görüntülemek için oda sıcaklığında lam üzerine alınarak DAPI içeren kapatıcı medyum ile kapatılmış ve floresan mikroskopta incelenmiştir (Gumus ve diğerleri, 2023).

3.2.9. ERK1/2 İlişkili Gen İfadelerinin qPCR ile Belirlenmesi

Toplam RNA izolasyonu, her grupta 20-25 KOK olacak şekilde havuzlanan KOK'larından, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Toplam RNA, üretici firmanın protokolüne uygun

şekilde RT2 First Strand Kit (Qiagen) kullanılarak tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) geri dönüştürüldü.

Amplifikasyon, SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystem) kullanılarak ABI StepOne Plus tespit sistemi ile gerçekleştirildi. Primerler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Reaksiyon koşulları şu şekildeydi: 95 °C'de 1 dakika, ardından 40 döngü boyunca 95 °C'de 10 saniye, 58 °C'de 30 saniye ve 70 °C'de 30 saniye.

Gen ekspresyon düzeyleri, StepOne yazılım sürüm 2.3 ile $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak analiz edildi. GAPDH, endojen kontrol olarak kullanıldı ve her reaksiyon üç kez tekrarlandı (Gumus ve diğerleri, 2018).

Tablo 3. Deneyde kullanılan primer baz dizileri.

Primer	Baz Dizisi 5'-3'
HAS2	F: GGGCGAAGCGTGGATTATGT
	R: TATCTCACGCTGCTGAGGAAG
PTX3	F: GTGGGTGGAAAGGAGAACAA
	R: GGCCAATCTGTAGGAGTCCA
PTGS2	F: CCCGGACTGGATTCTATGGTG
	R: CCTTGAAGTGGGTCAGGATGT
GAPDH	F: GAGAAACCTGCCAAGTATG
	R: GGAGTTGCTGTTGAAGTC

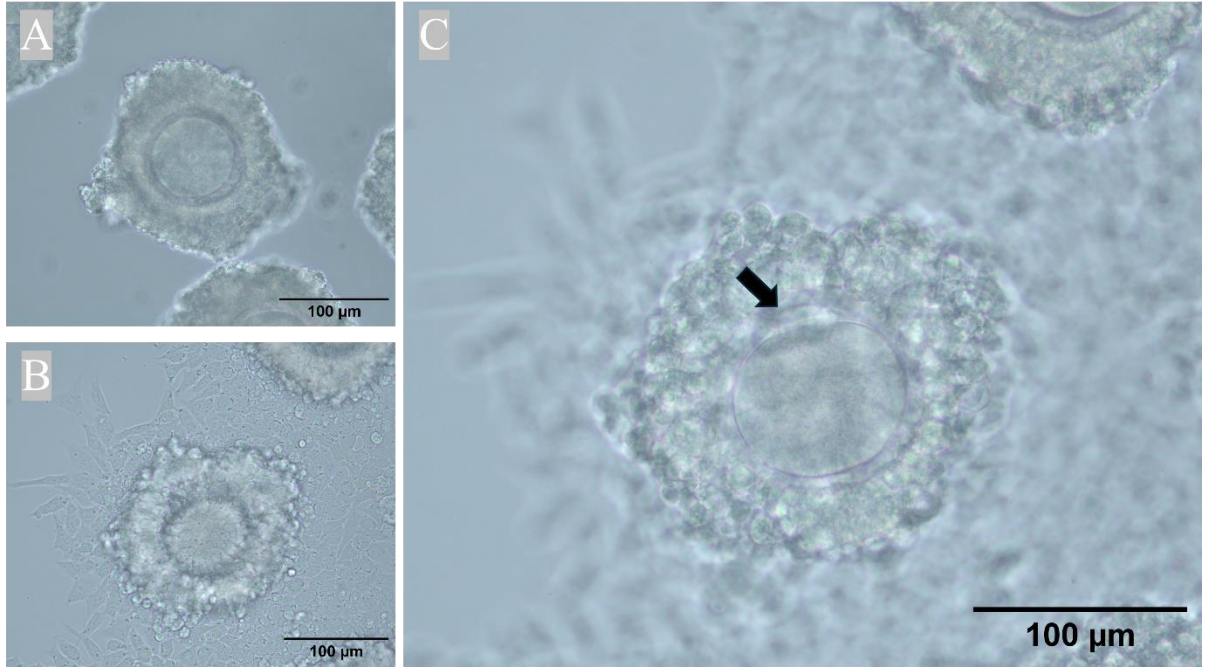
3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme

Sürekli değişkenlerin normalliğini doğrulamak için Kolmogorov-Smirnov testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmiş olup tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc analiz için Tukey testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için 0,05'ten küçük bir p değeri kullanılmıştır. Tüm analizler bilgisayarlı yazılım (SPSS Inc., ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca grafikler GraphPad PRISM 6.0 kullanılarak tasarlanmıştır.

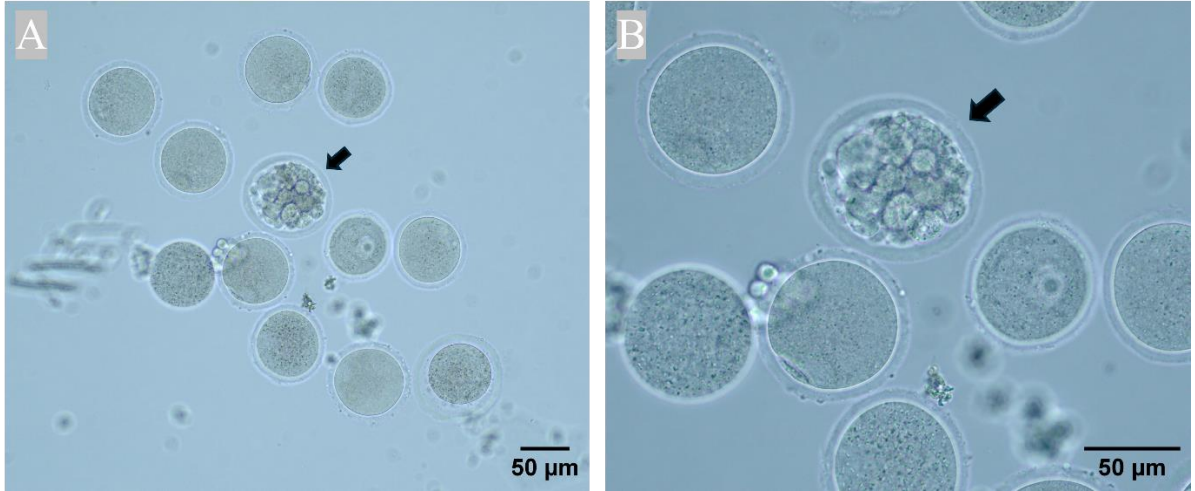
4. BULGULAR

4.1. Mayotik Matürasyon Oranları

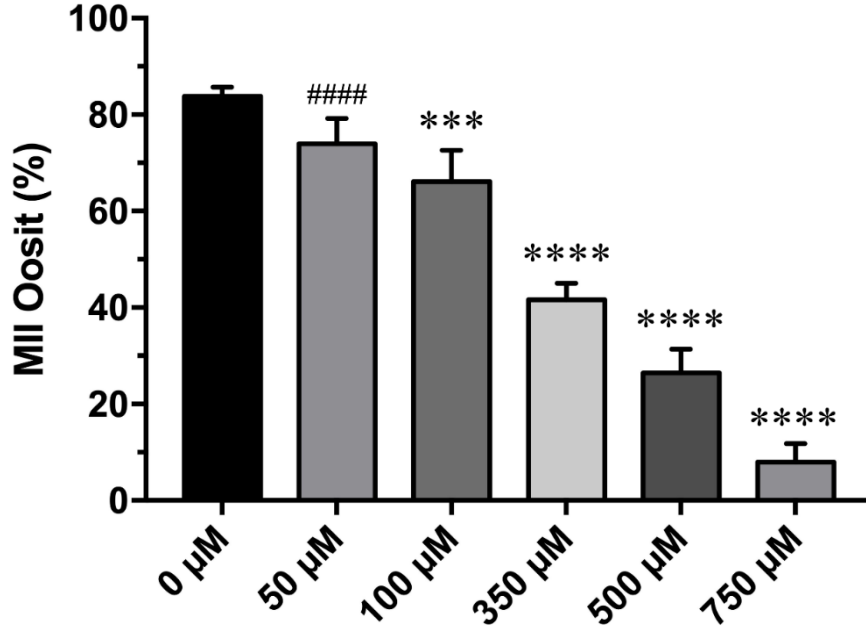
İlk olarak, *in vitro* koşullarda MAL maruziyetinin fare oositlerinde mayotik ilerleme üzerindeki toksik etkisini test ettik. Bu amaçla kültür ortamına, artan MAL konsantrasyonları (50, 100, 350, 500, 750 μ M) eklenerek ilk polar cisimciği ekstrüzyon oranı tespit edildi (Şekil 29). Şekil 31'de gösterildiği gibi, kontrol, sham ve astaksantin ile muamele edilen gruplarda (%83,8 $\pm$ 1,9 n=111; %82,5 $\pm$ 2,2, n=97; %87,5 $\pm$ 3,4 n=96, P <0.05, sırasıyla) çoğu oosit, ilk polar cisimciği ile birlikte metafaz II (MII) aşamasına ulaştı (Resim 10). Buna karşılık, malathion maruziyetinin birinci polar cisimcik ekstrüzyon oranını doza bağımlı bir şekilde azalttığı (Resim 11) gözlemlendi (Şekil 29; 50 μ M: %73,9 $\pm$ 5,2, n =96; 100 μ M: %66,1 $\pm$ 6,5, n = 104; 350 μ M: %41,7 $\pm$ 3,4, n = 96; 500 μ M: %26,5 $\pm$ 4,9, n = 102; 750 μ M: %7,9 $\pm$ 3,8, n = 81, P <0.05, sırasıyla). Bu sonuçlar, malathion'un fare oositlerinin olgunlaşmasını doz ile orantılı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Bu bulgulara dayanarak, sonraki deneyler için 350 μ M malathion seçildi. Malathion'a maruz kalan oositlerde astaksantin'in mayotik olgunlaşmayı iyileştirip iyileştirmediğini araştırmak için, 350 μ M malathion ile muamele edilen medyuma sırasıyla 1, 2.5, 5, 10 ve 20 μ M astaksantin eklendi (Şekil 30; 1 μ M: %66,4 $\pm$ 3,5, n = 90; 2.5 μ M: 75,5 $\pm$ 5,7, n = 83; 5 μ M: 74,7 $\pm$ 1, n =95; 10 μ M: 71,2 $\pm$ 1,261, n = 87; 20 μ M: 70,7 $\pm$ 1,4, n = 84, P <0.05, sırasıyla). Bu sonuçlara göre, sonraki deneyler için kontrol grubuna en yakın matürasyon oranını veren 2.5 μ M astaksantin dozu seçildi (Resim 12). 2,5 μ M üzeri astaksantin konsantrasyonları, doz artışına paralel olarak malathion grubunda oosit matürasyonunu az da olsa düşürdü. Ayrıca, tüm ölçülen parametreler açısından kontrol ve sham çözücü grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.



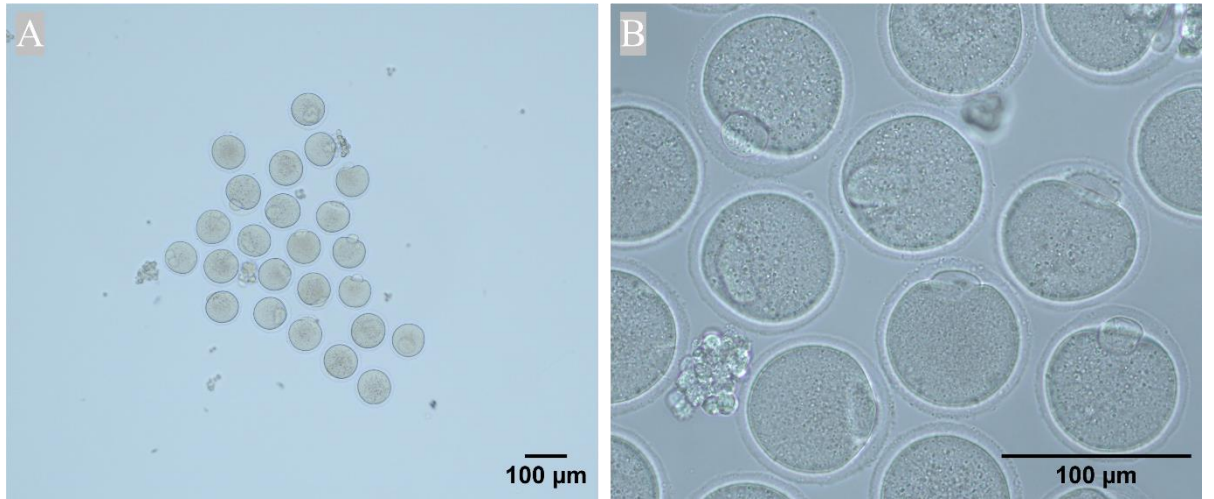
Resim 10. İnkübasyon öncesi (A) ve sonrası (B-C) kumulus oosit kompleksi (40X, Ok: birinci kutup hücresi).



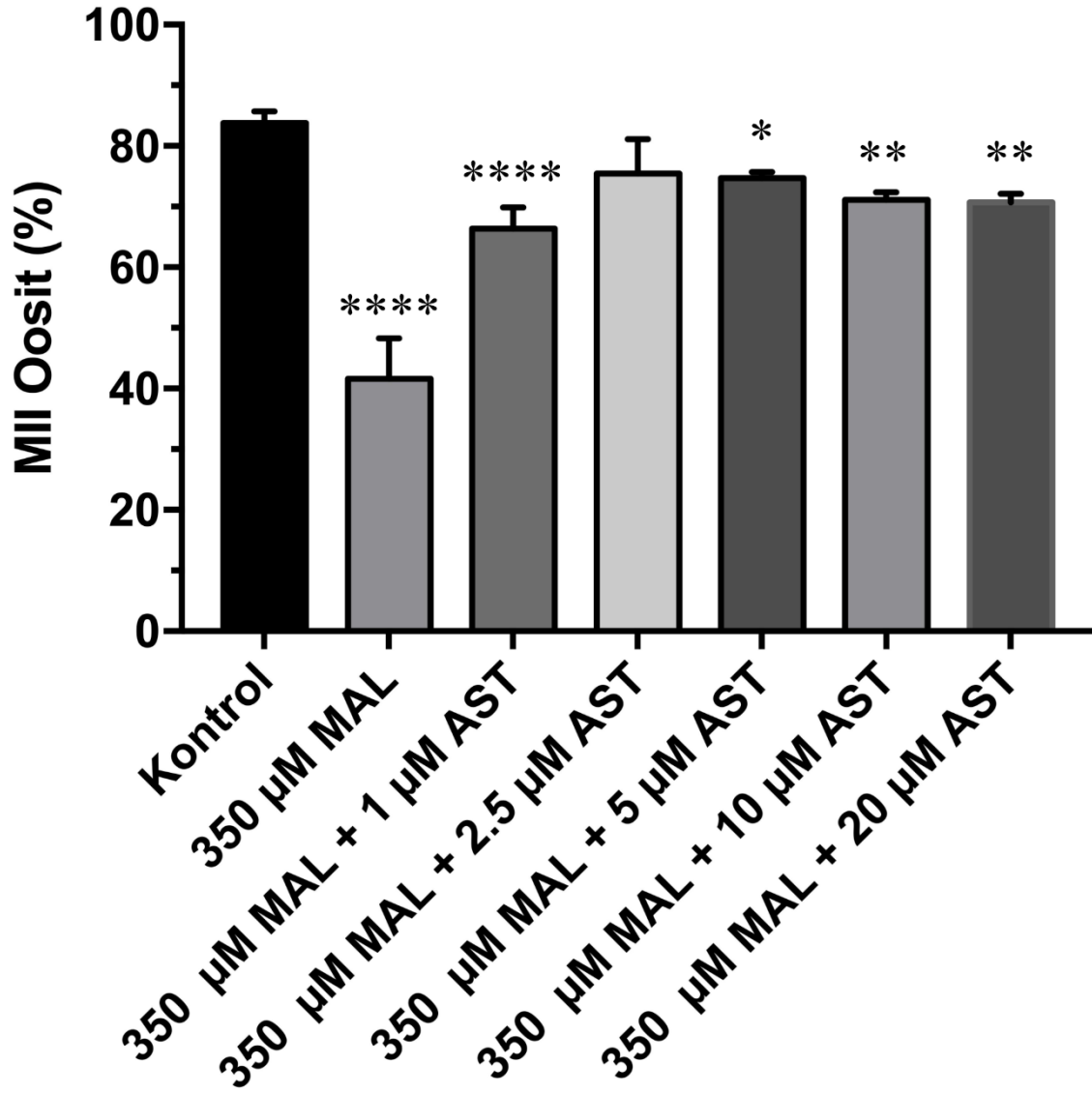
Resim 11. Malathion maruziyeti sonrası oositlerin 20X (A) ve 40X (B) büyütmede mikrografı (Ok: Zona pellucida içinde apoptoz'a uğramış oosit).



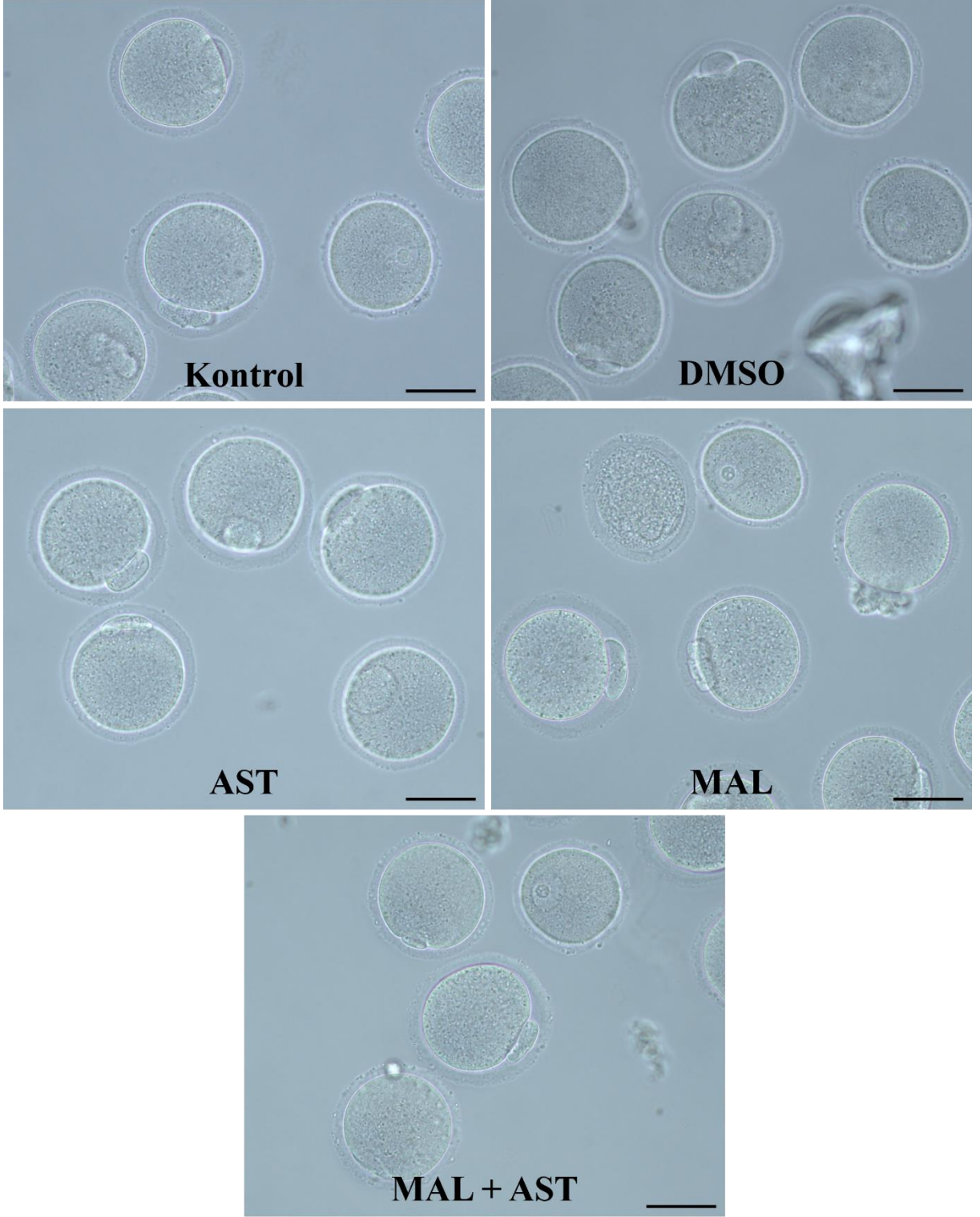
Şekil 29. Artan MAL konsantrasyonları ile elde edilen matürasyon oranları grafiği. Tüm veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. *** ve ****, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,001$ ve $P < 0,0001$, sırasıyla). ####, 350 μ M, 500 μ M, 750 μ M MAL gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,0001$)



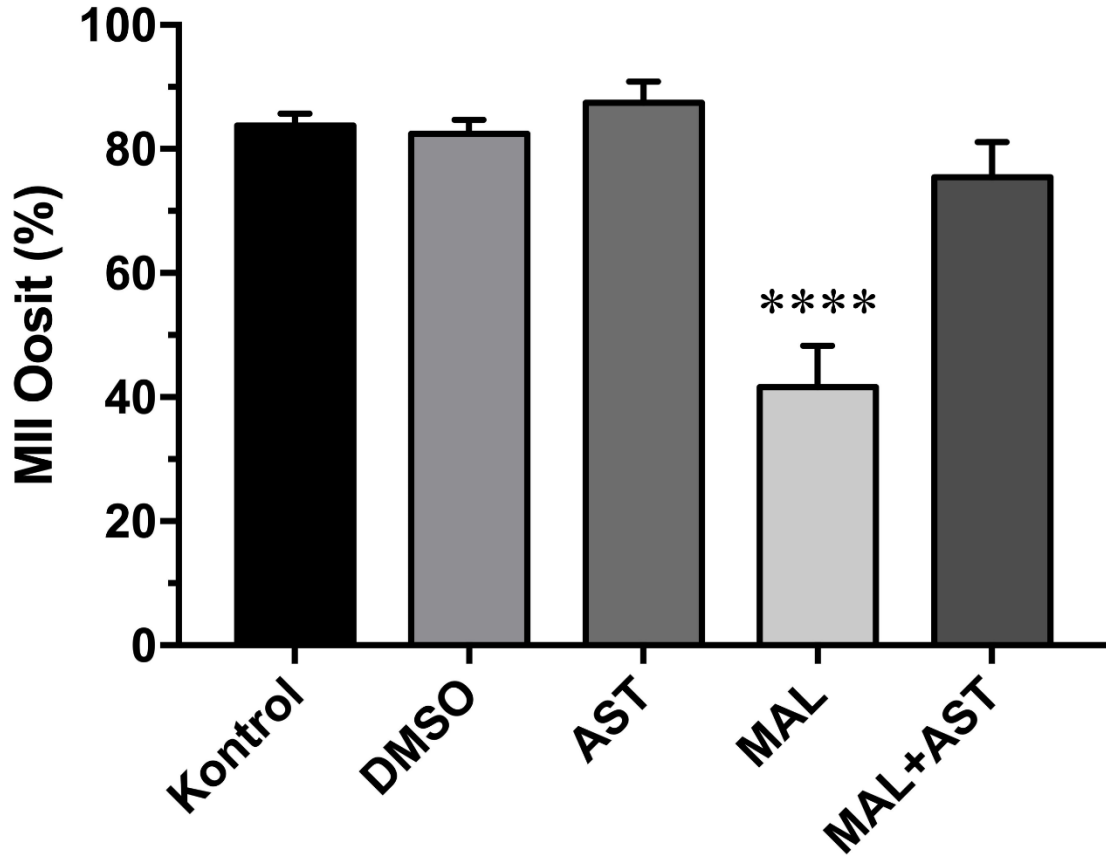
Resim 12. Astaksantin takviyesi sonrası oositlerin 10X (A) ve 40X (B) büyütmede mikrofrafı.



Şekil 30. MAL'a maruz kalan oositlerde farklı konsantrasyonlarda AST dozlarına bağlı matürasyon oranları grafiği. Tüm veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. *, ** ve ****, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,001$).



Resim 13. Deney gruplarına ait IVF sonrası oositler (40X, Scale Bar: 50 μ m).

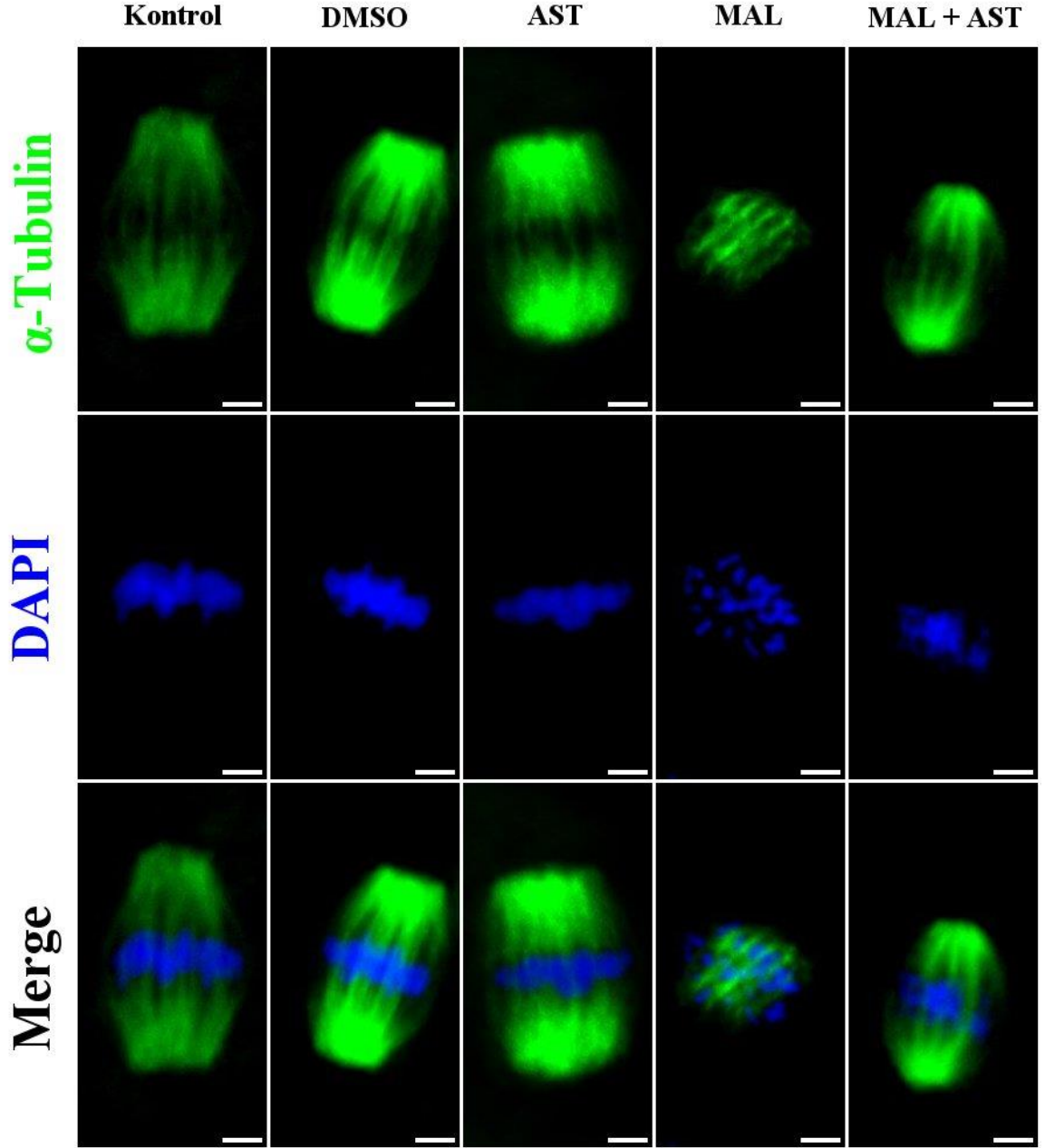


Şekil 31. Deney gruplarına ait MII oosit oranları grafiği. Tüm veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. ****, kontrol, DMSO, AST ve MAL+AST gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,0001$).

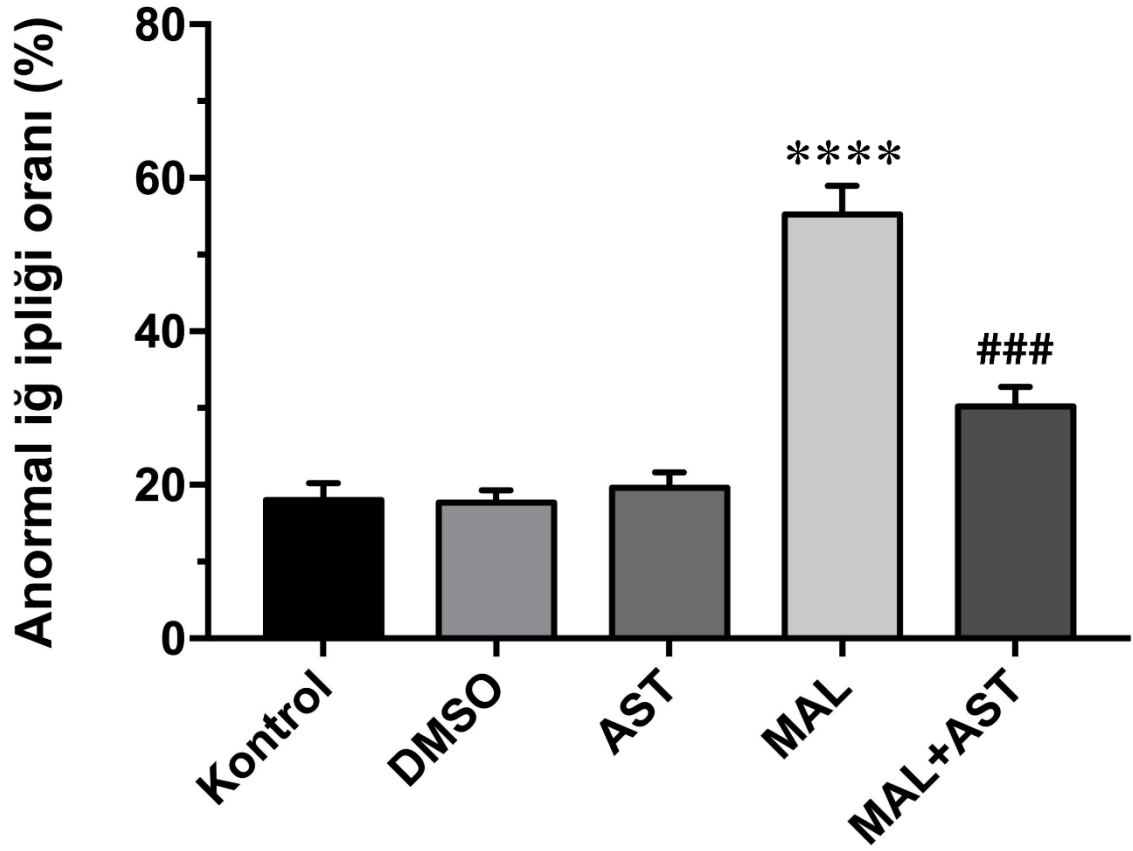
4.2. Mayotik İğ İplikleri ve Kromozomlar

Daha sonra, *in vitro* koşullarda malathion maruziyetinden sonra MII aşamasındaki oositlerde mayotik olgunlaşmanın başarısıyla yakından ilişkili olan iğ ipliği organizasyonunu araştırdık. Resim 14'te gösterildiği gibi, kontrol grubundaki oositlerin çoğu tipik bir varil şeklinde iğ ipliklerine ve ekvatorial plak üzerinde hizalanmış kromozomlara sahipti. Malathion maruziyeti kontrol, sham ve astaksantin ile muamele edilen gruplara kıyasla kusurlu iğ ipliklerinin oranını önemli ölçüde artırdı (Şekil 32; $55,2 \pm 3,7$, $n=114$; $18 \pm 2,2$, $n=83$; $17,7 \pm 1,6$, $n=93$; $19,7 \pm 1,9$, $n=82$, $P < 0,05$, sırasıyla). Astaksantin ise, malathion maruziyetinden sonra kusurlu iğ ipliklerinin oranını önemli ölçüde azalttı (Şekil 32; $30,3 \pm 2,5$, $n=107$, $P < 0,05$). Bununla birlikte, malathion ve astaksantin'in birlikte kullanıldığı tedavi

grubundaki anormal iğ ipliği oranlarının, malathion grubuna kıyasla önemli ölçüde daha düşük, ancak kontrol, sham ve sadece astaksantin ile muamele edilen gruptan daha yüksek olduğunu gösterdi.



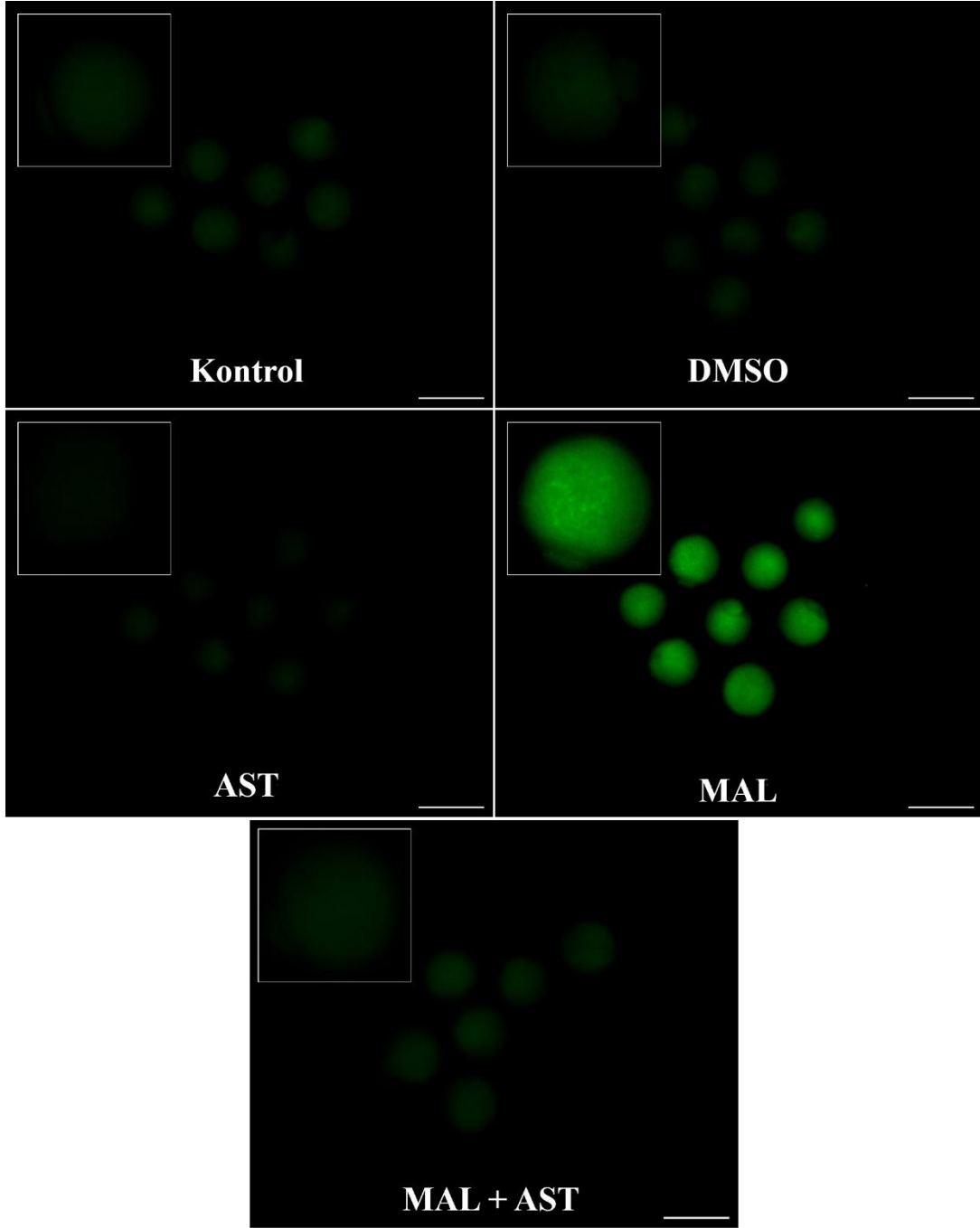
Resim 14. Deney gruplarına ait iğ ipliği morfolojileri ve kromozomların immünfloresan gösterimi (Scale bar: 5 μ m).



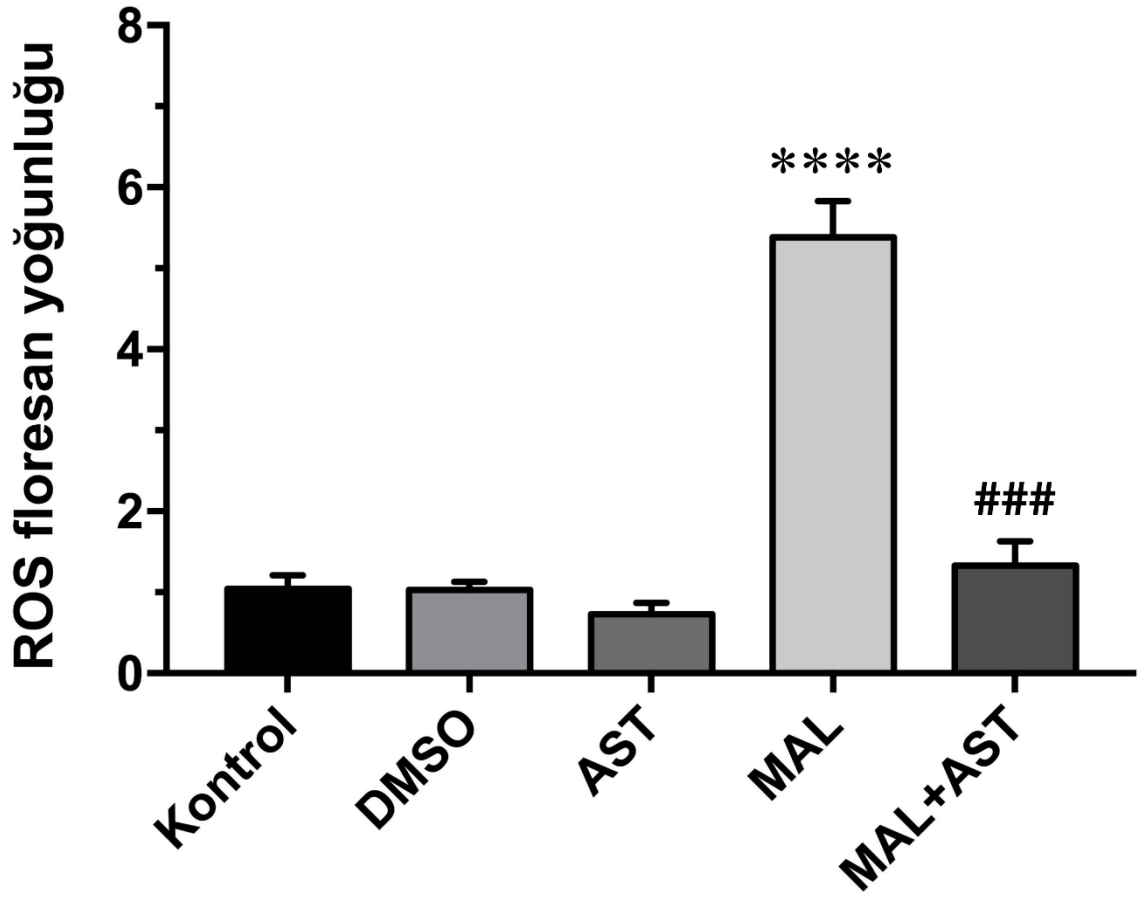
Şekil 32. Deney gruplarına ait anormal iğ ipliği oranları grafiği. Tüm veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. ****, kontrol, DMSO, AST ve MAL+AST gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,0001$). ###, kontrol, DMSO ve AST gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,0001$).

4.3. Hücre İçi ROS Seviyeleri

Resim 15'te gösterildiği gibi, *in vitro* deneylerde malathion gruplarındaki ROS seviyeleri, kontrol, sham ve sadece astaksantin'in kullanıldığı gruplara kıyasla önemli ölçüde yüksekti (Şekil 33; $5,4 \pm 0,4$, $n=68$; $1 \pm 0,2$, $n=57$; $1 \pm 0,1$, $n=63$; $0,7 \pm 0,1$, $n=55$, $P < 0,05$, sırasıyla). Malathion ve astaksantin'in birlikte kullanıldığı tedavi grubundaki ROS seviyeleri, malathion grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldı (Şekil 33; $1,3 \pm 0,3$, $n=64$, $P < 0,05$). Ancak kontrol, sham, sadece astaksantin ve malathion ile astaksantin'in birlikte kullanıldığı gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.



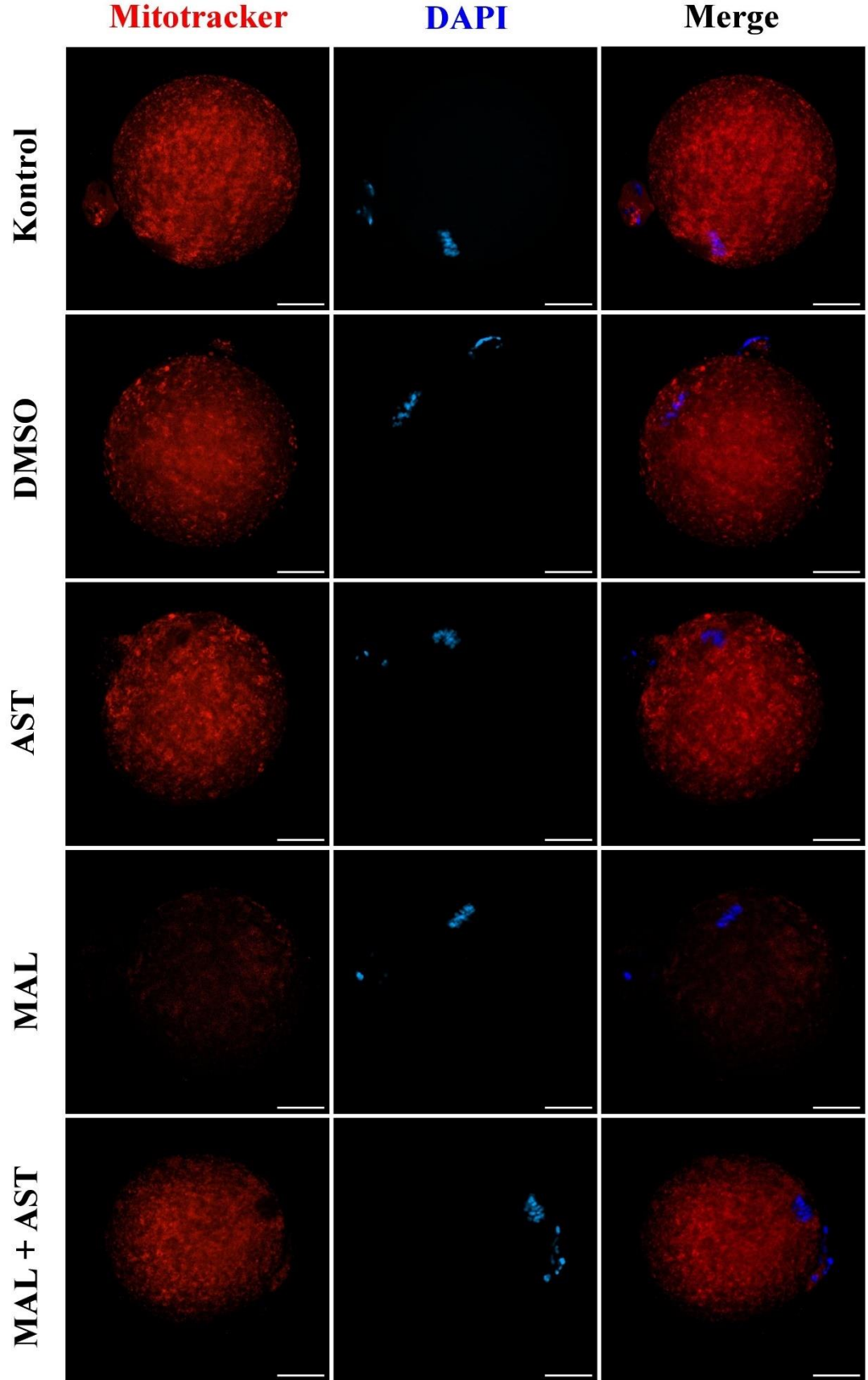
Resim 15. Deney gruplarına ait ROS yoğunluklarının floresan mikroskop gösterimi (20X, Scale Bar: 100 μm).



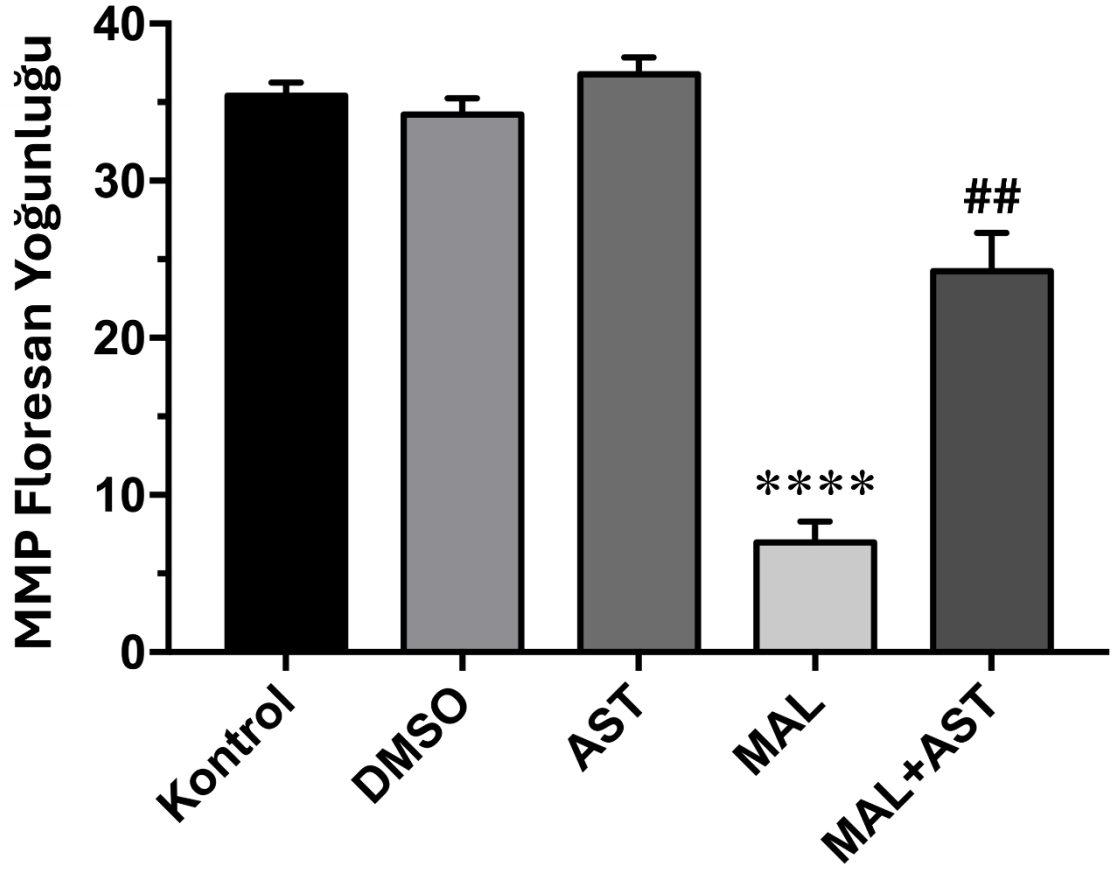
Şekil 33. Deney gruplarına ait ROS floresan yoğunlukları grafiği. Tüm veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. *****, kontrol, DMSO, AST ve MAL+AST gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,0001$). ###, AST grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,001$).

4.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Mitokondriler birçok hücrel süreçte rol oynar ve mitokondriyal disfonksiyonlar çeşitli hücrel stres ve hastalıklarla ilişkilidir. Bu çalışmada, mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$), mitokondriye özgü Mitotracker CMXROS ile boyanarak değerlendirildi. Resim 16'da görüldüğü üzere Malathion maruziyeti, floresans yoğunluğunu kontrol, sham ve sadece astaksantin gruplarına kıyasla azaltmıştır (Şekil 34; 6.01 ± 1.8 , n=63; 35.43 ± 3.1 , n=61; 34.76 ± 3 , n=56; 36.64 ± 3.2 , n=59, $P < 0.05$, sırasıyla). Ancak, malathion ve astaksantin'in birlikte kullanıldığı tedavi grubundaki kırmızı floresans yoğunluğu, malathion grubuna kıyasla önemli ölçüde arttı (Şekil 34; 24.39 ± 3.5 , n=56, $P < 0.05$).



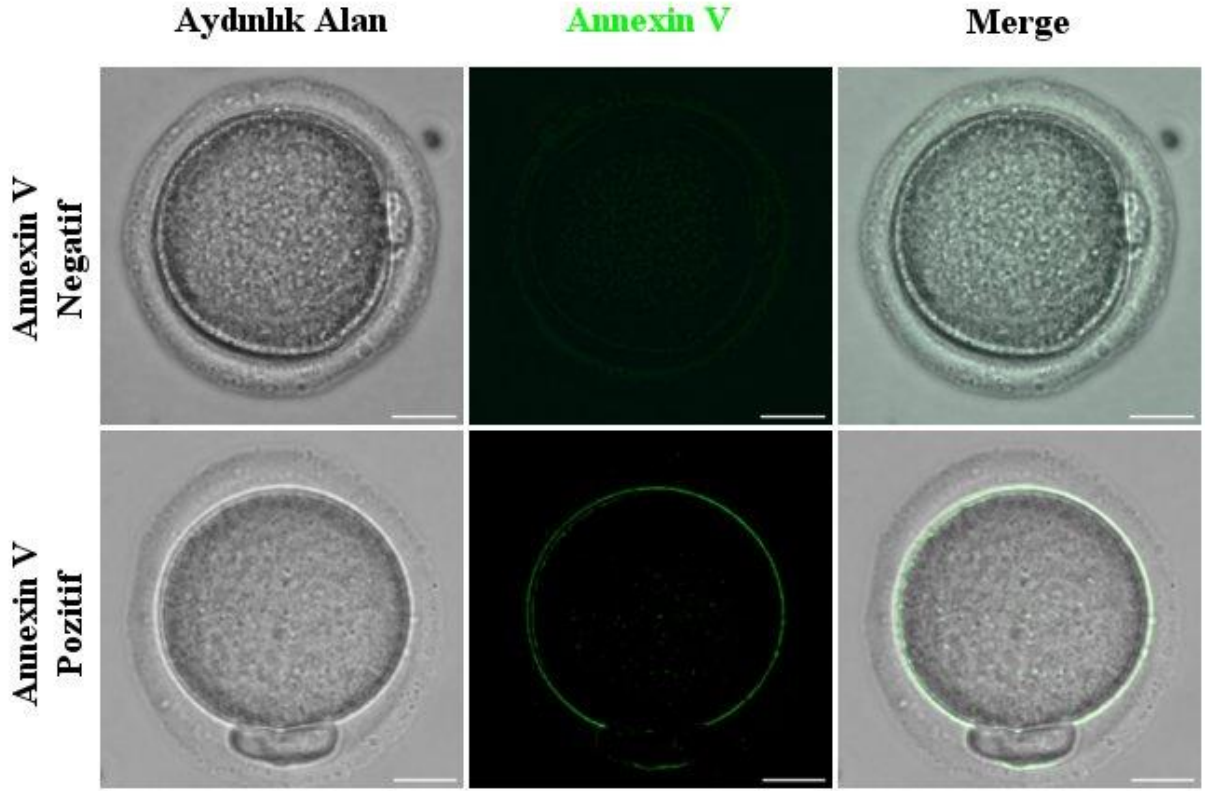
Resim 16. Deney gruplarına ait MMP'nin konfokal mikroskop görüntüsü (40X, Scale bar: 20 μ m).



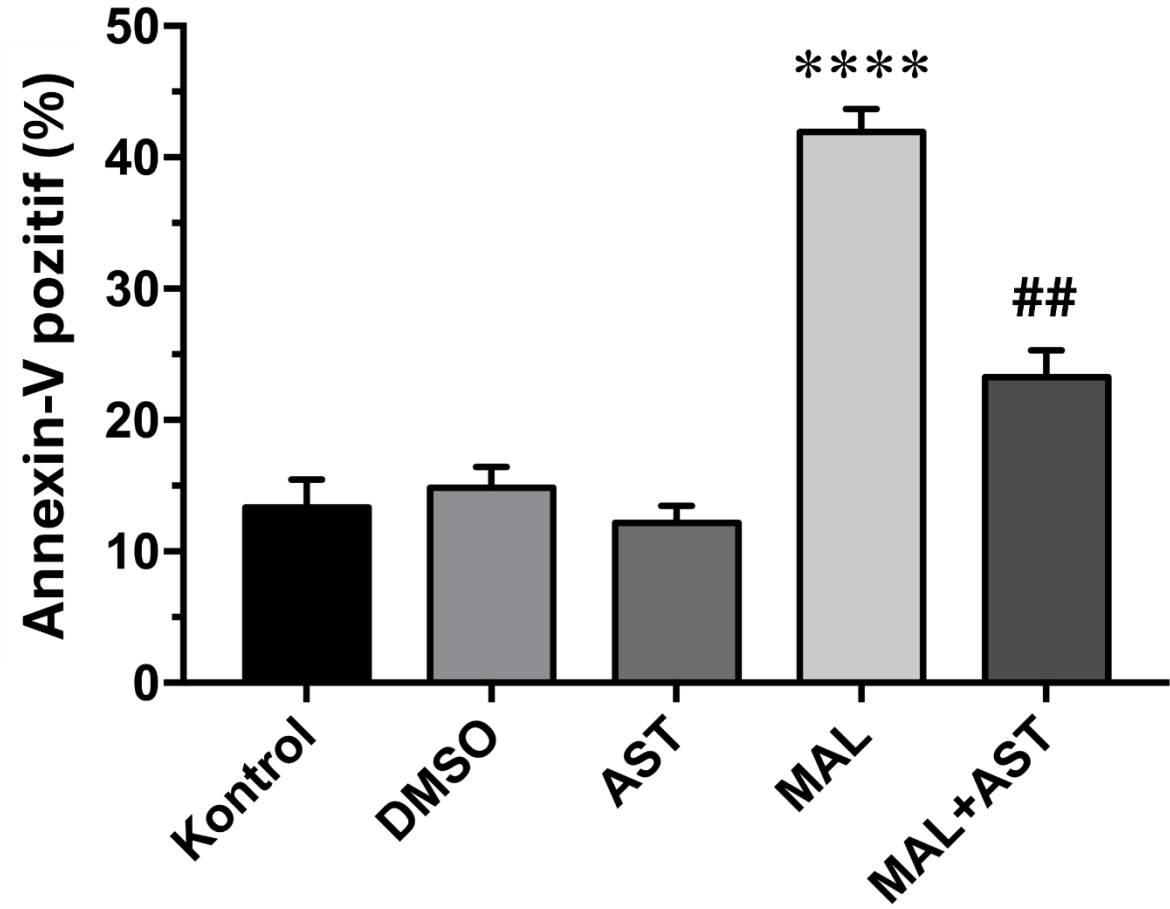
Şekil 34. Deney gruplarına ait MMP floresan yoğunlukları grafiği. Tüm veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. ****, kontrol, DMSO, AST ve MAL+AST gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,0001$). ##, kontrol, DMSO ve AST gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,0001$).

4.5. Apoptoz

Astaksantin'in malathion'a maruz kalan oositlerde erken apoptoz üzerindeki etkileri Annexin-V boyama ile tespit edildi. Çalışmamız dahilinde, MAL+AST gruplarında elde edilen apoptotik oosit oranı, malathion'a maruz kalan gruplardakinden önemli ölçüde düşük (Şekil 35; 24.2 ± 1.3 , $n=64$, 42.4 ± 2 , $n=69$, $P < 0.05$, sırasıyla); kontrol, sham ve sadece astaksantin verilen gruplardan daha yüksekti (Şekil 35; 14.3 ± 1.2 , $n=60$, 14.7 ± 1 , $n=67$, 13.3 ± 0.8 , $n=57$, $P < 0.05$, sırasıyla). Sitoplazma ve plazma zarındaki yeşil floresan sinyali Annexin-V pozitif ve apoptotik olmayan oositler boyanmadı (Resim 17).



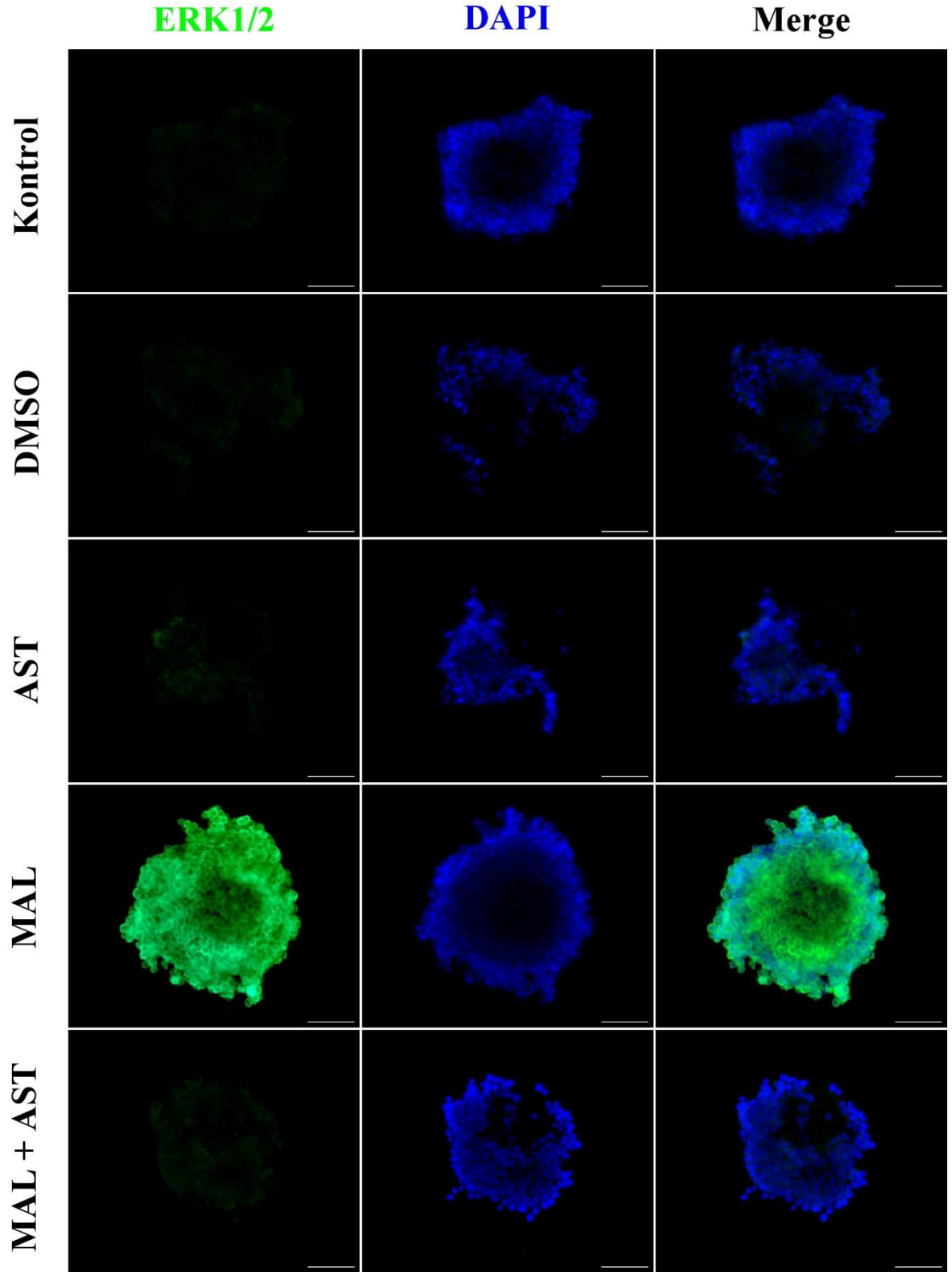
Resim 17. İnkübasyon sonrası elde edilen negatif ve pozitif annexin-v oositler (40X, Scale Bar: 20 µm).



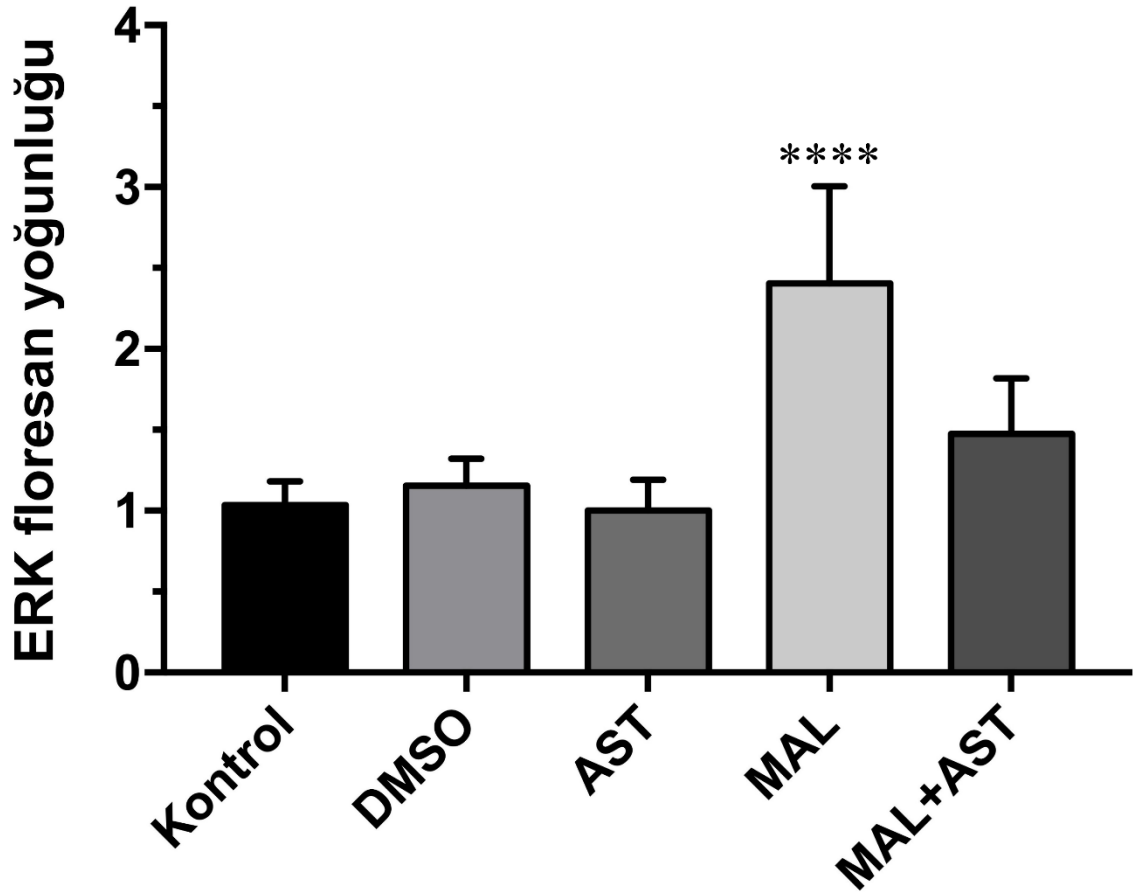
Şekil 35. Deney gruplarına ait pozitif annexin-v yüzdeleri grafiği. Tüm veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. ****, kontrol, DMSO, AST ve MAL+AST gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,0001$). ##, kontrol, DMSO ve AST gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,001$).

4.5. ERK1/2 Fosforilasyonu

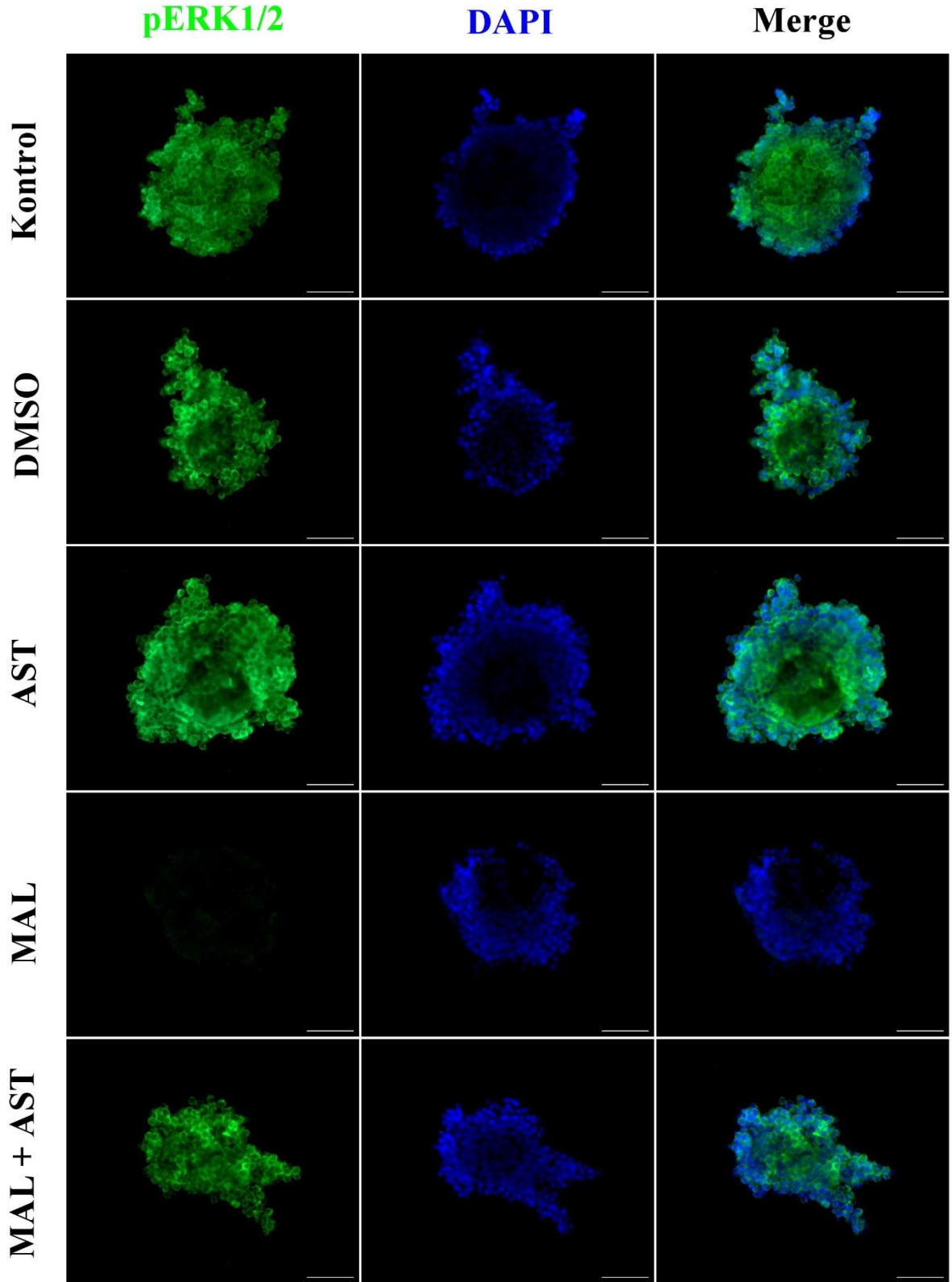
In vitro koşullarda malathion maruziyetinden sonra kumulus-oosit komplekslerine ait kumulus hücrelerinde, oosit matürasyonu ile yakından ilişkili olan ERK1/2'nin fosforilasyon yoluyla aktivasyonunu inceledik. Resim 18 ve Resim 19'da gösterildiği gibi, malathion grubunda kumulus oosit komplekslerindeki ERK1/2 fosforilasyonu, kontrol, sham (DMSO) ve astaksantin ile inkübe edilen gruplara kıyasla oldukça düşüktü (Şekil 37; $1,2 \pm 0,4$, n=54; $2,5 \pm 0,2$, n=50; $2,4 \pm 0,3$, n=52; $2,8 \pm 0,4$, n=48, $P < 0.05$, sırasıyla). Bunun yanı sıra, malathion ve astaksantin birlikte çalışıldığı tedavi grubunda görülen fosforilasyon yoğunluğu, malathion grubuna kıyasla önemli ölçüde artmıştır (Şekil 37; $2,2 \pm 0,3$, n=57, $P < 0.05$).



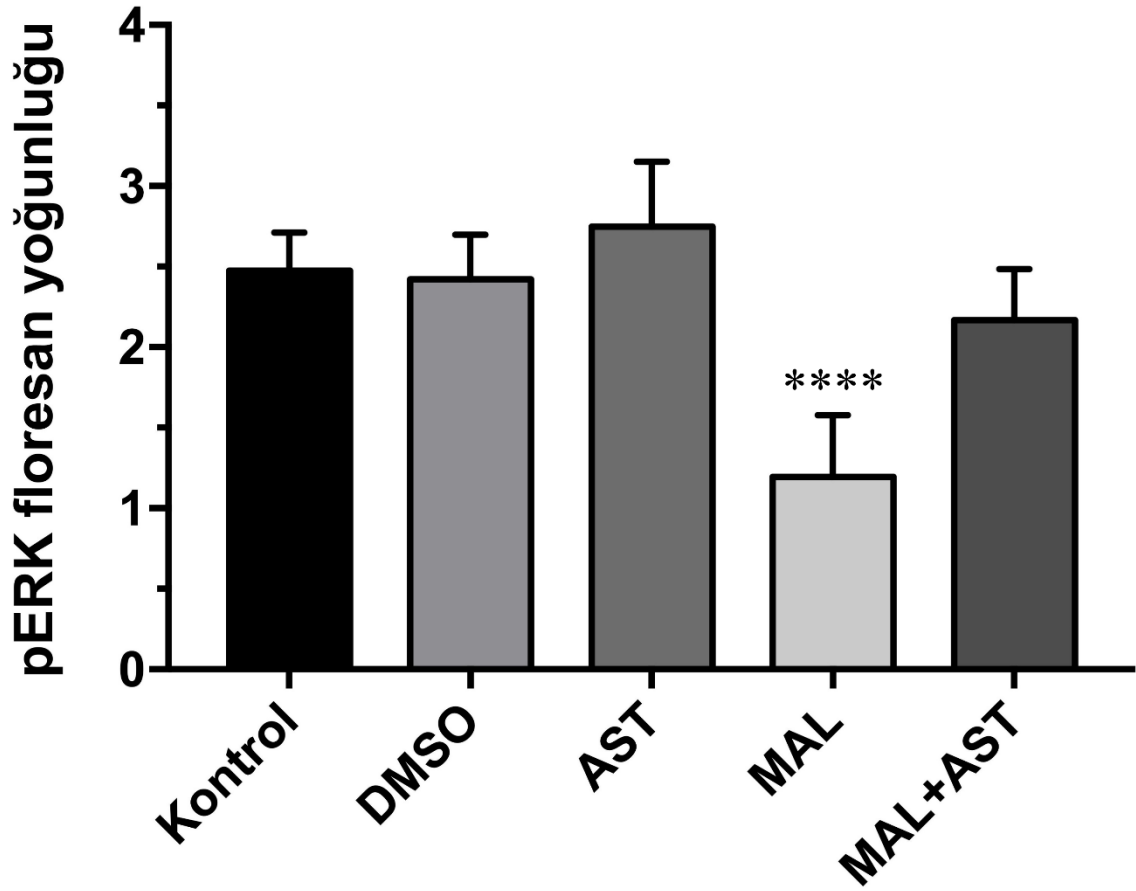
Resim 18. Deney gruplarına ait KOK'larda ERK1/2'lerin immü Floresan gösterimi (40X, Scale Bar: 50 μ m).



Şekil 36. Deney gruplarına ait ERK floresan yoğunlukları grafiği. Tüm veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. ****, kontrol, DMSO, AST ve MAL+AST gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,0001$).



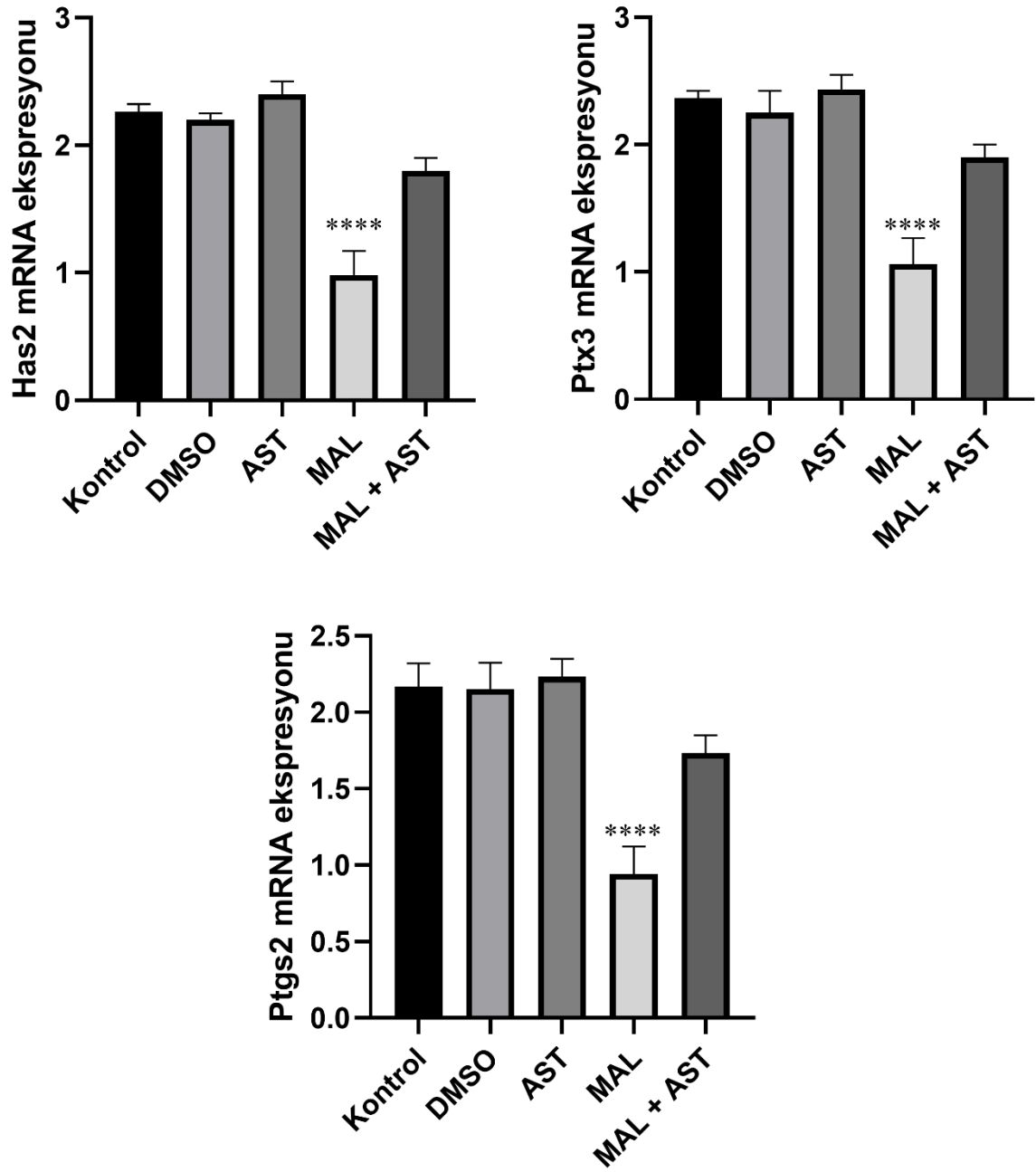
Resim 19. Deney gruplarına ait KOK'larda pERK1/2'lerin immünfloresan gösterimi (40X, Scale Bar: 50 μ m).



Şekil 37. Deney gruplarına ait pERK floresan yoğunlukları grafiği. Tüm veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. ****, kontrol, DMSO, AST ve MAL+AST gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,0001$).

4.6. ERK1/2 İlişkili Gen İfadeleri

Astaksantin'in, malathion'a maruz kalan kumulus oosit komplekslerinde fosforile ERK1/2 ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri, qPCR ile belirlendi. Şekil 38'de gösterildiği gibi malathion'a maruziyet, her üç gen (Has2, Ptgs2, Ptx3) e ait ekspresyon seviyesini de kontrol, DMSO, AST gruplarına kıyasla oldukça düşürdü (Has2; 0.9 ± 0.6 , 2.3 ± 0.3 , 2.2 ± 0.3 , 2.4 ± 0.4 ve Ptgs2; 1.1 ± 0.5 , 2.4 ± 0.3 , 2.3 ± 0.5 , 2.5 ± 0.4 ve Ptx3; 0.9 ± 0.5 , 2.2 ± 0.3 , 2.2 ± 0.4 , 2.3 ± 0.3 , $P < 0.05$, sırasıyla). Kontrol, DMSO ve AST gruplarına ait ekspresyon düzeyleri arasında ise anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. Bunun yanı sıra, malathion ve astaksantin birlikte çalışıldığı tedavi grubunda görülen mRNA seviyeleri malathion grubuna kıyasla önemli derecede arttı (Has2; 1.9 ± 0.4 ve Ptgs2; 1.9 ± 0.3 ve Ptx3; 1.7 ± 0.4 , $P < 0.05$, sırasıyla).



Şekil 38. Deney gruplarına ait Has2, Ptx3, Ptgs2 mRNA ekspresyonları grafiği. Tüm veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. ****, kontrol, DMSO, AST ve MAL+AST gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark ($P < 0,0001$).

5. TARTIŞMA

İnfertilite, dünya genelinde çiftlerin yaklaşık %10-15'ini etkileyen, karmaşık ve çok boyutlu bir sağlık sorunudur. Çiftlerin çocuk sahibi olma arzularının gerçekleşmemesi hem fiziksel hem de psikolojik açıdan ciddi etkiler doğurabilmektedir. Kadınlarda görülen infertilite ise, bu sorunun önemli bir kısmını teşkil eder ve etiyolojisi oldukça çeşitlidir. Bu bağlamda, oosit matürasyon anormallikleri kadın kaynaklı infertilite nedenleri arasında özel bir öneme sahiptir. Oosit matürasyonu sürecindeki aksaklıklar, fertilizasyonun ve dolayısıyla başarılı bir gebeliğin önündeki en büyük engellerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Beall ve diğerleri, 2010; Bhattacharya ve diğerleri, 2010).

Oosit matürasyon anormalliklerinin sebepleri arasında genetik faktörler, hormonal dengesizlikler ve çevresel etmenler önemli yer tutmaktadır. Son yıllarda, çevresel toksinler ve kimyasalların, bu anormalliklerin gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu çevresel faktörler arasında pestisitler, yaygın kullanımları ve biyolojik etkileri nedeniyle dikkat çekmektedir. Konu hakkında yapılan güncel çalışmalar, belirli pestisit türlerinin, özellikle de organofosfat grubu pestisitlerden biri olan malathionun, oosit matürasyonu üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceğini ortaya koymaktadır. Malathionun üreme sağlığı üzerindeki potansiyel zararlı etkileri, bu kimyasalın yaygın kullanımı ve çevresel kalıcılığı göz önüne alındığında, ciddi bir endişe kaynağıdır (Kumar ve diğerleri, 2019).

In vitro matürasyon (IVM), içsel, dışsal ve kimyasal maruziyet gibi çevresel etmenler nedeniyle fizyolojik şartlarda olgunlaşmamış oositlerin, laboratuvar ortamında olgunlaştırılması ve üreme tedavilerinde kullanılmasıdır. IVM sayesinde, optimize edilmiş kültür ortamları ve sağlıklı gelişim için takviyeler içeren matürasyon medyumları, oosit matürasyon anormalliklerine karşı etkili bir yöntem sunmaktadır (Çelik, 2011; Delilbaşı, 2008).

Bu çalışma kapsamında, yaygın kullanımı bilinen malathionun *in vitro* oosit matürasyonu üzerindeki toksik etkileri ve bu toksisiteye karşı korunma yöntemleri değerlendirilmiştir. Fare modeli üzerinde yapılan incelemelerimiz sonucunda, malathionun oosit matürasyonu üzerindeki etkileri moleküler ve hücresel düzeyde tartışılmış, ileri araştırmalar için öneriler sunulmuştur. Astaksantin'in güçlü antioksidan etkileri göz önüne alındığında ise, malathion kaynaklı oosit hasarına karşı dişi üreme parametrelerini koruyabileceği tarafımızca öngörülmüştür. Nitekim, çalışmamız malathion toksisitesine maruz kalmış oositlerde

astaksantin takviyesinin olası koruyucu etkilerini incelemeyi amaçlamaktadır. Malathion'un, kumulus hücrelerinde EGFR aracılı ERK1/2 aktivitesini azaltarak oosit olgunlaşmasını engellediği; astaksantin ise bu olumsuz etkileri hafifleterek oosit matürasyonunu destekleyebileceği hipotezi üzerine yoğunlaşmıştır. Ayrıca, astaksantin kullanımının oksidatif stresi, iğ ipliği ve kromozom anormalliklerini, mitokondriyal işlev bozukluklarını ve erken apoptozu azaltarak oosit sağlığını koruyabileceği varsayılmıştır. Bununla birlikte, mevcut literatür incelendiğinde, bu kapsamda yapılmış benzer çalışmaların sınırlı olması, bu araştırmanın özgünlüğünü ve bilimsel katkısını daha da ön plana çıkarmaktadır.

Literatür incelemesiyle birlikte, malathion'un da dahil olduğu organofosfatlar ile yapılan *in vivo* çalışmalarda yumurtalıklarda işlevsel kayıpların olduğu, granüloza hücrelerinde apoptoz ve atrezi oranının arttığı ve buna bağlı olarak folikül kayıplarının gerçekleştiği görülmüştür (Jitender ve diğerleri, 2014). Koç ve diğerleri (2019), malathion maruziyetinin doza bağlı olarak yetişkin Wistar rat'larında ovaryum boyutlarını azalttığını, Özsoy ve diğerleri (2016) de malathion maruziyetiyle birlikte ovaryumda bulunan SOD ve CAT aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla düştüğünü bildirmiştir (Koç ve diğerleri, 2009; Özsoy ve diğerleri, 2016). Ayrıca malathion'a maruziyetle birlikte; granüloza hücrelerinde çekirdek parçalanması, piknoz, membran bütünlüğünde kayıplar, kromatin kondansasyonu ve vakuolizasyon'un meydana geldiği bildirilmiştir (Bhardwaj ve diğerleri, 2016).

Yapmış olduğumuz çalışmada, matürasyon medyumuna artan konsantrasyonlarda (50, 100, 350, 500, 750 μ M) malathion eklemesi yaptık. Bunun sonucunda malathion'un kontrol grubuna kıyasla birinci polar cisim oluşumunu olumsuz etkilediği ve MII oosit sayısının artan dozla ters orantılı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgulara dayanarak, sonraki deneyler için kontrol grubuna kıyasla yüzde elli matürasyon oranını sağlayan 350 μ M malathion, etkin doz olarak seçildi. Malathion ve matürasyon oranları arasında tespit ettiğimiz veriler literatürde yer alan diğer çalışmalarla uyumludur. Bonilla ve diğerleri (2008), fareler üzerinde yaptığı *in vitro* çalışmada, malathion'un doza bağlı olarak oosit canlılığı ve matürasyon oranlarında azalmaya sebep olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada transkripsiyon, translasyon ve mitokondriyal fonksiyonda görevli olan gen ifadelerinde problemlerin meydana geldiği de gözlenmiştir (Bonilla ve diğerleri, 2008). Benzer şekilde Casas ve diğerleri (2010), domuz oositleri ile yaptığı *in vitro* çalışmada, malathionun bazı mitokondriyal ve ribozomal gen ekspresyonlarında değişikliklere yol açarak, erken oogenez süreçlerinde olumsuz etki gösterdiğini ve oosit sağ kalımı ile matürasyon oranlarını düşürdüğünü bildirmiştir (Casas ve diğerleri, 2010). Domuzlar üzerine yapılan diğer çalışmalarda da Flores ve diğerleri (2017) ile

Chen ve diğerkleri (2019), malathion maruziyetinin aynı şekilde oosit *in vitro* matürasyon oranlarını düşürdüğünü bildirmiştir (Chen ve diğerkleri, 2020; Flores ve diğerkleri, 2017). Bahsi geçen bu çalışmalar elde ettiğimiz bulgularımızı desteklemekte ve malathionun oosit matürasyonu üzerinde gözlemlediğimiz doza bağılı olumsuz etkilerini doğrulamaktadır. Bununla birlikte, malathionun neden olduğu mitokondriyal hasarın, hücre bölünmesi için kritik olan ATP üretiminde azalmaya yol açtığı ve aynı zamanda ribozomal hasarların proteinlerde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olabileceği düşünülmüştür (Casas ve diğerkleri, 2010). Bu verilerin, çalışmamızda gözlemlenen düşük matürasyon oranları ile ilişkili olabileceği düşünülebilir.

Ayrıca, Aziz ve diğerkleri (2009), *Bubalus Bubalis* (Asya Mandası) türü üzerinde yaptığı bir çalışmada, malathionun kumulus ekspanسیونunu olumsuz etkilediğini ve oosit matürasyon oranlarını düşürdüğünü bildirmiştir (Aziz ve diğerkleri, 2012). Fareler üzerinde yaptığımız çalışmanın sonuçları, bahsi geçen bu veriler ile kıyaslandığında, malathionun oosit maturasyonu ve gelişimi üzerindeki olumsuz etkilerinin farklı memeli türleri arasındaki tutarlılığını göstermesi açısından da önemlidir. Öyle ki, farklı türler arasında elde edilen bu benzer sonuçlar sayesinde malathion'a maruziyetin, insanlarda görülen oosit matürasyon problemleri için de bir açıklama getirebileceği varsayımını akla getirmektedir.

Bununla birlikte, literatür incelemeleri astaksantin'in oosit maturasyon oranları üzerindeki etkinliğine dair sınırlı sayıda çalışma olduğunu ortaya koymaktadır. Çalışmamızda ise astaksantin'in, malathion kaynaklı oluşan olumsuz etkileri azaltma potansiyelini araştırmak amacıyla artan dozda farklı konsantrasyonlar (1, 2.5, 5, 10 ve 20 µM) test edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, 350 µM malathion'a karşı 2.5 µM dozlu astaksantin takviyesinin, 1 µM'a kıyasla matürasyon oranını kontrol grubuna en yakın olacak şekilde artırdığı tespit edilmiştir. Ancak, 2.5 µM üstü dozların maturasyon oranlarında belirgin bir değişiklik yaratmadığı görülmektedir. Böylelikle çalışmamızda elde edilen sonuçlar, malathion kaynaklı toksisitenin, astaksantin kullanımının ancak uygun dozlarda olması halinde hafifleyebileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, astaksantin'in kanıtlanmış güçlü antioksidan özelliği sayesinde oksidatif stresi azaltarak malathion'un neden olduğu mitokondriyal hasarı minimize etme ve ATP üretimini destekleme potansiyeline sahip olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, ribozomal hasarları azaltarak protein sentezini iyileştirme kapasitesi, oosit maturasyonunu destekleyen kritik yolların yeniden işlevsellik kazanmasını mümkün kılmakta olabilir. Bu mekanizmalar aracılığıyla astaksantin'in, oosit matürasyonundaki olumsuz etkileri gidermeye katkıda bulunarak matürasyon oranlarını artırabileceği öngörülmektedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlar, Do ve

diğerlerinin (2015) domuz oositlerinde ısı şoku maruziyeti sonrası gözlemledikleri artan oksidatif stres ve organel hasarına bağlı düşük matürasyon oranlarının astaksantin ile iyileştiğine dair bulgularla da tutarlılık göstermektedir (Do ve diğerleri, 2015).

Mayotik iğ ipliği morfolojisi ve kromozom hizalanmaları ise, çalışmamızda incelediğimiz bir diğer kritik parametredir. Zira düzgün organize olmuş ve işlevsel bir iğ ipliği oluşumu, oositler MII evresine geçmiş olsalar dahi, henüz devam edecek olan mayoz bölünmeleri için sağlıklı bir matürasyon süreci geçirmeleri adına gereklidir. Bulgularımız malathion maruziyetinin, oositlerde başarılı mayotik ilerleme için kritik öneme sahip olan iğ ipliği organizasyonunu önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Kontrol, sham ve sadece astaksantin uygulanan gruptaki oositlerin, doğrusal olarak hizalanmış kromozomlar ile düzgün organize olmuş ve varil şeklinde iğ ipliklerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak malathion maruziyeti bu yapıyı bozarak iğ ipliği kusurlarını %55 gibi bir orana artırmış ve kromozomların dağınık konumlanmasına sebep olmuştur. Bu bulgular, Chen ve diğerleri (2020)'nin domuz oositleri üzerinde yaptıkları *in vitro* matürasyon çalışmasında malathionun iğ ipliği organizasyonunu olumsuz etkilediğini bildiren sonuçlarla uyumludur (Chen ve diğerleri, 2020).

İğ ipliği bütünlüğünü tehlikeye atan faktörler arasında ise oksidatif stresin kritik bir rol oynadığı gözlemlenmektedir. Özellikle, oksidatif stresin fare oositlerinin olgunlaşma sürecinde iğ ipliği morfolojisini olumsuz etkilediği, mikrotübül dinamiklerini bozarak kromozom hizalanmasında düzensizliklere yol açtığı bilinmektedir (Choi ve diğerleri, 2007). Sentrozomların da dahil olduğu mikrotübül organizasyon merkezleri (MTOC'ler), iğ oluşumu için hayati öneme sahip olup, çevresel etkilere ve çeşitli bileşiklere karşı oldukça hassastır. Mikrotübül organizasyon merkezlerinin (MTOC) oluşumu, belirli proteinlerin ve enzimlerin varlığına bağlıdır. Malathion maruziyetinin ise, oksidatif stresi artırarak bu proteinsel yapıları bozabileceği ve böylelikle MTOC oluşumunu engelleyebileceği ileri sürülebilir. Ayrıca, oksidatif strese maruz kalan mitokondrilerin, iğ ipliği oluşumu için gerekli olan ATP enerjisini sağlayamaması da gözlemlenen iğ ipliği hasarlarına neden olabilecek bir diğer faktör olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamız dahilinde ise astaksantin tedavisi, malathion maruziyeti sonrası görülen kusurlu iğ ipliklerinin oranını %30 seviyelerine kadar azaltarak, mikrotübül stabilitesini destekleyici rolünü ortaya koymuştur. Bu bulgu, MII oosit oranlarımızla birlikte değerlendirildiğinde astaksantin, oksidatif stres ürünlerini temizleyerek ve organelleri stabilize ederek malathionun *in vitro* etkilerine karşı iğ yapısını koruyabildiğini

düşündürmektedir. Ayrıca, çeşitli protein ve enzimlerin ekspresyonunu modüle ederek iğ yapısının eski haline gelmesine katkıda bulunabilir. Çünkü oosit matürasyonu organellerinin dinamik dağılımına ve fonksiyonel bütünlüğüne bağlıdır ve maalesef oksidatif strese karşı özellikle hassastırlar.

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz bir diğer parametre ise oksidatif stres'e neden olan reaktif oksijen türleri (ROS) dir. *In vitro* matürasyon sonrası MII oositlerde immünfloresan işaretleme ile tespit ettiğimiz hücre içi ROS seviyelerini inceledik. Sonuçlar, malathionun oksidatif stresi kontrol, sham (DMSO) ve sadece astaksantin uygulanan gruplara kıyasla önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Malathion'un *in vitro* oosit matürasyonu üzerindeki bu olumsuz etkisi, bu bileşiğin lipofilik yapısı nedeniyle oolemma ile kolayca etkileşime girebilmesi sonrası yapısal hasar ve endojen ROS üretiminin artmasına yol açmasından kaynaklanmaktadır (Rieger ve diğerleri, 2017). Bununla birlikte, malathion ve astaksantin'in birlikte kullanıldığı tedavi grubunda elde edilen ROS miktarı ise sadece malathion'un kullanıldığı gruba kıyasla anlamlı derecede düşük olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, malathionun oosit matürasyonunda oksidatif stres yarattığını ve antioksidan savunma mekanizmalarını zayıflattığını gösteren literatür bulgularını doğrulamaktadır. Bunu destekler nitelikte, Flores ve diğerlerinin (2017) domuz oositleri ile gerçekleştirdiği *in vitro* matürasyon deneyinde, malathion maruziyetiyle birlikte reaktif oksijen türleri seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte antioksidan enzimler olan SOD1, GPx, GST, G6PD ve CAT miktarlarında ise azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (Flores vd., 2017). Benzer şekilde, Chen ve diğerleri (2019)'nin çalışmasında da malathion maruziyetinin domuz oositlerinde ROS miktarında artışa neden olduğu, bu durumun *in vitro* matürasyonu olumsuz etkilediği ve ROS artışının bizim çalışmamızla aynı şekilde immünfloresan görüntüleme yöntemi kullanılarak kanıtlandığı görülmektedir (Chen ve diğerleri, 2020).

Bildiğimiz kadarıyla, literatürde malathion'un fare oositlerinde *in vitro* matürasyon süreci üzerindeki etkilerine karşın astaksantin takviyesinin koruyucu potansiyelini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, çalışmamızda malathion ve astaksantin'in birlikte kullanıldığı tedavi grubunda ROS seviyelerinin belirgin şekilde düşmesi, astaksantin'in başka çalışmalarda belirtilen güçlü antioksidan etkilerini doğrulamaktadır. Aynı şekilde, Xiang ve diğerleri (2021) tarafından yapılan çalışmada, vitrifiye edilip çözündürülmüş domuz oositleri ile yapılan *in vitro* matürasyon işlemi sırasında astaksantin takviyesinin oositte üretilen ROS miktarını anlamlı ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir (Xiang ve diğerleri, 2021). Benzer şekilde, Do ve diğerleri (2015) domuz oositlerinde ve Ispada ve diğerleri (2018) sığır oositlerinde

astaksantin takviyesinin *in vitro* matürasyon sırasında ısı şokunun olumsuz etkilerini azaltarak artan hücre içi ROS seviyelerini anlamlı şekilde düşürdüğünü bulmuşlardır (Do ve diğerleri, 2015; Ispada ve diğerleri, 2018). Bahsedilen tüm bu çalışmaların sonuçları, astaksantin'in oksidatif stres koşullarında antioksidan etkisinin belirgin olduğunu göstermektedir.

Bu bulgular astaksantin'in, özellikle yüksek oksidatif stres altında, örneğin malathion maruziyeti veya ısı şoku gibi durumlarda, ROS seviyelerini düşürerek hücre hasarı azaltabileceğini göstermektedir. Ancak elde ettiğimiz sonuçlarda kontrol ve sham ile yalnızca astaksantin uygulanan gruplar arasında ROS seviyelerinde anlamlı bir fark gözlenmemesi, astaksantin'in etkilerinin özellikle oksidatif stresin arttığı koşullarda ortaya çıktığını desteklemektedir. Bu durum, astaksantin'in koruyucu etkisinin oksidatif stresin yüksek olduğu ortamlarda daha belirgin hale geldiğini ve bu nedenle stres koşullarında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Mitokondriler ise, yüksek enerji gereksinimlerinin karşılanması adına oositlerde en çok bulunan organeller arasındadır ve oosit kalitesinin belirlenmesinde önemli bir göstergedir (Tarazona ve diğerleri, 2006). Oosit matürasyonu sırasında mitokondriler, sitozolde dinamik bir dağılım sergiler ve bu dağılım, hücre iskeleti ağı aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu nedenle, mikrotübüllerde meydana gelen hasarlar, mitokondrilerin oosit içerisindeki dağılımını olumsuz etkileyebilir. Aynı zamanda mitokondriler, veziküller ve endoplazmik retikulum gibi diğer hücre yapıları ile iletişim kurarak kümeler oluşturur. Böylelikle kalsiyum sinyalleri, metabolik ara ürünler ve lipitler gibi maddelerin taşınması koordine edilmiş olur. Bu süreç, hücre metabolizmayı düzenlemek, mitokondriyal biyogenezi kontrol etmek ve hücre stres yanıtlarını yönetmek açısından kritiktir (Brevini ve diğerleri, 2005).

Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) ise, mitokondri iç ve dış zarı arasındaki elektriksel potansiyel farkı ifade eder ve bu fark, mitokondrinin enerji üretiminde hayati bir rol oynar. Yüksek membran polarizasyonu, mitokondrilerde ATP üretimini destekleyen bir faktördür. Bununla birlikte çeşitli araştırmalarda, oositlerin gelişim potansiyeli ile mitokondriyal membran potansiyeli arasında pozitif bir korelasyon olduğu da gösterilmiştir (Ding ve diğerleri, 2020; Tarazona ve diğerleri, 2006). Aynı zamanda mitokondriyal solunum zincirindeki elektron taşınımı, ROS oluşumunun da ana kaynağıdır (Romek ve diğerleri, 2011). Mitokondriyal fonksiyon bozulduğunda, mitokondriyal iç zarın geçirgenliği artar ve bu durum hücrelerde oksidatif hasara yol açan ROS'un aşırı üretimine neden olur (Ding ve diğerleri, 2020; Prasad ve diğerleri, 2016). Aşırı ROS üretimi ise mitokondriyal fonksiyonu daha da bozarak bu kısır döngüyü pekiştirir. Oositlerin pestisitler gibi çeşitli çevresel

kirleticilerle teması, hücre solunumunun inhibisyonuna, oksidatif fosforilasyonun bozulmasına ve mitokondriyal membran geçirgenliğinin artmasına sebep olarak mitokondriyal fonksiyonu olumsuz etkiler. Nitekim, mitokondriyal membran potansiyeli, mitokondriyal fonksiyonun değerlendirilmesinde hayati bir göstergedir (AL-Zubaidi ve diğerleri, 2019; Belyaeva ve diğerleri, 2008).

Bu bağlamda, malathion maruziyetinin fare oositlerinde mitokondriyal fonksiyonu etkileyip etkilemediğini araştırmak amacıyla mitokondriyal membran potansiyelini inceledik. Yapmış olduğumuz çalışmada malathion'a maruz bırakılan oositlerin MMP'sinin kontrol, sham ve sadece astaksantin uygulanan gruplar ile kıyaslandığında önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum, malathion maruziyetinin fare oositlerinde mitokondriyal işlev bozukluğu yoluyla oksidatif strese neden olabileceğini bizlere düşündürmektedir. Böylece malathion maruziyeti ile elde edilen düşük mayotik matürasyon bulgularımız daha da anlam kazanabilir. Aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu kaynaklı oksidatif stres, oositler ve onu destekleyen granüloza hücreleri arasındaki iletişim ağını kesebilir. Böylelikle nükleotid, piruvat ve aminoasit gibi moleküler haberleşmede etkin olan maddelerin çift yönlü geçişini engelleme ihtimali ile matürasyon oranlarında görülen düşüş arasında bir bağlantı olabilir.

Bonilla ve diğerleri (2008) ise, yapmış oldukları bir çalışmada, malathion maruziyetinin *in vitro* fare oosit matürasyonu sırasında mitokondriyal solunum zincirinde önemli rol oynayan ve bir enzim olan sitokrom oksidaz alt birimi I'in aşağı düzenlendiğini belirtmiştir (Bonilla ve diğerleri, 2008). Bu sonuç, malathionun mitokondriyal fonksiyon üzerindeki etkisini açıkça göstermekte olup, elde ettiğimiz mitokondriyal membran potansiyeli verilerini destekler niteliktedir. Çalışmamız dahilinde gerçekleştirilen astaksantin tedavisi ise, malathion'un neden olduğu mitokondriyal fonksiyon kaybına rağmen, bu sorunu önemli ölçüde iyileştirmiştir. Bu bulgu, astaksantin'in mitokondriyal membran bütünlüğünü koruyarak enerji homeostazını desteklediğini göstermektedir. Benzer bir nitelikte, Jia ve diğerleri (2020)'nin domuz oositlerinde ovulasyon sonrası yaşlanma üzerine yaptıkları çalışmada, astaksantin'in oksidatif stres ve mitokondriyal membran potansiyelindeki olumsuzluklara karşı terapötik etkilerini gözlemledikleri bildirilmiştir (Jia ve diğerleri, 2020). Mevcut çalışmamız bahsedilen diğer çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde ise, astaksantin'in oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonlar arasında gerçekleşen döngüye karşı olumlu etkiler sağladığı açıktır.

Çalışmamızda incelediğimiz bir diğer parametre, oksidatif stres ve mitokondriyal membran potansiyeli ile yakından ilişkili olan erken apoptoz sürecidir; bu kapsamda, erken apoptoz indeksi olarak pozitif Annexin-V sinyali yüzdesi değerlendirilmiştir. Bulgularımız,

annexin-v pozitif oositlerin malathion'a maruz kalan grupta kontrol, sham ve sadece astaksantin uygulanan gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, malathion ile tetiklenen oksidatif stresin hücresel işlevlerde yarattığı olumsuz etkilerle hücre apoptozunu başlatabileceği düşüncesini desteklemektedir. Bu süreç, oksidatif stres kaynaklı mitokondriyal membran potansiyeli'nin azalmasının ardından mitokondriyal membranın hasar görmesi ve sitokrom C'nin serbest kalması sonucu apoptozdan sorumlu kaspaz kaskadının aktifleşmesiyle başlayabilir. Ayrıca, MMP'deki düşüşe bağlı olarak üretilen ATP seviyelerinin azalması, artan ROS etkisiyle oluşan DNA çift zincir kırıkları ve protein peroksidasyonu sonucu biriken hatalı katlanmış proteinlerin apoptotik süreçleri tetikleyici faktörler olarak rol oynayabileceği de öngörülmektedir.

Astaksantin ile yapılan tedavi ise, hasta grubuna ait %42'lerdeki erken apoptoz oranını %24 gibi bir seviyeye düşürmüştür. Bu bulgu, apoptoz ile yakından ilişkili olan ROS miktarı ve MMP üzerine elde ettiğimiz bulgularımızla paraleldir. Bu şekilde, malathion maruziyeti ile artan erken apoptoz oranının, oksidatif stres ve mitokondriyal hasar ile ilişkili olabileceği hipotezimiz destek görebilir. Bu doğrultuda, *in vitro* oosit matürasyonu sırasında terapötik özellikleri kanıtlanmış bir antioksidan olan astaksantin, matürasyonu olumsuz etkileyen pestisit maruziyetlerine karşı oosit sağ kalımını destekleyebileceği sonucuna varılabilir.

Çalışmamızda incelediğimiz bir diğer parametre, oosit matürasyonunda önemli bir rol oynayan ERK1/2'nin fosforilasyon yoluyla aktivasyonudur. Granülosa hücreleri, LH etkisiyle birlikte EGF benzeri faktörler sentezler. Bu faktörler daha sonra, oosit tarafından üretilmiş GDF9 ve BMP15'in etkisiyle kumulus hücre yüzeyinde oluşturulan reseptörlerine bağlanır. Bu reseptör-ligand etkileşimi, kumulus hücrelerinde MAPK'yı aktive ederek ERK1/2'nin fosforilasyon yoluyla aktivasyonunu tetikler. Bu aktivasyon ise, oosit matürasyonu için gerekli olan moleküler mekanizmaları ve kumulus hücreleri ile oosit arasındaki iletişimi düzenlemektedir (Fan ve diğerleri, 2009).

Malathion ise, toksik etkilerinin yanı sıra endokrin bozucu etkinliği ile de bilinmektedir. Bu etki, malathion'un doğal hormonları ve sinyal faktörlerini taklit ederek, reseptörlerini bloke ederek veya anormal endokrin tepkiler üretmek için hormon benzeri yolları tetikleyerek endokrin homeostazını değiştirmesiyle ortaya çıkar (Pocar ve diğerleri, 2003). Bu bilgiler ışığında, malathion'un oksidatif stresi artırmasının yanı sıra endokrin bozucu etkilerinin de *in vitro* matürasyon sürecini olumsuz etkileyebileceğini varsaydık.

Daha önce, kumulus oosit komplekslerinin *in vitro* matürasyonu sırasında malathion maruziyeti uygulanarak ERK1/2 sinyal yolağının incelenmemiş olması, çalışmamızın özgünlüğünü vurgulamaktadır. Aynı şekilde, astaksantin bu süreçlere olan katkısı da daha önce araştırılmamıştır. Nitekim, IVM sırasında malathion'a maruz kalan kumulus oosit komplekslerini incelediğimizde, ERK1/2 fosforilasyonunun gerçekleşemediğini; buna karşın kontrol, sham ve sadece astaksantin kullanıldığı çalışma gruplarında fosforile ERK1/2 düzeylerinin oldukça yüksek olduğunu gördük. Bununla birlikte astaksantin takviyesinin, malathion kaynaklı düşük pERK sonuçlarını kontrol grubuna yakın olacak seviyelere kadar yükselttiğini tespit ettik.

Elde ettiğimiz sonuçlar, malathion maruziyetinin oosit matürasyonunu düzenleyen sinyal yolağını olumsuz etkileyebildiğini ortaya koymuştur. Bu durum, malathion kaynaklı oksidatif stresin oositlerde GDF9 ve BMP15 üretimini engellemesi varsayımıyla açıklanabilir. Bu eksiklik, kumulus hücre yüzeyinde EGFR sentezinin gerçekleşememesine yol açarak ERK1/2 aktivasyonunu engellemiş olabilir. Aynı zamanda, malathion'un endokrin bozucu etkisi, kumulus hücre membranlarındaki EGFR'nin bloke olmasına veya EGF benzeri faktörlerin taklit edilerek reseptör-ligand etkileşiminin engellenmesine yol açmış olabilir. Bu durum da yine, ERK1/2 fosforilasyonunda tespit edilen düşük oranları açıklayabilir niteliktedir.

Ayrıca, ERK1/2 sinyal yolunun aktivasyonu, kinazlar tarafından düzenlenen fosforilasyon ile gerçekleşir. Malathion maruziyeti ise, kumulus hücrelerinde oluşabilecek protein hataları nedeniyle bu enzimlerin yapısını veya aktivitesini engelleyerek ERK1/2 fosforilasyonunu olumsuz etkilemiş olabilir.

Bununla birlikte elde ettiğimiz malathion kaynaklı düşük ERK1/2 fosforilasyonu oranları, matürasyon oranları ile paralellik göstermektedir. Fosforile olamayan ERK1/2'nin kumulus-oosit arasındaki konneksinleri hiperfosforile edememesi nedeniyle gap junction'ların açık kalmasına yol açtığı düşünülebilir. Sonuç olarak, oosit içi cAMP seviyesinin yüksek kalması matürasyonu baskılayan faktörler arasında yer alabilir.

Ek olarak, ERK1/2 aktivasyonunun işlevselliğini yeniden kazanıp kazanmadığını değerlendirmek amacıyla, kumulus hücreleri tarafından sentezlenen pERK1/2 ile ilişkili Has2, Ptx3 ve Ptgs2 genlerinin ekspresyonunu qPCR yöntemi ile inceledik. Malathion maruziyeti sonrası bu genlerin ekspresyon seviyelerinin kontrol, DMSO ve yalnızca astaksantin uygulanan gruplara göre anlamlı derecede düştüğünü; astaksantin takviyesinin ise düşük ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna yakın değerlere yükselttiğini tespit ettik. Bu bulgular, çalışma

gruplarındaki pERK1/2 seviyeleri ve matürasyon oranları ile uyumlu olup, astaksantin takviyesi sonrası geri kazanılan ERK1/2 aktivasyonunun, işlevselliğini koruduğunu göstermektedir. Ayrıca kumulus hücre genişlemesi, musifikasyon ve oosit çevresinde matris oluşumunu tetikleyerek matürasyona katkı sağlayan bu genler, elde ettiğimiz matürasyon oranları ve pERK1/2 sonuçları arasındaki bağlantıda etkin bir rol üstleniyor olabilir.

Ayrıca, ERK1/2 aktivasyonunun kumulus hücrelerinde apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Han ve diğerleri (2017), farelerde SIRT1 ekspresyonunun ERK1/2 aktivasyonu yoluyla kumulus hücrelerinde apoptozu baskıladığını bildirmiştir (Han ve diğerleri, 2017). Çalışmamızda malathion maruziyeti sonrası ERK1/2 aktivasyonunun engellenmesi, kumulus hücrelerinde apoptoz oranını artırarak oosit matürasyonu için gerekli olan kumulus-oosit etkileşimini bozmuş olabilir. Bu da oositlerin besin alımını, korunmasını ve desteklenmesini olumsuz etkileyerek matürasyonu sekteye uğratmış olabilir.

Çalışmamızda astaksantin takviyesinin ise, düşük fosforilasyon düzeylerini artırarak malathion'un ERK1/2 aktivasyonu üzerindeki olumsuz etkisini hafiflettiğini tespit ettik. Bu sonuç da yine, pERK1/2 ilişkili gen ekspresyonları ve matürasyon oranlarımızla paralellik göstermektedir. Bu durum neticede, astaksantin'in kumulus hücreleri ve oositlerde malathion kaynaklı mekanizmalara terapötik etkisi olabileceğini ve oosit matürasyonunu destekleyen hücresel sinyal mekanizmalarını güçlendirebileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, BALB/C farelerden izole edilen kumulus-oosit kompleksleri (KOK) üzerinde malathion'un *in vitro* etkileri incelenmiştir. Literatürde, malathionun farelerden elde edilen KOK'lar üzerindeki etkilerinin yanı sıra, astaksantin takviyesinin malathion kaynaklı KOK hasarına karşı koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmanın bulunmadığı gözlemlenmiştir. Bu bağlamda hem malathionun zararlı etkilerini hem de astaksantin bu etkileri dengeleyebilme potansiyelini değerlendirmek amacıyla bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Deneysel bulgular, malathion'un farelerde *in vitro* oosit matürasyon oranlarını düşürdüğünü, kusurlu iğ ipliği ve dağınık kromozom oranlarını artırdığını, hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerini yükselttiğini, mitokondriyal membran potansiyelini azalttığını, erken apoptotik süreçleri tetiklediğini ve ERK1/2 fosforilasyonunu engellediğini göstermiştir.

Bu bulgular, malathion ve benzeri pestisitlerin toksik etkilerinin açıkça görüldüğünü ve tarım ile gıda sektörlerinde daha güvenli uygulamaların teşvik edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, bireylerin bu tür kimyasallara maruziyetlerini azaltmak için bilinçlendirme çalışmaları yapılmalıdır. Zira, artan çevre kirliliğine bağlı olarak pestisitlerin ve özellikle malathion birikiminin, yakın gelecekte üreme sağlığı açısından giderek daha ciddi sorunlara neden olacağı görülmektedir.

Çalışmanın sonuçlarına göre, *in vitro* şartlarda astaksantin takviyesinin, malathion'a bağlı olarak gelişen olumsuz bulgulara karşı koruyucu bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Astaksantin güçlü antioksidan özellikleri, malathion kaynaklı oosit hasarına karşı koruyucu etkinin, oksidatif stresin azaltılması, mitokondriyal işlevlerin korunması ve ERK1/2 sinyal yolunun desteklenmesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Ancak astaksantin koruyucu etkilerinin daha detaylı incelenmesi için daha geniş kapsamlı ve uzun vadeli çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, malathion maruziyetinin fertilizasyon ve embriyo gelişimi üzerindeki toksik etkileri ile astaksantin bu süreçlere olan terapötik katkıları değerlendirilmemiştir. Ancak, toksisiteye bağlı oosit matürasyon anormalliklerinin, bahsedilen bu süreçlerde görülen infertilite sorunlarının önemli bir nedeni olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, malathion ve astaksantin *in vivo* ortamdaki etkilerinin

araştırılması gerekliliğinin yanı sıra, astaksantin insanlarda da benzer koruyucu etkiler gösterip göstermediği araştırılmalı ve potansiyel klinik uygulamalar değerlendirilmelidir.

Tüm bunlar doğrultusunda pestisit toksisitesine maruz kalma olasılığı yüksek olan hastalarda tüp bebek tedavisi sürecinde bazı yardımcı ajanlara ihtiyaç duyulabilmektedir. Özellikle, astaksantin gibi etkili antioksidanların infertilite tedavisinde destekleyici olarak *in vitro* veya *in vivo* kullanımı araştırılmalı ve uygun protokoller geliştirilmelidir. Bu çalışma, astaksantin malathion'un olumsuz etkilerine karşı koruyucu bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koyarak, infertilite tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirilmesine önemli katkılar sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abbott, A. L. (2001). Calcium and The Control of Mammalian Cortical Granule Exocytosis. *Frontiers in Bioscience*, 6(1), d792. <https://doi.org/10.2741/Abbott>
- Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., ... Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes & Development*, 25(8), 863-874. <https://doi.org/10.1101/gad.2016411>
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., & Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>
- Alessi, D. R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyse, S. M., & Cohen, P. (1995). Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Current Biology*, 5(3), 283-295. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(95\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00059-5)
- AL-Zubaidi, U., Liu, J., Cinar, O., Robker, R. L., Adhikari, D., & Carroll, J. (2019). The spatio-temporal dynamics of mitochondrial membrane potential during oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*, 25(11), 695-705. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaz055>
- Amaral, A. F. S. (2014). Pesticides and Asthma: Challenges for Epidemiology. *Frontiers in Public Health*, 2. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00006>
- Ambati, R., Phang, S.-M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs*, 12(1), 128-152. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
- Anderson, E., & Albertini, D. F. (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *The Journal of cell biology*, 71(2), 680-686. <https://doi.org/10.1083/jcb.71.2.680>
- Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K., & Sturgill, T. W. (1990). Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*, 343(6259), 651-653. <https://doi.org/10.1038/343651a0>

- Austin, C. R. (1956). Cortical granules in hamster eggs. *Experimental Cell Research*, 10(2), 533-540. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(56\)90025-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(56)90025-8)
- Aziz, F., Mehboob, Z., Jalali, S., Shami, S. A., & Qureshi, I. Z. (2012). Effect of Organophosphate Pesticide Malathion on In-Vitro Oocyte Maturation, Fertilization and Embryo Development of Nili Ravi Buffalo (*Bubalus Bubalis*). *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(3), 147-152.
- Badr, A. M. (2020). Organophosphate toxicity: updates of malathion potential toxic effects in mammals and potential treatments. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(21), 26036-26057. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08937-4>
- Beall, S., Brenner, C., & Segars, J. (2010). Oocyte maturation failure: a syndrome of bad eggs. *Fertility and Sterility*, 94(7), 2507-2513. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.02.037>
- Beckhauser, T. F., Francis-Oliveira, J., & De Pasquale, R. (2016). Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *Journal of Experimental Neuroscience*, 10s1, JEN.S39887. <https://doi.org/10.4137/JEN.S39887>
- Belyaeva, E. A., Dymkowska, D., Wiğckowski, M. R., & Wojtczak, L. (2008). Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231(1), 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.017>
- Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2), 3-8. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80077-3)
- Bhardwaj, Jitender K., & Saraf, P. (2014). Malathion-Induced Granulosa Cell Apoptosis in Caprine Antral Follicles: An Ultrastructural and Flow Cytometric Analysis. *Microscopy and Microanalysis*, 20(6), 1861-1868. <https://doi.org/10.1017/S1431927614013452>
- Bhardwaj, Jitender Kumar, & Saraf, P. (2016). Granulosa cell apoptosis by impairing antioxidant defense system and cellular integrity in caprine antral follicles post malathion exposure. *Environmental Toxicology*, 31(12), 1944-1954. <https://doi.org/10.1002/tox.22195>
- Bhattacharya, S., Johnson, N., Tijani, H. A., Hart, R., Pandey, S., & Gibreel, A. F. (2010). Female infertility. *BMJ clinical evidence*, 2010.
- Bonilla, E., Hernández, F., Cortés, L., Mendoza, M., Mejía, J., Carrillo, E., ... Betancourt, M. (2008a). Effects of the insecticides malathion and diazinon on the early oogenesis in mice *in vitro*. *Environmental Toxicology*, 23(2), 240-245. <https://doi.org/10.1002/tox.20332>

- Bonilla, E., Hernández, F., Cortés, L., Mendoza, M., Mejía, J., Carrillo, E., ... Betancourt, M. (2008b). Effects of the insecticides malathion and diazinon on the early oogenesis in mice *in vitro*. *Environmental Toxicology*, 23(2), 240-245. <https://doi.org/10.1002/tox.20332>
- Brevini, T. A. L., Vassena, R., Francisci, C., & Gandolfi, F. (2005). Role of Adenosine Triphosphate, Active Mitochondria, and Microtubules in the Acquisition of Developmental Competence of Parthenogenetically Activated Pig Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 72(5), 1218-1223. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038141>
- Brunet, S., & Verlhac, M. H. (2011). Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Human Reproduction Update*, 17(1), 68-75. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq044>
- Capelli, B., Bagchi, D., & Cysewski, G. R. (2013). Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods*, 12(4), 145-152. <https://doi.org/10.1007/s13749-013-0051-5>
- Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y., & Betancourt, M. (2010). Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 24(1), 224-230. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.004>
- Chaube, S. K., Prasad, P. V., Thakur, S. C., & Shrivastav, T. G. (2005). Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured *in vitro*. *Apoptosis*, 10(4), 863-874. <https://doi.org/10.1007/s10495-005-0367-8>
- Chen, L., Zhang, J., Zhang, X., Liu, X., Zhao, S., Huo, L., ... Miao, Y. (2020). Melatonin protects against defects induced by malathion during porcine oocyte maturation. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 2836-2846. <https://doi.org/10.1002/jcp.29189>
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., ... Cobb, M. H. (2001). MAP Kinases. *Chemical Reviews*, 101(8), 2449-2476. <https://doi.org/10.1021/cr000241p>
- Choi, T., Rulong, S., Resau, J., Fukasawa, K., Matten, W., Kuriyama, R., ... Vande Woude, G. F. (1996). Mos/mitogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor: a novel system for analyzing spindle

- formation during meiosis I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10), 4730-4735. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4730>
- Çolak, E., & Pap, D. (2021). The role of oxidative stress in the development of obesity and obesity-related metabolic disorders. *Journal of Medical Biochemistry*, 40(1), 1-9. <https://doi.org/10.5937/jomb0-24652>
- Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S.-Y., Horner, K., ... Tsafiriri, A. (2002). Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1-2), 153-159. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00686-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00686-4)
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J.-Y., & Su, Y.-Q. (2006). Role of the Epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles. *Molecular Endocrinology*, 20(4), 715-723. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0185>
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Costa, L. G. (2018). Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *Toxicological Sciences*, 162(1), 24-35. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx266>
- Çelik, Ö. (2011). *Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar* (Ö. Çelik, Ed.). Adana: Nobel Kitabevi.
- Das, D., & Arur, S. (2022). Regulation of oocyte maturation: Role of conserved ERK signaling. *Molecular Reproduction and Development*, 89(9), 353-374. <https://doi.org/10.1002/mrd.23637>
- Davinelli, S., Nielsen, M. E., & Scapagnini, G. (2018). Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review. *Nutrients*, 10(4), 522. <https://doi.org/10.3390/nu10040522>
- Dekel, N., Lawrence, T. S., Gilula, N. B., & Beers, W. H. (1981). Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Developmental Biology*, 86(2), 356-362. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90193-7)
- Delilbaşı, L. (2008). *In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*. Ankara: Öncü Basımevi.

- DeVallance, E., Li, Y., Jurczak, M. J., Cifuentes-Pagano, E., & Pagano, P. J. (2019). The Role of NADPH Oxidases in the Etiology of Obesity and Metabolic Syndrome: Contribution of Individual Isoforms and Cell Biology. *Antioxidants & Redox Signaling*, 31(10), 687-709. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7674>
- Ding, Z.-M., Ahmad, M. J., Meng, F., Chen, F., Wang, Y.-S., Zhao, X.-Z., ... Huo, L.-J. (2020). Triclocarban exposure affects mouse oocyte in vitro maturation through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Environmental Pollution*, 262, 114271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114271>
- Do, L. T. K., Luu, V. V., Morita, Y., Taniguchi, M., Nii, M., Peter, A. T., & Otoi, T. (2015). Astaxanthin present in the maturation medium reduces negative effects of heat shock on the developmental competence of porcine oocytes. *Reproductive Biology*, 15(2), 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2015.01.002>
- Donoso, A., González-Durán, J., Muñoz, A. A., González, P. A., & Agurto-Muñoz, C. (2021). “Therapeutic uses of natural astaxanthin: An evidence-based review focused on human clinical trials”. *Pharmacological Research*, 166, 105479. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105479>
- Dorée, M., & Hunt, T. (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *Journal of Cell Science*, 115(12), 2461-2464. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.12.2461>
- dos Santos, A. A., Naime, A. A., de Oliveira, J., Colle, D., dos Santos, D. B., Hort, M. A., ... Farina, M. (2016). Long-term and low-dose malathion exposure causes cognitive impairment in adult mice: evidence of hippocampal mitochondrial dysfunction, astrogliosis and apoptotic events. *Archives of Toxicology*, 90(3), 647-660. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1466-0>
- Dumollard, R., Duchen, M., & Sardet, C. (2006). Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17(2), 314-323. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.02.009>
- Duran, H. E., Simsek-Duran, F., Oehninger, S. C., Jones, H. W., & Castora, F. J. (2011). The association of reproductive senescence with mitochondrial quantity, function, and DNA integrity in human oocytes at different stages of maturation. *Fertility and Sterility*, 96(2), 384-388. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.056>

- Ebeling, S., Labudda, A., & Meinecke, B. (2010). *In Vitro* Ageing of Porcine Oocytes: Changes in Phosphorylation of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Parthenogenetic Activability. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01588.x>
- Edwards, R. G. (1965). Maturation In Vitro of Human Ovarian Oocytes. *The Lancet*, 286(7419), 926-929. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(65\)92903-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(65)92903-X)
- Eppig, J. J. (1985). Oocyte-Somatic Cell Interactions During Oocyte Growth and Maturation in the Mammal. İçinde *Oogenesis* (ss. 313-347). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6814-8_7
- Eroschenko, V. P. (2013). *diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations* (12. Edition). Hong Kong: Lippincott Williams & Wilkins.
- Esen, M., & Uysal, M. (2018). Protective effects of intravenous lipid emulsion on malathion-induced hepatotoxicity. *Bratislava Medical Journal*, 119(06), 373-378. https://doi.org/10.4149/BLL_2018_069
- Fakhri, S., Abbaszadeh, F., Dargahi, L., & Jorjani, M. (2018). Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits. *Pharmacological Research*, 136, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.012>
- Familiari, G., Heyn, R., Relucenti, M., Nottola, S. A., & Sathananthan, A. H. (2006). *Ultrastructural Dynamics of Human Reproduction, from Ovulation to Fertilization and Early Embryo Development*1. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)49002-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)49002-1)
- Fan, H.-Y., Liu, Z., Shimada, M., Sterneck, E., Johnson, P. F., Hedrick, S. M., & Richards, J. S. (2009). MAPK3/1 (ERK1/2) in Ovarian Granulosa Cells Are Essential for Female Fertility. *Science*, 324(5929), 938-941. <https://doi.org/10.1126/science.1171396>
- Fan, H.-Y., & Sun, Q.-Y. (2004a). Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals1. *Biology of Reproduction*, 70(3), 535-547. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022830>
- Fan, H.-Y., & Sun, Q.-Y. (2004b). Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals1. *Biology of Reproduction*, 70(3), 535-547. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022830>

- Fang, L., Sun, Y.-P., & Cheng, J.-C. (2023). The role of amphiregulin in ovarian function and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80(3), 60. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04709-8>
- FitzHarris, G., Marangos, P., & Carroll, J. (2007). Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Developmental Biology*, 305(1), 133-144. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.02.006>
- Flores, D., Souza, V., Betancourt, M., Teteltitla, M., González-Márquez, H., Casas, E., ... Duclomb, Y. (2017). Oxidative stress as a damage mechanism in porcine cumulus-oocyte complexes exposed to malathion during in vitro maturation. *Environmental Toxicology*, 32(6), 1669-1678. <https://doi.org/10.1002/tox.22384>
- Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griendling, K. K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation Research*, 122(6), 877-902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>
- Fortunato, J. J., Feier, G., Vitali, A. M., Petronilho, F. C., Dal-Pizzol, F., & Quevedo, J. (2006). Malathion-induced Oxidative Stress in Rat Brain Regions. *Neurochemical Research*, 31(5), 671-678. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9065-3>
- Francis, S., Saavedra-Rodriguez, K., Perera, R., Paine, M., Black, W. C., & Delgoda, R. (2017). Insecticide resistance to permethrin and malathion and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from St. Andrew Jamaica. *PLOS ONE*, 12(6), e0179673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179673>
- Frei, B., Stocker, R., & Ames, B. N. (1988). Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(24), 9748-9752. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9748>
- Friday, B. B., & Adjei, A. A. (2008). Advances in Targeting the Ras/Raf/MEK/Erk Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade with MEK Inhibitors for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 14(2), 342-346. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4790>
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419-425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>

- Geng, X., Shao, H., Zhang, Z., Ng, J. C., & Peng, C. (2015). Malathion-induced testicular toxicity is associated with spermatogenic apoptosis and alterations in testicular enzymes and hormone levels in male Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 659-667. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.01.010>
- German, J. B. (1999). *Food Processing and Lipid Oxidation*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4853-9_3
- Gilchrist, R. B., Luciano, A. M., Richani, D., Zeng, H. T., Wang, X., Vos, M. De, ... Thompson, J. G. (2016a). Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction*, 152(5), R143-R157. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0606>
- Gilchrist, R. B., Luciano, A. M., Richani, D., Zeng, H. T., Wang, X., Vos, M. De, ... Thompson, J. G. (2016b). Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction*, 152(5), R143-R157. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0606>
- Gordo, A. C., Rodrigues, P., Kurokawa, M., Jellerette, T., Exley, G. E., Warner, C., & Fissore, R. (2002). Intracellular Calcium Oscillations Signal Apoptosis Rather than Activation in In Vitro Aged Mouse Eggs1. *Biology of Reproduction*, 66(6), 1828-1837. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1828>
- Granot, I. & Dekel, N. (1994). Phosphorylation and expression of connexin-43 ovarian gap junction protein are regulated by luteinizing hormone. *The Journal of biological chemistry*, 269(48), 30502-30509.
- Granot, Irit, Bechor, E., Barash, A., & Dekel, N. (2002). Connexin43 in Rat Oocytes: Developmental Modulation of Its Phosphorylation1. *Biology of Reproduction*, 66(3), 568-573. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.3.568>
- Gulyas, B. J. (1980). *Cortical Granules of Mammalian Eggs*. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61762-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61762-3)
- Gumus, E., Bulut, H. E., & Kaloglu, C. (2010). Cytoskeletal Changes in Oocytes and Early Embryos During *in vitro* Fertilization Process in Mice. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 39(1), 51-58. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2009.00982.x>
- Gumus, Erkan, Sisko, A., Abas, B. I., Demirkan, B., & Cevik, O. (2023). Quercetin protects mouse oocytes against chromium-induced damage in vitro and in vivo. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 75, 127087. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.127087>

- Gupta, R. C., Miller Mukherjee, I. R., Doss, R. B., Malik, J. K., & Milatovic, D. (2017). Organophosphates and Carbamates. İçinde *Reproductive and Developmental Toxicology* (ss. 609-631). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00035-4>
- Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., ... Straif, K. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16(5), 490-491. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8)
- Halliwell, B. (1995a). Antioxidant characterization. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1341-1348. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00088-H](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00088-H)
- Halliwell, B. (1995b). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposia*, 61, 73-101. <https://doi.org/10.1042/bss0610073>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 125-126. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)91457-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)91457-3)
- Han, Y., Luo, H., Wang, H., Cai, J., & Zhang, Y. (2017). SIRT1 induces resistance to apoptosis in human granulosa cells by activating the ERK pathway and inhibiting NF- κ B signaling with anti-inflammatory functions. *Apoptosis*, 22(10), 1260-1272. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1386-y>
- Hashimoto, N., Watanabe, N., Furuta, Y., Tamemoto, H., Sagata, N., Yokoyama, M., ... Aizawai, S. (1994). Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature*, 370(6484), 68-71. <https://doi.org/10.1038/370068a0>
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 185-196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
- Hinckley, M., Vaccari, S., Horner, K., Chen, R., & Conti, M. (2005). The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Developmental Biology*, 287(2), 249-261. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.019>
- Hosoe, M., & shioya, Y. (1997). Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote*, 5(4), 371-376. <https://doi.org/10.1017/S0967199400003956>

- Howard, M. D., & Pope, C. N. (2002). In vitro effects of chlorpyrifos, parathion, methyl parathion and their oxons on cardiac muscarinic receptor binding in neonatal and adult rats. *Toxicology*, 170(1-2), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00498-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00498-X)
- Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., ... Conti, M. (2007). Luteinizing Hormone-Dependent Activation of the Epidermal Growth Factor Network Is Essential for Ovulation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(5), 1914-1924. <https://doi.org/10.1128/MCB.01919-06>
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 54-67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>
- Hwang, J.-L., Lin, Y.-H., & Tsai, Y.-L. (2000). In Vitro Maturation and Fertilization of Immature Oocytes: A Comparative Study of Fertilization Techniques. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17(1), 39-43. <https://doi.org/10.1023/A:1009450014064>
- Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Demirel, H. H., Varol, N., Ozyurek, H. A., Zemheri, F., & Kucukkurt, I. (2017). Taurine alleviates malathion induced lipid peroxidation, oxidative stress, and proinflammatory cytokine gene expressions in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 263-268. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.141>
- Ispada, J., Rodrigues, T. A., Risolia, P. H. B., Lima, R. S., Gonçalves, D. R., Rettori, D., ... Paula-Lopes, F. F. (2018). Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(9), 1169. <https://doi.org/10.1071/RD17271>
- Jacob, R. A. (1996). Three eras of vitamin C discovery. *Sub-cellular biochemistry*, 25, 1-16.
- Jayaraj, R., Megha, P., & Sreedev, P. (2016). Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology*, 9(3-4), 90-100. <https://doi.org/10.1515/intox-2016-0012>
- Jensen, I. M., & Whatling, P. (2010a). Malathion. İçinde *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (ss. 1527-1542). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00071-9>
- Jensen, I. M., & Whatling, P. (2010b). Malathion. İçinde *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (ss. 1527-1542). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00071-9>

- Jia, B.-Y., Xiang, D.-C., Shao, Q.-Y., Zhang, B., Liu, S.-N., Hong, Q.-H., ... Wu, G.-Q. (2020). Inhibitory effects of astaxanthin on postovulatory porcine oocyte aging in vitro. *Scientific Reports*, 10(1), 20217. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77359-6>
- Jiang, Y., He, Y., Pan, X., Wang, P., Yuan, X., & Ma, B. (2023). Advances in Oocyte Maturation In Vivo and In Vitro in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 9059. <https://doi.org/10.3390/ijms24109059>
- Jiang, Z., & Shen, H. (2022). Mitochondria: emerging therapeutic strategies for oocyte rescue. *Reproductive Sciences*, 29(3), 711-722. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00523-4>
- Jokanović, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(3), 139-160. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2)
- Jokanović, M., & Kosanović, M. (2010). Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29(3), 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.01.006>
- Jones, R. E., & Lopez, K. H. (2013). *Human Reproductive Biology* (4. Baskı). Academic Press.
- Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Junttila, M. R., Li, S., & Westermarck, J. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *The FASEB Journal*, 22(4), 954-965. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7859rev>
- Kalma, Y., Granot, I., Galiani, D., Barash, A., & Dekel, N. (2004). Luteinizing Hormone-Induced Connexin 43 Down-Regulation: Inhibition of Translation. *Endocrinology*, 145(4), 1617-1624. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1051>
- Kalous, J., Tetkova, A., Kubelka, M., & Susor, A. (2018). Importance of ERK1/2 in Regulation of Protein Translation during Oocyte Meiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 698. <https://doi.org/10.3390/ijms19030698>
- Kidder, G. M., & Vanderhyden, B. C. (2010). Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(4), 399-413. <https://doi.org/10.1139/Y10-009>

- Kim, K.-H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment*, 575, 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kirilova, A., Smitz, J. E. J., Sukhikh, G. T., & Mazunin, I. (2021). The Role of Mitochondria in Oocyte Maturation. *Cells*, 10(9), 2484. <https://doi.org/10.3390/cells10092484>
- Kline, D. (2000). *Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs*. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(00\)50007-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(00)50007-6)
- Koc, N. D., Kayhan, F. E., Sesal, C., & Muslu, M. N. (2009). Dose-Dependent Effects of Endosulfan and Malathion on Adult Wistar Albino Rat Ovaries. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(6), 498-503. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2009.498.503>
- Kotha, R. R., Tareq, F. S., Yildiz, E., & Luthria, D. L. (2022a). Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxidants*, 11(12), 2388. <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>
- Kotha, R. R., Tareq, F. S., Yildiz, E., & Luthria, D. L. (2022b). Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxidants*, 11(12), 2388. <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>
- Krinsky, N. I. (1992). Mechanism of Action of Biological Antioxidants. *Experimental Biology and Medicine*, 200(2), 248-254. <https://doi.org/10.3181/00379727-200-43429>
- Krisher, R. L., & Bavister, B. D. (1998). Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, 49(1), 103-114. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00405-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00405-6)
- Kumar, S., Sharma, A., & Kshetrimayum, C. (2019). Environmental & occupational exposure & female reproductive dysfunction. *Indian Journal of Medical Research*, 150(6), 532. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1652_17
- Kurashige, M., Okimasu, E., Inoue, M., & Utsumi, K. (1990). Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiological chemistry and physics and medical NMR*, 22(1), 27-38.
- Kuruş, M. (Ed.). (2020). Kadın Genital Sistem. İçinde *Histoloji: Hücre, Doku, Sistemler, Teknikler, Moleküller, Laboratuvar, Klinik Yönleriyle Yaklaşımlar* (ss. 941-988). Ankara: Akademisyen Kitabevi A.Ş.

- Kuyucu, Y., & Tap, Ö. (2009). Oosit Olgunlaşma Süreci ve Düzenleyici Faktörler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 18(4), 227-240.
- Kwon, H. B., & Schuetz, A. W. (1986). Role of cAMP in modulating intrafollicular progesterone levels and oocyte maturation in amphibians (*Rana pipiens*). *Developmental Biology*, 117(2), 354-364. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90305-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90305-2)
- Kwong, T. C. (2002). Organophosphate Pesticides: Biochemistry and Clinical Toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24(1), 144-149. <https://doi.org/10.1097/00007691-200202000-00022>
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiological Reviews*, 81(2), 807-869. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.807>
- Lee, H. H., Lee, H. J., Kim, H. J., Lee, J. H., Ko, Y., Kim, S. M., ... Kim, S. H. (2015). Effects of antifreeze proteins on the vitrification of mouse oocytes: comparison of three different antifreeze proteins. *Human Reproduction*, 30(9), 2110-2119. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev170>
- Lee, Y. H., Yang, J. X., Allen, J. C., Tan, C. S., Chern, B. S. M., Tan, T. Y., ... Chan, J. K. Y. (2018). Elevated peritoneal fluid ceramides in human endometriosis-associated infertility and their effects on mouse oocyte maturation. *Fertility and Sterility*, 110(4), 767-777.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.05.003>
- Leemans, M., Couderq, S., Demeneix, B., & Fini, J.-B. (2019). Pesticides With Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00743>
- Leese, H. J., Biggers, J. D., Mroz, E. A., & Lechene, C. (1984). Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. *Analytical Biochemistry*, 140(2), 443-448. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90191-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90191-X)
- Lefebvre, C., Terret, M. E., Djiane, A., Rassinier, P., Maro, B., & Verlhac, M.-H. (2002). Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *The Journal of Cell Biology*, 157(4), 603-613. <https://doi.org/10.1083/jcb.200202052>

- Li, F., Xu, K., Ni, M., Wang, B., Gu, Z., Shen, W., & Li, B. (2017). Effect of oxidative phosphorylation signaling pathway on silkworm midgut following exposure to phoxim. *Environmental Toxicology*, 32(1), 167-175. <https://doi.org/10.1002/tox.22222>
- Li, J., Mao, G., & Xia, G. (2012). FSH Modulates PKAI and GPR3 Activities in Mouse Oocyte of COC in a Gap Junctional Communication (GJC)-Dependent Manner to Initiate Meiotic Resumption. *PLoS ONE*, 7(9), e37835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037835>
- Li, R., & Albertini, D. F. (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(3), 141-152. <https://doi.org/10.1038/nrm3531>
- Li, T. Y., Colley, D., Barr, K. J., Yee, S.-P., & Kidder, G. M. (2007). Rescue of oogenesis in Cx37-null mutant mice by oocyte-specific replacement with Cx43. *Journal of Cell Science*, 120(23), 4117-4125. <https://doi.org/10.1242/jcs.03488>
- Li, W., Yu, S., Luo, S., Shen, W., Yin, S., & Sun, Q. (2019). Melatonin defends mouse oocyte quality from benzo[ghi]perylene-induced deterioration. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 6220-6229. <https://doi.org/10.1002/jcp.27351>
- Lincoln, A. J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R. M., Palko, M. E., De Miguel, M. P. De, ... Donovan, P. J. (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genetics*, 30(4), 446-449. <https://doi.org/10.1038/ng856>
- Liu, L., Trimarchi, J. R., & Keefe, D. L. (2000). Involvement of Mitochondria in Oxidative Stress-Induced Cell Death in Mouse Zygotes1. *Biology of Reproduction*, 62(6), 1745-1753. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1745>
- Liu, S., Jiang, L., Zhong, T., Kong, S., Zheng, R., Kong, F., ... An, L. (2015). Effect of Acrylamide on Oocyte Nuclear Maturation and Cumulus Cells Apoptosis in Mouse In Vitro. *PLOS ONE*, 10(8), e0135818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135818>
- Liu, Z., Fan, H.-Y., Wang, Y., & Richards, J. S. (2010). Targeted Disruption of Mapk14 (p38MAPK α) in Granulosa Cells and Cumulus Cells Causes Cell-Specific Changes in Gene Expression Profiles that Rescue COC Expansion and Maintain Fertility. *Molecular Endocrinology*, 24(9), 1794-1804. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0086>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

- Lukaszewicz-Hussain, A. (2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(2), 145-150. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.006>
- Luo, X., Zhao, J., Li, C., Bai, Y., Reetz, M. T., Yu, H., & Xu, J. (2016). Combinatorial evolution of phosphotriesterase toward a robust malathion degrader by hierarchical iteration mutagenesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(11), 2350-2357. <https://doi.org/10.1002/bit.26012>
- Ma, W., Zhang, D., Hou, Y., Li, Y.-H., Sun, Q.-Y., Sun, X.-F., & Wang, W.-H. (2005). Reduced Expression of MAD2, BCL2, and MAP Kinase Activity in Pig Oocytes after In Vitro Aging Are Associated with Defects in Sister Chromatid Segregation During Meiosis II and Embryo Fragmentation After Activation1. *Biology of Reproduction*, 72(2), 373-383. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030999>
- Maller, J. L., Schwab, M. S., Gross, S. D., Taieb, F. E., Roberts, B. T., & Tinquist, B. J. (2002). The mechanism of CSF arrest in vertebrate oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1-2), 173-178. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00695-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00695-5)
- Mann, J. S., Lowther, K. M., & Mehlmann, L. M. (2010). Reorganization of the Endoplasmic Reticulum and Development of Ca²⁺ Release Mechanisms During Meiotic Maturation of Human Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 83(4), 578-583. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085985>
- 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), 284-299. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.10.016>
- Masoud, L. (2003). Effect of malathion on apoptosis of murine L929 fibroblasts: a possible mechanism for toxicity in low dose exposure. *Toxicology*, 185(1-2), 89-102. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00596-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00596-6)
- Masui, Y. (2001). From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation*, 69(1), 1-17. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2001.690101.x>
- May-Panloup, P., Boucret, L., Chao de la Barca, J.-M., Desquiret-Dumas, V., Ferré-L'Hotellier, V., Morinière, C., ... Reynier, P. (2016). Ovarian ageing: the role of mitochondria in

- oocytes and follicles. *Human Reproduction Update*, 22(6), 725-743. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw028>
- Mehlmann, L. M. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130(6), 791-799. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00793>
- Mehlmann, L. M., Terasaki, M., Jaffe, L. A., & Kline, D. (1995). Reorganization of the Endoplasmic Reticulum during Meiotic Maturation of the Mouse Oocyte. *Developmental Biology*, 170(2), 607-615. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1240>
- Meraldi, P., Draviam, V. M., & Sorger, P. K. (2004). Timing and Checkpoints in the Regulation of Mitotic Progression. *Developmental Cell*, 7(1), 45-60. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.06.006>
- Miyagaki, Y., Kanemori, Y., & Baba, T. (2011). Possible involvement of mitogen- and stress-activated protein kinase 1, MSK1, in metaphase-II arrest through phosphorylation of EMI2 in mouse oocytes. *Developmental Biology*, 359(1), 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.08.021>
- Mnif, W., Hassine, A. I. H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., & Roig, B. (2011). Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(6), 2265-2303. <https://doi.org/10.3390/ijerph8062265>
- Moreira, S., Pereira, S. C., Seco-Rovira, V., Oliveira, P. F., Alves, M. G., & Pereira, M. de L. (2021). Pesticides and Male Fertility: A Dangerous Crosstalk. *Metabolites*, 11(12), 799. <https://doi.org/10.3390/metabo11120799>
- Moreno, R. D., Schatten, G., & Ramalho-Santos, J. (2002). Golgi Apparatus Dynamics During Mouse Oocyte In Vitro Maturation: Effect of the Membrane Trafficking Inhibitor Brefeldin A1. *Biology of Reproduction*, 66(5), 1259-1266. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.5.1259>
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157-177. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2017a). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, 91(2), 549-599. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>

- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2017b). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, 91(2), 549-599. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
- Motta, P. M., Nottola, S. A., Makabe, S., & Heyn, R. (2000). Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Human Reproduction*, 15(suppl 2), 129-147. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_2.129
- Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., ... Halliwell, B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, 4(6), 651-662. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>
- Nassan, F. L., Chavarro, J. E., & Tanrikut, C. (2018). Diet and men's fertility: does diet affect sperm quality? *Fertility and Sterility*, 110(4), 570-577. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.05.025>
- Ni, H., Sheng, X., Cui, X., Gu, M., Liu, Y., Qi, X., ... Guo, Y. (2015). Epidermal Growth Factor-Mediated Mitogen-Activated Protein Kinase3/1 Pathway Is Conducive to In Vitro Maturation of Sheep Oocytes. *PLOS ONE*, 10(3), e0120418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120418>
- Nicholas, A. H., Vienne, M., & van den Berghe, H. (1979). Induction of sister-chromatid exchanges in cultured human cells by an organophosphorous insecticide: Malathion. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 67(2), 167-172. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(79\)90128-9](https://doi.org/10.1016/0165-1218(79)90128-9)
- Niki, E. (1993). Antioxidant Defenses In Eukariotic Cells: An Overview. İçinde *Free Radicals: from Basic Science to Medicine* (ss. 365-373). Basel: Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9116-5_31
- Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*, 37, 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
- Norris, R. P., Freudzon, M., Nikolaev, V. O., & Jaffe, L. A. (2010). Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. *REPRODUCTION*, 140(5), 655-662. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0288>

- Nunes, C., Silva, J. V., Silva, V., Torgal, I., & Fardilha, M. (2015). Signalling pathways involved in oocyte growth, acquisition of competence and activation. *Human Fertility*, 18(2), 149-155. <https://doi.org/10.3109/14647273.2015.1006692>
- Okada, Y., Ishikura, M., & Maoka, T. (2009). Bioavailability of Astaxanthin in *Haematococcus* Algal Extract: The Effects of Timing of Diet and Smoking Habits. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(9), 1928-1932. <https://doi.org/10.1271/bbb.90078>
- Ozsoy, A. Z., Nursal, A. F., Karsli, M. F., Uysal, M., Alici, O., Butun, I., ... Delibas, I. B. (2016). Protective effect of intravenous lipid emulsion treatment on malathion-induced ovarian toxicity in female rats. *European review for medical and pharmacological sciences*, 20(11), 2425-2434.
- Padgett, L. E., Broniowska, K. A., Hansen, P. A., Corbett, J. A., & Tse, H. M. (2013). The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1281(1), 16-35. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06826.x>
- Paronetto, M. P., Giorda, E., Carsetti, R., Rossi, P., Geremia, R., & Sette, C. (2004). Functional interaction between p90Rsk2 and Emi1 contributes to the metaphase arrest of mouse oocytes. *The EMBO Journal*, 23(23), 4649-4659. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600448>
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153-183. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science : IJBS*, 4(2), 89-96.
- Phillips, D. M., & Dekel, N. (1991). Maturation of the rat cumulus-oocyte complex: Structure and function. *Molecular Reproduction and Development*, 28(3), 297-306. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080280313>
- Pimienta, G., & Pascual, J. (2007). Canonical and Alternative MAPK Signaling. *Cell Cycle*, 6(21), 2628-2632. <https://doi.org/10.4161/cc.6.21.4930>

- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619-1633. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012>
- Pocar, P., Brevini, T., Fischer, B., & Gandolfi, F. (2003). The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction*, 125(3), 313-325. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250313>
- Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F., & Cooper, J. A. (1993). Mos Stimulates MAP Kinase in *Xenopus* Oocytes and Activates a MAP Kinase Kinase In Vitro. *Molecular and Cellular Biology*, 13(4), 2546-2553. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.4.2546-2553.1993>
- Raghu, P., Madhusudana Reddy, T., Reddaiah, K., Kumara Swamy, B. E., & Sreedhar, M. (2014). Acetylcholinesterase based biosensor for monitoring of Malathion and Acephate in food samples: A voltammetric study. *Food Chemistry*, 142, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.047>
- Ramirez-Vargas, M. A., Huerta-Beristain, G., Guzman-Guzman, I. P., Alarcon-Romero, L. del C., Flores-Alfaro, E., Rojas-Garcia, A. E., & Moreno-Godinez, M. E. (2017). Methamidophos induces cytotoxicity and oxidative stress in human peripheral blood mononuclear cells. *Environmental Toxicology*, 32(1), 147-155. <https://doi.org/10.1002/tox.22220>
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981-990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Reed, N. R., & Rubin, A. L. (2014). Malathion. İçinde *Encyclopedia of Toxicology* (ss. 133-137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00156-1>
- Rice-Evans, C. A., & Diplock, A. T. (1993). Current status of antioxidant therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(1), 77-96. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90127-G](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90127-G)

- Richani, D., & Gilchrist, R. B. (2018). The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human Reproduction Update*, 24(1), 1-14. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx029>
- Rieger, D. K., Dos Santos, A. A., Suñol, C., & Farina, M. (2017a). Involvement of superoxide in malaoxon-induced toxicity in primary cultures of cortical neurons. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(19-21), 1106-1115. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1357305>
- Rieger, D. K., Dos Santos, A. A., Suñol, C., & Farina, M. (2017b). Involvement of superoxide in malaoxon-induced toxicity in primary cultures of cortical neurons. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(19-21), 1106-1115. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1357305>
- Riley, J. C. M., & Behrman, H. R. (1991). Oxygen Radicals and Reactive Oxygen Species in Reproduction. *Experimental Biology and Medicine*, 198(3), 781-791. <https://doi.org/10.3181/00379727-198-43321C>
- Romek, M., Gajda, B., Rolka, M., & Smorąg, Z. (2011). Mitochondrial Activity and Morphology in Developing Porcine Oocytes and Pre-implantation Non-Cultured and Cultured Embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(3), 471-480. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01691.x>
- Rosas, L. G., & Eskenazi, B. (2008). Pesticides and child neurodevelopment. *Current Opinion in Pediatrics*, 20(2), 191-197. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3282f60a7d>
- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105-143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2011). Female Reproductive System. İçinde *Histology: A Text And Atlas* (6. bs, ss. 830-896). China: Lippincott Williams&Wilkins.
- Sadler, Thomas W. (2022). Gametogenez: Germ Hücrelerinin Erkek ve Dişi Gametlere Dönüşmesi. İçinde *Langman Medikal Embriyoloji* (13. Baskıdan Çeviri, ss. 14-33). Ankara: Palme Yayınevi.
- Sadler, T.W. (2012). *Langman's Medical Embryology* (12. Edition). Hong Kong: Lippincott Williams & Wilkins.
- Said, R. S., Badr, A. M., Nada, A. S., & El-Demerdash, E. (2014). Sodium selenite treatment restores long-lasting ovarian damage induced by irradiation in rats: Impact on oxidative

- stress and apoptosis. *Reproductive Toxicology*, 43, 85-93.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.11.005>
- Sánchez-Santed, F., Colomina, M. T., & Herrero Hernández, E. (2016). Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex*, 74, 417-426.
<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2015.10.003>
- Sathananthan, A. Henry. (1994). Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: Unique aspects of the human oocyte. *Microscopy Research and Technique*, 27(2), 145-164. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070270208>
- Sathananthan, A.H., & Trounson, A. O. (2000). Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Human Reproduction*, 15(suppl 2), 148-159.
https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_2.148
- Schuel, H. (1978). Secretory functions of egg cortical granules in fertilization and development: A critical review. *Gamete Research*, 1(3-4), 299-382.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1120010311>
- Schuh, M., & Ellenberg, J. (2008). A New Model for Asymmetric Spindle Positioning in Mouse Oocytes. *Current Biology*, 18(24), 1986-1992. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.022>
- Schwab, M. S., Roberts, B. T., Gross, S. D., Tunquist, B. J., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., & Maller, J. L. (2001). Bub1 is activated by the protein kinase p90 Rsk during *Xenopus* oocyte maturation. *Current Biology*, 11(3), 141-150. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00045-8)
- Sela-Abramovich, S., Chorev, E., Galiani, D., & Dekel, N. (2005). Mitogen-Activated Protein Kinase Mediates Luteinizing Hormone-Induced Breakdown of Communication and Oocyte Maturation in Rat Ovarian Follicles. *Endocrinology*, 146(3), 1236-1244.
<https://doi.org/10.1210/en.2004-1006>
- Sela-Abramovich, S., Edry, I., Galiani, D., Nevo, N., & Dekel, N. (2006a). Disruption of Gap Junctional Communication within the Ovarian Follicle Induces Oocyte Maturation. *Endocrinology*, 147(5), 2280-2286. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1011>
- Sela-Abramovich, S., Edry, I., Galiani, D., Nevo, N., & Dekel, N. (2006b). Disruption of Gap Junctional Communication within the Ovarian Follicle Induces Oocyte Maturation. *Endocrinology*, 147(5), 2280-2286. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1011>

- Senthilkumaran, B. (2015). Pesticide- and sex steroid analogue-induced endocrine disruption differentially targets hypothalamo–hypophyseal–gonadal system during gametogenesis in teleosts – A review. *General and Comparative Endocrinology*, 219, 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.010>
- Sha, Q.-Q., Dai, X.-X., Jiang, J.-C., Yu, C., Jiang, Y., Liu, J., ... Fan, H.-Y. (2018). CFP1 coordinates histone H3 lysine-4 trimethylation and meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. *Nature Communications*, 9(1), 3477. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05930-x>
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., ... Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1446. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- Shayeghi, M., Dehghani, M., Alimohammadi, M., & Goodini, K. (2012). Using ultraviolet irradiation for removal of malathion pesticide in water. *Journal of arthropod-borne diseases*, 6(1), 45-53.
- Shieh, P., Jan, C.-R., & Liang, W.-Z. (2019). The protective effects of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) against oxidative stress-associated apoptosis evoked by the organophosphorus insecticide malathion in normal human astrocytes. *Toxicology*, 417, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.02.004>
- Si, P., & Zhu, C. (2022). Biological and neurological activities of astaxanthin (Review). *Molecular Medicine Reports*, 26(4), 300. <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12816>
- Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., ... Winterbourn, C. (2022). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(7), 499-515. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>
- Sirard, M.-A., Richard, F., Blondin, P., & Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>
- Slotte, H., Gustafson, O., Nylund, L., & Pousette, Å. (1990). ATP and ADP in human pre-embryos. *Human Reproduction*, 5(3), 319-322. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137097>

- Solc, P., Schultz, R. M., & Motlik, J. (2010). Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Molecular Human Reproduction*, 16(9), 654-664. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq034>
- Soltaninejad, K., & Shadnia, S. (2014). History of the Use and Epidemiology of Organophosphorus Poisoning. İçinde *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds* (ss. 25-43). London: Springer London. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5625-3_2
- Son, W.-Y., Lee, S.-Y., & Lim, J.-H. (2005). Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in in vitro maturation cycles*. *Human Reproduction*, 20(11), 3204-3207. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei195>
- Soto-Heras, S., & Paramio, M.-T. (2020). Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. *Research in Veterinary Science*, 132, 342-350. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.013>
- Söderström-Anttila, V., Mäkinen, S., Tuuri, T., & Suikkari, A.-M. (2005). Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients. *Human Reproduction*, 20(6), 1534-1540. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh768>
- Sproul, E. P., & Argraves, W. S. (2013). A cytokine axis regulates elastin formation and degradation. *Matrix Biology*, 32(2), 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.11.004>
- Stadler, W. M. (2005). Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer*, 104(11), 2323-2333. <https://doi.org/10.1002/cncr.21453>
- Stojkovic, M., Machado, S. A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves, P. B., & Wolf, E. (2001). Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture1. *Biology of Reproduction*, 64(3), 904-909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>
- Strączyńska, P., Papis, K., Morawiec, E., Czerwiński, M., Gajewski, Z., Olejek, A., & Bednarska-Czerwińska, A. (2022). Signaling mechanisms and their regulation during in vivo or in vitro maturation of mammalian oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00906-5>

- Su, Y.-Q., Denegre, J. M., Wigglesworth, K., Pendola, F. L., O'Brien, M. J., & Eppig, J. J. (2003). Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte–cumulus cell complex. *Developmental Biology*, 263(1), 126-138. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00437-8](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00437-8)
- Su, Y.-Q., Sugiura, K., Li, Q., Wigglesworth, K., Matzuk, M. M., & Eppig, J. J. (2010). Mouse Oocytes Enable LH-Induced Maturation of the Cumulus-Oocyte Complex via Promoting EGF Receptor-Dependent Signaling. *Molecular Endocrinology*, 24(6), 1230-1239. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0497>
- Sugimura, S., Ritter, L. J., Rose, R. D., Thompson, J. G., Smitz, J., Mottershead, D. G., & Gilchrist, R. B. (2015). Promotion of EGF receptor signaling improves the quality of low developmental competence oocytes. *Developmental Biology*, 403(2), 139-149. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.05.008>
- Sun, Q.-Y., Miao, Y.-L., & Schatten, H. (2009). Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle*, 8(17), 2741-2747. <https://doi.org/10.4161/cc.8.17.9471>
- Sun, Q.-Y., & Schatten, H. (2006). Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*, 131(2), 193-205. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00847>
- Sun, S., Xiong, B., Lu, S., & Sun, Q. (2008). MEK1/2 is a critical regulator of microtubule assembly and spindle organization during rat oocyte meiotic maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 75(10), 1542-1548. <https://doi.org/10.1002/mrd.20891>
- Suzuki, T., Suzuki, E., Yoshida, N., Kubo, A., Li, H., Okuda, E., ... Perry, A. C. F. (2010). Mouse Emi2 as a distinctive regulatory hub in second meiotic metaphase. *Development*, 137(19), 3281-3291. <https://doi.org/10.1242/dev.052480>
- Szollosi, D. (1967). Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and Hamster eggs. *The Anatomical Record*, 159(4), 431-446. <https://doi.org/10.1002/ar.1091590412>
- Takahashi, N., & Hashizume, M. (2014). A systematic review of the influence of occupational organophosphate pesticides exposure on neurological impairment. *BMJ Open*, 4(6), e004798. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-004798>

- TANABE, M., TAMURA, H., TAKETANI, T., OKADA, M., LEE, L., TAMURA, I., ... SUGINO, N. (2015). Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. *Journal of Reproduction and Development*, 61(1), 35-41. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-105>
- Tarazona, A., Rodríguez, J., Restrepo, L., & Olivera-Angel, M. (2006). Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced *in Vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 5-11. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00615.x>
- Terret, M. E., Lefebvre, C., Djiane, A., Rassinier, P., Moreau, J., Maro, B., & Verlhac, M.-H. (2003). DOC1R: a MAP kinase substrate that control microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. *Development*, 130(21), 5169-5177. <https://doi.org/10.1242/dev.00731>
- Theurkauf, W. E., Smiley, S., Wong, M. L., & Alberts, B. M. (1992). Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development*, 115(4), 923-936. <https://doi.org/10.1242/dev.115.4.923>
- Tinkler, J. H., Böhm, F., Schalch, W., & Truscott, T. G. (1994). Dietary carotenoids protect human cells from damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 26(3), 283-285. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(94\)07049-0](https://doi.org/10.1016/1011-1344(94)07049-0)
- Tiwari, M., Gupta, A., Sharma, A., Prasad, S., Pandey, A. N., Yadav, P. K., ... Chaube, S. K. (2018). Role of Mitogen Activated Protein Kinase and Maturation Promoting Factor During the Achievement of Meiotic Competency in Mammalian Oocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 123-129. <https://doi.org/10.1002/jcb.26184>
- Tiwari, M., Prasad, S., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2017). Calcium Signaling During Meiotic Cell Cycle Regulation and Apoptosis in Mammalian Oocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 232(5), 976-981. <https://doi.org/10.1002/jcp.25670>
- Tong, C., Fan, H. Y., Chen, D. Y., Song, X. F., Schatten, H., & Sun, Q. Y. (2003). Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocytes: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Research*, 13(5), 375-383. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290183>

- Tume, R. K., Sikes, A. L., Tabrett, S., & Smith, D. M. (2009). Effect of background colour on the distribution of astaxanthin in black tiger prawn (*Penaeus monodon*): Effective method for improvement of cooked colour. *Aquaculture*, 296(1-2), 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.006>
- Vaccari, S., Horner, K., Mehlmann, L. M., & Conti, M. (2008). Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: Endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Developmental Biology*, 316(1), 124-134. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.01.018>
- Vaccari, S., Weeks, J. L., Hsieh, M., Menniti, F. S., & Conti, M. (2009). Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 81(3), 595-604. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077768>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Van Blerkom, J., Davis, P. W., & Lee, J. (1995). Fertilization and early embryology: ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Human Reproduction*, 10(2), 415-424. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135954>
- Veith, A., & Moorthy, B. (2018). Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.003>
- Venkidasamy, B., Subramanian, U., Samynathan, R., Rajakumar, G., Shariati, M. A., Chung, I.-M., & Thiruvengadam, M. (2021). Organopesticides and fertility: where does the link lead to? *Environmental Science and Pollution Research*, 28(6), 6289-6301. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12155-3>
- Verlhac, M.-H., Kubiak, J. Z., Clarke, H. J., & Maro, B. (1994). Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*, 120(4), 1017-1025. <https://doi.org/10.1242/dev.120.4.1017>

- Verlhac, M.-H., Kubiak, J. Z., Weber, M., Géraud, G., Colledge, W. H., Evans, M. J., & Maro, B. (1996). Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development*, 122(3), 815-822. <https://doi.org/10.1242/dev.122.3.815>
- Verlhac, M.-H., Lefebvre, C., Guillaud, P., Rassinier, P., & Maro, B. (2000). Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Current Biology*, 10(20), 1303-1306. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00753-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00753-3)
- Vigone, G., Shuhaibar, L. C., Egbert, J. R., Uliasz, T. F., Movsesian, M. A., & Jaffe, L. A. (2018). Multiple cAMP Phosphodiesterases Act Together to Prevent Premature Oocyte Meiosis and Ovulation. *Endocrinology*, 159(5), 2142-2152. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00017>
- Watson, A. J. (2007). Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence1. *Journal of Animal Science*, 85(suppl_13), E1-E3. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-432>
- Webster, R. P., Roberts, V. H. J., & Myatt, L. (2008). Protein Nitration in Placenta – Functional Significance. *Placenta*, 29(12), 985-994. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.09.003>
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiological Reviews*, 79(1), 143-180. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.143>
- Winterhager, E., & Kidder, G. M. (2015). Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Human Reproduction Update*, 21(3), 340-352. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv007>
- Wolf, G. (2005). The Discovery of the Antioxidant Function of Vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. *The Journal of Nutrition*, 135(3), 363-366. <https://doi.org/10.1093/jn/135.3.363>
- Wood, J. R., Nelson, V. L., Ho, C., Jansen, E., Wang, C. Y., Urbanek, M., ... Strauss, J. F. (2003). The Molecular Phenotype of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Theca Cells and New Candidate PCOS Genes Defined by Microarray Analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26380-26390. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300688200>
- Xiang, D.-C., Jia, B.-Y., Fu, X.-W., Guo, J.-X., Hong, Q.-H., Quan, G.-B., & Wu, G.-Q. (2021). Role of astaxanthin as an efficient antioxidant on the in vitro maturation and vitrification

- of porcine oocytes. *Theriogenology*, 167, 13-23.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.03.006>
- Yamashita, E. (2015). Let astaxanthin be thy medicine. *PharmaNutrition*, 3(4), 115-122.
<https://doi.org/10.1016/j.phanu.2015.09.001>
- Yan, F., Zhao, Q., Li, Y., Zheng, Z., Kong, X., Shu, C., ... Shi, Y. (2022). The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. *Journal of Ovarian Research*, 15(1), 100.
<https://doi.org/10.1186/s13048-022-01032-x>
- Yang, Z., Wei, M.-L., & Dong, X.-Y. (2021). Effects of Yu Linzhu on ovarian function and oocyte mitochondria in natural aging mice. *Aging*, 13(19), 23328-23337.
<https://doi.org/10.18632/aging.203626>
- Yao, Z., & Seger, R. (2004). The Molecular Mechanism of MAPK / ERK Inactivation. *Current Genomics*, 5(4), 385-393. <https://doi.org/10.2174/1389202043349309>
- Yoshida, M., Cran, D. G., & Pursel, V. G. (1993). Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 36(4), 462-468.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080360409>
- Yu, Y., Dumollard, R., Rossbach, A., Lai, F. A., & Swann, K. (2010). Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *Journal of Cellular Physiology*, 224(3), 672-680.
<https://doi.org/10.1002/jcp.22171>
- Yuan, J., Peng, J., Yin, K., & Wang, J. (2011). Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(1), 150-165. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000414>
- Zamkowska, D., Karwacka, A., Jurewicz, J., & Radwan, M. (2018). Environmental exposure to non-persistent endocrine disrupting chemicals and semen quality: An overview of the current epidemiological evidence. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.01195>
- Zarneshan, S. N., Fakhri, S., Farzaei, M. H., Khan, H., & Saso, L. (2020). Astaxanthin targets PI3K/Akt signaling pathway toward potential therapeutic applications. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111714. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111714>

- Zegers-Hochschild, F. (2006). The ICMART glossary on ART terminology. *Human Reproduction*, 21(8), 1968-1970. <https://doi.org/10.1093/humrep/del171>
- Zeng, J., Jiang, M., Wu, X., Diao, F., Qiu, D., Hou, X., ... Wang, Q. (2018). <scp>SIRT</scp> 4 is essential for metabolic control and meiotic structure during mouse oocyte maturation. *Aging Cell*, 17(4). <https://doi.org/10.1111/accel.12789>
- Zhang, C., Sun, Y., Hu, R., Huang, J., Huang, X., Li, Y., ... Chen, Z. (2018). A comparison of the effects of agricultural pesticide uses on peripheral nerve conduction in China. *Scientific Reports*, 8(1), 9621. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27713-6>
- Zhang, H., Xu, R., & Wang, Z. (2021). Contribution of Oxidative Stress to HIF-1-Mediated Profibrotic Changes during the Kidney Damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2021/6114132>
- Zhang, X., Wu, X. Q., Lu, S., Guo, Y. L., & Ma, X. (2006). Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Research*, 16(10), 841-850. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310095>
- Zhang, Y.-L., Liu, X.-M., Ji, S.-Y., Sha, Q.-Q., Zhang, J., & Fan, H.-Y. (2015). ERK1/2 Activities Are Dispensable for Oocyte Growth but Are Required for Meiotic Maturation and Pronuclear Formation in Mouse. *Journal of Genetics and Genomics*, 42(9), 477-485. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.07.004>
- Zheng, Y. F., Bae, S. H., Kwon, M. J., Park, J. B., Choi, H. D., Shin, W. G., & Bae, S. K. (2013). Inhibitory effects of astaxanthin, β -cryptoxanthin, canthaxanthin, lutein, and zeaxanthin on cytochrome P450 enzyme activities. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.04.053>
- Zhu, J., Wu, F., Yue, S., Chen, C., Song, S., Wang, H., & Zhao, M. (2019). Functions of reactive oxygen species in apoptosis and ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. *FEMS Microbiology Letters*, 366(23). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa015>
- Zuluaga, M., Gueguen, V., Letourneur, D., & Pavon-Djavid, G. (2018). Astaxanthin-antioxidant impact on excessive Reactive Oxygen Species generation induced by ischemia and reperfusion injury. *Chemico-Biological Interactions*, 279, 145-158. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.012>

EKLER

Ek 1 (AYDIN ADÜ-HADYЕК)



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(AYDIN ADÜ-HADYЕК)



Aydın, 18.08.2022

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2022 Yılı VI. Oturum
Sayı : 64583101/2022/68
Proje Başlığı : Astaksantin Takviyesinin Malathion Toksisitesine Maruz Bırakılmış Fare Oosit Matürasyonuna EGFR Aracılı ERK1/2 Sinyal Yolu Üzerinden Etkisinin İncelenmesi
Proje Yürütücüsü : Erkan GÜMÜŞ
Proje Ekibi : Özge ÇEVİK, Burak TOZUN
Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:
İnsan embriyosu ve fıtusu kullanılması
İnsan embriyosu ve fıtusu dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması
Hayvan Çalışması : İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Prof. Dr. Murat SARIERLER
Başkan

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Tufan DOST
Üye

(Yıllık İzinli)

Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ
Üye

Prof. Dr. Serkan BAKIRCI
Üye

(Yıllık İzinli)
Dr. Öğr. Üyesi Solmaz KARAARSLAN
Üye

Dr. Öğr. Üyesi A. Önder
ÜSTÜNDAĞ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aysun KOÇ
Üye

Öğr. Gör. Dr. Gülde GÜLER
ORYAŞIN Sor. Vet. Hek.
Üye

Hidayet Y. YILMAZ
Serbest Vet. Hek. Üye

Arş. Gör. Eda Duygu İPEK
Sor. Vet. Hek. Üye

Şenay TEKİNBAS
HAYTAP Üye.

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

Ek 2 (Tez Önerisi Onay Belgesi)

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ENSTİTÜ YÖNETİM KURULUNUN 07/09/2022 TARİH ve 34 SAYILI
OTURUMUNDA ALINAN XXIX NOLU KARAR SURETİ AŞAĞIDA
ÇIKARILMIŞTIR

KARAR XXIX

Histoloji-Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı Başkanlığının; Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Burak TOZUN'un tez önerisi ve haftalık ders programı hakkındaki 06.09.2022 tarih ve 234391 sayılı yazısı görüşüldü. Histoloji-Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Burak TOZUN'un tez önerisi ve haftalık ders programının Anabilim Dalının görüşü doğrultusunda aşağıdaki şekilde kabulüne oy birliği ile karar verildi.

Öğrencinin Adı Soyadı	Program	Tezinin Türkçe Adı	Tezinin İngilizce Adı
Burak TOZUN	Yüksek Lisans	Astaksantin Takviyesinin Malathion Toksisitesine Maruz Bırakılmış Fare Oosit Matürasyonuna EGFR Aracılı ERK1/2 Sinyal Yolu Üzerinden Etkilerinin İncelenmesi	Investigation of the Effects of Astaxanthin Supplementation on Malathion Toxicity-Exposed Mouse Oocyte Maturation via EGFR Mediated ERK1/2 Signaling Pathway

Dersin Kodu	Dersin Adı	Gün	Saati	Öğrenci Tez Danışmanı
UZM701	Uzmanlık Alan Dersi I	Pazartesi Salı Salı Çarşamba Perşembe Cuma	12.30-13.15 08.30-11.15 12.30-13.15 12.30-13.15 12.30-13.15 12.30-13.15	Dr. Öğr. Üyesi Erkan GÜMÜŞ
TEZ701	Tez Çalışması I	Perşembe	13.30-14.15	

ASLI GİBİDİR
12/09/2022

Fahriye GENÇ
Enstitü Sekreteri

Ek 3 (Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası)





Hayvan Deneyleri
Merkezi Etik
Kurulu

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

Sayın BURAK TOZUN

13/11/2023 - 24/11/2023 tarihleri arasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi HADYEK tarafından Aydın İlinde düzenlenen “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. MURAT SARIERLER
HADYEK Başkanı



Prof. Dr. BÜLENT KENT
Rektör









Hayvan Deneyleri
Merkezi Etik
Kurulu

Ders Adı	Ders Saati	
	Teorik	Uygulama
Hayvan deneyleri mevzuatı*	1	-
Hayvan deneyleri etiği ve 3R*	2	-
Hayvan davranışı ve refahi*	2	-
Deney hayvanlarının karşılaştırmalı anatomisi	2	2
Deney hayvanlarının fizyolojisi	1	1
Deney hayvanlarının histolojisi	1	1
Deney hayvanlarının biyokimyası	1	-
Kan ve örnek alma teknikleri	1	4
Tutuş teknikleri	1	4
İlaç verme ve enjeksiyon teknikleri	1	4
Anestezi teknikleri	1	2
Ötanazi teknikleri	1	2
Ağrı, sıkıntı ve insani sonlandırma noktalarının belirlenmesi	1	-
Laboratuvar işleyişi (temizlik, güvenlik)*	2	1
Hayvan tesis/ünitelerinde iş sağlığı ve güvenliği*	1	-
Deney hayvanlarının beslenmesi	2	-
Hayvan hastalıkları	3	2
Biyoistatistik*	4	-
Standardizasyon	2	-
Hayvan deneyi modeli kavramı ve spesifik deney modelleri	2	2
Hayvan deneylerinin tasarlanması*	2	4
Temel cerrahi	2	4
Deney hayvanlarının üretimi, yetiştirilmesi ve barındırılması	2	2
Alternatif yöntemler*	2	-
TOPLAM	40	35

*: Hayvan grubuna eğitilmeyen dersler

Başarı Puanı
Sertifikanın geçerli olduğu hayvan grubu/grupları : 1.Grup: Kemirgenler (fare, sıçan, gerbil) ve tavşan

: 90

Bu Sertifika Tarımı ve Orman ve Bakanlığının 02.04.2019 tarih ve 2019/3 sayılı Genelgesine uygun olarak düzenlenmiştir.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Astaksantin Takviyesi’nin Malathion Toksisitesi’ne Maruz Bırakılmış Fare Oosit Matürasyonu’na EGFR Aracılı ERK1/2 Sinyal Yolağı Üzerinden Etkileri’nin İncelenmesi” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Burak TOZUN

06 / 11 / 2024

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : TOZUN, Burak
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Nazilli / 30.04.1996
Telefon : 0 546 942 94 14
E-posta : buraktozun@outlook.com
Yabancı dil : İngilizce, Almanca

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Tepebaşı/Eskişehir, Türkiye	2020

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2018	Envtek Mühendislik & Çevre Danışmanlık, Ankara Ağustos 2018 (Yumurtalık/Adana bölgesinde yuvalama yapan yeşil deniz kaplumbağalarını koruma ve yaşatma.)	Stajyer Öğrenci