



The Effect of Antioxidants Added to Culture Medium on Blastocyst Development Rates

Mehmet Burakalp Yusufu^{1,a}, Sakine Ülküm Çizmeçi^{1,b,*}

¹Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, 42250 Selçuklu/Konya, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 02/06/2022 Accepted : 31/08/2022</p> <p>Keywords: Antioxidant Cysteamine In-vitro embryo production L-ergothionine Vitamin E</p>	<p>The present study, it was aimed to determine the effect of antioxidants added to culture media on blastocyst development rates in in vitro embryo production. The material of the study consisted of oocytes collected from the ovaries taken from the slaughterhouse. Cumulus oocyte complexes (COC) were collected and classified under a stereomicroscope. Oocytes included in the study were subjected to maturation and fertilization stages. Probable zygotes were transferred to the culture (IVC) containing antioxidants (L-ergothionine 100 µM (n: 163), Vitamin E 100 µM (n: 151) Cysteamine 50 µM (n: 154) and were cultured in a tri gas incubator (Hera Cell- 6% O₂, 6% CO₂, 88%N). Blastocyst rates and embryo quality were determined on the 6th and 7th days in culture medium. Differences in IVMFC stages were evaluated by chi-square test. 966 oocytes were collected from 162 ovaries collected from the slaughterhouse. It was determined that the number of oocytes per ovary was 5,96, and the number of A and B quality oocytes was 4,26. It was determined that 655 (94.93%) of a total of 690 oocytes undergoing in vitro maturation were mature. The cleavage rates of the groups were 83.44%; 80.79%; 79.87%, and 83.96%, respectively. 140 (21.37%) blastocysts were obtained from 655 oocytes taken into the culture stage and the blastocyst rates in the groups were 33.13%; 8.61%; 7.79%, and 32.62%, respectively. As a result of the study, it was determined that the rates of blastocysts in the L-ergothioneine added the group was similar to the control group, but the blastocyst rates decreased significantly in the cysteamine and Vitamin E added groups. It was thought that this decrease might have been affected by the dose of antioxidants or the adequacy of oocyte development.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 10(9): 1671-1679, 2022

Kültür Medyumuna İlave Edilen Antioksidanların Blastosist Gelişim Oranlarına Etkisi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 02/06/2022 Kabul : 31/08/2022</p> <p>Anahtar Kelimeler: Antioksidan İn-vitro embriyo üretimi L-ergotiyonin Sisteamin Vitamin E</p>	<p>Sunulan çalışmada in vitro embriyo üretiminde kültür medyumlarına eklenen antioksidanların blastosist gelişim oranlarına etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmanın materyalini mezbahadan alınan ovaryumlardan toplanan oositler oluşturdu. Kumulus oosit kompleksleri (COC) stereo mikroskop altında toplandı ve sınıflandırıldı. Çalışmaya alınacak oositler maturasyon ve fertilizasyon aşamalarına tabi tutuldu. Muhtemel zigotlar antioksidanların (L-ergotiyonin 100 µM (n:163), Vitamin E 100 µM (n:151) Sisteamin 50 µM (n:154) ilave edildiği kültür (IVC) droplarına aktarılarak tri gaz (Hera Cell- %6 O₂, %6CO₂, %88N) inkübatörde kültüre bırakıldı. Kültür ortamındaki 6. ve 7. gün blastosist oranları ve embriyo kaliteleri değerlendirildi. IVMFC aşamalarında oluşan farklılıklar Ki-kare testi ile değerlendirildi. Mezbahadan toplanan 162 ovaryumdan 966 adet oosit toplandı. Ovaryum başına oosit sayısının 5,96 olduğu A ve B kalite oosit sayısının ise 4,26 olduğu belirlendi. İn vitro maturasyona alınan toplam 690 oositin 655'inin (%94,93) mature olduğu belirlendi. Grupların cleavage oranları sırasıyla %83,44; %80,79; %79,87 ve %83,96 olduğu belirlendi. Kültür aşamasına alınan 655 oositin 140 (%21,37) adet blastosist elde edildi ve gruplardaki blastosist oranları sırasıyla %33,13; %8,61; %7,79 ve %32,62 olduğu görüldü. Yapılan çalışma sonucunda L-ergotiyonin eklenen gruptaki blastosist oranlarının kontrol grubu ile benzer olduğu ancak sisteamin ve Vitamin E eklenen gruplarda blastosist oranlarının önemli oranda düştüğü belirlendi. Bu düşüşün antioksidanların dozu yada oosit gelişim yeterliliğinden etkilenmiş olabileceği düşünüldü.</p>

^a mburakalp35@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-0551-0611>

^c ulkum@selcuk.edu.tr

^d <https://orcid.org/0000-0003-2939-8019>



Giriş

Oositler enerji üretimi için okside edilebilir enerji maddesi olarak pruvat ve az miktarda da glikoz kullanır. Bu oositlerin plazma membranlarında glikoz taşıma enzimlerinin bulunmaması oositi mitokondrial oksidatif enerji üretimine zorunlu hale getirir. Oksidatif üretimin fazla olduğu dönemlerde ise elektron taşıma sistemindeki elektron sızır ve sızan bu elektronlar moleküler oksijenle reaksiyona girerek radikal ve radikal olmayan reaktif oksijenlere dönüşürler. Oluşan reaktif oksijenler hücre için zararlı etkilere sahiptir. Mitokondriyal ve nükleer DNA, proteinler ve lipitler ile etkileşerek yapısal ve fonksiyonel instabiliteye sebep olabilir ve sonunda hücreyi apoptoza götürebilirler. Özellikle de mitokondrial DNA oksidatif strese karşı çok hassastır (Haris ve Picton, 2007).

İn vitro üretilen embriyoların gelişim potansiyelini etkileyen en önemli faktör hem oosit olgunlaşmasını hem de embriyo gelişimini etkileyen kültür sırasındaki oksijen konsantrasyonudur (Kang ve ark., 2012; Mishra ve ark., 2018). İn vitro ortamlarda oksijen varlığının fazla olması serbest oksijen radikallerinin ve oksidatif ürünlerin ortaya çıkmasına sebebiyet verir. Bu ürünler embriyonun gelişmesine ve hücresel bütünlüğün korunmasını direk etkiler. Bu etkileri ortadan kaldırmak için ortama bazı antioksidanlar ilave edilir. Vitamin E, sisteamin, bazı tokoferoller, etosikuin, L-ergotiyonin ilade edilen antioksidanların bazılarıdır (Braga ve ark, 2019).

L-ergothioneine tihistidin betain amino asididir. Uzun süre önce çavdar ergotunda keşfedilmiş doğal bir antioksidandır (Paul ve Synder, 2010; Zhu ve ark., 2011; Halliwell ve ark., 2016). L-Ergotioneine'nin çeşitli ROS türlerine karşı antioksidan ve hücreyel koruyucu olarak görev yapmaktadır (Kerley ve ark., 2018). Ayrıca L-Ergotioneine'nin mitokondriyi hedefleyebileceği ve dolayısıyla oksidatif strese yanıt olarak mitokondriye özgü ROS'u (mROS) azaltabileceği de bildirilmektedir (Lamhonwah ve Tein, 2006).

Bir biyojen amin olan sisteamin, sisteinden oluşur ve yapısında -SH grubu taşır. Sisteamin 2-aminoetanediol, beta-merkaptotetilamin, tioetanolin, markaptamin olarak da adlandırılabilirler. Biyojen aminler bakteriler tarafından üretilmektedir. Antioksidan ve antiklastojenik etkilere sahiptir. Asetil Koenzim -A'nın yapısına girer. Sisteamin kimyasal olarak trietanolin (betamerkaptoetilamin) yapısındadır ve vücutta sistein dekarbonizasyonu sonucu oluştuğu bildirilmektedir (Grabowska ve ark., 2016).

Güçlü bir antioksidan olarak bildirilen Vitamin E, biyolojik membranların korunmasında görev alır. E vitamini GSH-Px serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etkilere sahiptir (Vinson ve ark., 1994). Vitamin E, ROS oluşumunu azaltıp olası bir oksidatif zararları önleyerek hücre membranlarının korunmasını sağlar (Agarwal ve Allamaneni, 2004).

Sunulan çalışmada kültür medyumuna katılan L-Ergotiyonin, siteamin ve Vitamin E'nin blastosist gelişim oranlarına etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Yöntem

Araştırma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik

Kurulu (SÜVDAMEK) onayı ile yapıldı (2020/73). Çalışmada Bioscience bovine IVF (BO-Wash, BO-IVM, BO- IVF, Semenprep, BO-IVC, BO-Oil) kitleri kullanıldı. Antioksidanlar Sigma Aldrich'den (Darmstadt, Germany) (L-ergothioneine (Sigma Aldrich (E752)), Vitamin E (DL- α -Tocopherol - CAS 10191-41-0 – Calbiochem) ve Sisteamin Sigma (Cysteamine hydrochloride (M6500)) temin edildi.

Çalışmanın materyalini mezbahadan alınan ovaryumlardan toplanan oositler oluşturdu. Lokal mezhabalardan sağlanan Holstein inek ırkına ait ovaryumlar fizyolojik tuzlu su (%0,9) ve antibiyotik içeren taşıma sıvısı içerisinde ve 25-30°C'lik sabit ısı sağlayan termosta 2-3 saat içerisinde laboratuvara getirildi. Ovaryumlar aynı mevsim içerisinde alınmasıyla, mevsimsizliği değişkenlikleri elimine edilmeye çalışıldı. Ovaryumlarda bulunan 3-8 mm çapındaki foliküller aspire edildi. Alınan folikül sıvılarından kumulus oosit kompleksleri (COC) stereo mikroskop altında toplandı ve kumulus-oosit kompleksinin yapısına göre sınıflandırıldı (A, B, C ve D kalite COC). COC kümülüs katmanlarının sayısı ve görünümü ve oositin sitoplazmasının dokusu veya parlaklığı gibi sitoplazmik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. *A kalite oositler*; ≥ 5 kompakt hücre katmanına ve homojen sitoplazmaya sahiptir. *B kalite oositler*; Sitoplazmada az sayıda homojen olmayan alana sahip ve 3-5 kat kompakt hücre katmanı olan veya ≥ 5 kat kompakt hücre ve yoğun homojen olmayan alanlara sahiptir. *C kalite oositler*; Birkaç hücre katmanına (>3) ve sitoplazmada az miktarda homojen olmayan alana sahip veya bölgesel kümülüs kaybı vardır ve az miktarda homojen alana sahiptir. *D kalite oositler*; Kümülüs katmanı tamamen kaybolmuş, küçük, granüler, homojen olmayan sitoplazmaya sahiptir (Brackett ve Zuelka, 1993; Çizmeçi ve ark., 2022).

A ve B kalite oositler in vitro embriyo üretim sürecine alındı. Çalışmaya alınacak oositler BO WASH solüsyonu içeren petrilere toplandı ve 3 kez IVM medyumuna ile yıkanarak 24 saat ekilibre edilmiş IVM (maturasyon) medyumuna aktarıldıktan sonra mono gaz inkübatörde (Hera Cell, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) 22 saat inkübe edildi. Çözdürülen (37°C) sperma ısıtılmış 2 mL semenprep içine alınarak 328 G'de 5 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldıktan sonra işlem tekrarlandı. İkinci süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oosit başına 10 000 spermatozoon düşecek şekilde (100 000 spermatozoa/30 μ L) sulandırıldı. Sperma bir gece önceden ekilibre edilen IVF (fertilizasyon, 70 μ L) medyumuna alınarak yanına 10 adet matür oosit koyuldu ve 20-22 saat inkübatörde bekletildi. Fertilizasyon kontrolü oositin sitoplazmasında fertilizasyon boşluğunun oluşması veya ikinci polar body görülerek yapıldı. Kültür medyumuna alınmadan önce kumulus hücreleri pipet yardımıyla temizlendi ve antioksidanların (L-ergotiyonin 100 μ M (n:163), Vitamin E 100 μ M (n:151) Sisteamin hydrochloride 50 μ M (n:154) ilave edildiği ve bir gece ekilibre edilmiş olan kültür (IVC) droplarına aktarılarak tri gaz (Hera Cell, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US - %6 O₂, %6 CO₂, %88N) inkübatörde kültüre bırakıldı. Çalışma her seferinde grup başına en az 20 muhtemel zigot kültür aşamasına alınacak şekilde 7 replikasyon olarak yürütüldü. Kültür ortamının 2.

günü sonunda bölünme kontrollerin ardından 6. ve 7. gün blastosist oranları ve embriyo kaliteleri değerlendirildi.

Elde edilen veriler, uygun istatistik metotlarla karşılaştırıldı. İstatistik analizde SPSS-Statistics-22 paket program kullanıldı. IVMFC aşamalarında oluşan farklılıklar Ki-kare testi ile değerlendirildi.

Bulgular ve Tartışma

Mezbahadan toplanan 162 ovaryumda bulunan foliküllerin aspirasyonu sonucunda 966 adet oosit toplandı. Ovaryum başına oosit sayısının 5,96 olduğu A ve B kalite oosit sayısının ise 4,26 olduğu belirlendi (Tablo 1). İn vitro maturasyona alınan toplam 690 oositin 655'inin (%94,93) mature olduğu belirlendi. Mature olan ve fertilizasyon aşamasına alınan oositlerin 538 tanesinin fertilize olduğu ve en az iki hücreye bölündüğü (%82,14) görüldü. Grupların cleavage oranları sırasıyla %83,44, %80,79, %79,87 ve %83,96 olduğu ve istatistik farkın önemsiz olduğu belirlendi ($P>0,05$) (Tablo 2).

Kültür sonrasında 2 hücreli zigot sayıları L-ergotionine grubunda 23 (%14,11), Vitamin E grubunda 10 (%6,62), Sisteamin grubunda 16 (%10,39) ve kontrol grubunda 28 (%14,97) olduğu ve istatistik farkın önemsiz olduğu belirlendi ($P>0,05$). Gruplardaki 2-16 hücreli zigot sayılarının sırasıyla 30 (%19,02), 57 (%37,75), 33 (%21,43) ve 29 (%15,51) olduğu ve istatistik farkın önemli olduğu belirlendi ($P<0,05$). Morula sayıları yine sırasıyla 28 (%17,18), 42 (%27,81), 62 (%40,62), 39 (%20,86) bulundu ve istatistik farkın önemli olduğu belirlendi ($P<0,05$). Kültür aşamasına alınan 655 oositten 140 (%21,37) adet blastosist elde edildi ve gruplardaki blastosist oranları sırasıyla %33,13 %8,61, %7,79 ve %32,62 olduğu görüldü. Yapılan çalışma sonrasında blastosist oranlarında istatistik farkın önemli olduğu belirlendi ($P<0,05$) (Tablo 2). Replikasyonlarda elde edilen embriyo gelişim verileri Tablo 1 ve 2'de sunuldu.

Normal koşullar altında, üreme sisteminin fizyolojik ortamı, oositlerin ve embriyoların yeterli olgunlaşması ve büyümesi için en uygun koşulları sağlar (Swelum ve ark., 2022). Öte yandan, ticari, sentetik, in vitro ortam ve kültür koşulları in vivo koşullar altında bulunan aynı fizyolojik kompleksi sunmayabilir ve çeşitli gelişimsel bozukluklara yol açabilir (Hashem ve Gonzalez-Bulnes, 2020). Normal şartlar altında embriyolar ve oositler, ovidukt ve foliküler sıvılarda bulunan antioksidan moleküller ve süperoksit dismutaz ve glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzim sistemleri tarafından oksidatif hasardan korunur (Abdelnour ve ark., 2018; 2019). Bununla birlikte, kültür koşullarında, oositler ve embriyolar, bu tür karmaşık korumadan yoksun bir ortama maruz kalırlar ve daha fazla oksidatif stres yaşama eğilimi gösterirler.

Embriyo gelişimi için gerekli mekanizmalar arasında reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ile bunların detoksifikasyonu arasındaki denge esastır (Halliwell ve Aruoma, 1991; Kehrer ve Lund, 1994; Aitken, 2019). IVF prosedürlerinin başarısızlığının en basit nedenlerinden biri, anormal embriyonik gelişime yol açan düşük kaliteli gametlerdir (Ruder ve ark., 2008; Meldrum ve ark., 2016). İn vitro fertilizasyon teknikleri (özellikle gamet toplama, manipülasyon ve kültür), oosit kalitesini, sperm verimliliğini ve sonuç olarak embriyo gelişimini bozmada olası bir rolü olan reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturabilir (Richards, 1994; Agarwal ve Said, 2003; Lian ve ark., 2013; Kiani-Esfahani ve ark., 2013; Lu ve ark., 2018). Yeterli miktarda ROS, hem ovaryumlarda (oosit olgunlaşmasından fertilizasyona kadar) hem de uterus primordiyal aşamadan antral foliküllere kadar foliküllerin gelişiminin (Lu ve ark., 2018) ve ovulasyon sürecinin (Richards, 1994; Du ve ark., 2006; Sugino, 2006; Ahmed ve Cudmore, 2009; Szpera-Gozdziowicz ve Breborowicz, 2014) desteklenmesi gibi çoklu fizyolojik aktivitelerde önemli roller oynar.

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen ovaryum ve oosit sayıları, matür oosit sayısı ve maturasyon oranı.

Table 1. Number of ovaries and oocytes included in the study, number of mature oocytes and maturation rate.

Çalışmaya dahil edilen ovaryum sayısı	162
Toplanan oosit sayısı	966
Maturasyona alınan oosit sayısı	690
Maturasyona alınmayan oosit sayısı	276
Matür Oosit	655
Maturasyon oranı	%94,93
Kültüre alınan oosit sayısı	655

Tablo 2. Grupların maturasyon, cleavage ve blastosist oranları

Table 2. Maturation, cleavage and blastocyst rates of the groups

	L-ergotiyonin 100 µM	Vitamin E 100 µM	Sisteamin 50 µM	Kontrol
Oosit	163	151	154	187
Bölünen zigot sayısı	136	122	124	157
Cleavage oranı %	83,44	80,79	80,52	83,96
2 hücreli zigot sayısı	23	10	16	28
2 hücreli zigot oranı %	14,11	6,62	10,39	14,97
4-16 hücreli zigot sayısı	30	57	33	29
4-16 hücreli zigot oranı %	19,02 ^b	^a 37,75	21,43 ^b	15,51 ^b
Morula sayısı	28	42	62	39
Morula oranı %	17,18 ^c	27,81 ^b	40,62 ^a	20,86 ^{bc}
Blastosist sayısı	54	13	12	61
Blastosist oranı	33,13 ^a	8,61 ^b	7,79 ^b	32,62 ^a

İstatistik fark anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$)

Fertilizasyon işlemi sırasında sperm fonksiyonunun düzenlenmesinde fizyolojik ROS seviyeleri önemlidir (Cardosa ve ark., 2019). Aşırı miktarda ROS, oosit olgunlaşmasını ve oosit fertilizasyonunu (Agarwal ve ark., 2012; Da Broi ve Navarro, 2016; Abbasihormozi ve ark., 2019; Soheli ve ark., 2019), sperm motilitesini, sperm sayısını ve sperm-oosit füzyonunu olumsuz etkiler ve embriyo gelişimi üzerinde zararlı bir etkiye sahiptir (Cardoso ve ark., 2019).

L-Ergotione, esas olarak mantarlarda bulunan, diyetle suda çözünür, doğal olarak oluşan bir amino asittir ve imidazol halkasında 2. pozisyonda bir kükürt atomu içeren histidin bir tiyüüre türevidir. L-Ergotione, güçlü bir OH temizleyicisi ve H₂O₂'den demir veya bakır iyonuna bağlı OH oluşumunun bir inhibitörüdür (Akanmu ve ark., 1991). L-Ergotione bazı bakteri ve mantarlar tarafından sentezlenir, ancak hayvanlar tarafından sentezlenmez (Hartman, 1990). Bu nedenle, memeliler mantar, yulaf, mısır ve et dahil olmak üzere tükettikleri yemlerle L-Ergotione alırlar (Ey ve ark., 2007). Gıda kaynaklı L-Ergotione'in beyin, eritrositler, karaciğer, böbrek, kalp, seminal sıvı ve çeşitli türlerin oküler dokularında bulunduğu bildirilmektedir (Mitsuyama ve May, 1999). L-Ergotione singlet oksijen, hidroksil radikalleri, hipokloröz asit ve peroksil radikallerini temizlediği (Asmus ve ark 1996, Aruoma ve ark 1997, Obayashi ve ark 2005), proteinlerin ve DNA'nın peroksinitrite bağımlı nitrasyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir (Aruoma ve ark 1999).

Kültür medyumuna 0,05 ve 0,1 mM L-ergotiyonin ilave edilerek yapılan in vitro embriyo üretim denemesi sonucunda cleavage oranlarının kontrol grubunda %78, 0,05 ilave edilen grupta %78, 0,1 mM ilave edilen grupta ise %80,4 olduğu bildirilmektedir. Aynı çalışmada blastosist oranlarının ise sırasıyla %46, %43,5 ve %41,5 olduğu rapor edilmektedir. İn vitro kültür ortamının L-ergotiyonin (0,1 mM) ile zenginleştirilmesinin, implantasyon sonrası gelişimi etkileyen en önemli faktör olan genel embriyo kalitesini arttırdığı bildirilmektedir (Zullo ve ark., 2016).

Kültür medyumuna 50 µM L-ergotiyonin ilave edilen bir çalışmada çalışma grubunda blastosist oranının %54,74, kontrol grubunda ise oranın %18,58 olduğu rapor edilmektedir (Çizmeçi ve ark., 2022). Maturasyon medyumuna katılan L-ergotiyonin maturasyon, cleavage ve blastosist oranlarına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kontrol grubunda verilerin sırasıyla %63,4, %21,9 ve %0 olduğu, deneme grubunda ise sırasıyla %80,4, %29,9 ve %1,6 olduğu bildirilmektedir (Öztürkler, 2015).

Manda oositlerinin IVF uygulamasına alındığı çalışmada; L-ergotiyonin kültür medyumuna 0, 0,05, 0,1 ve 1 mM ilave edildiği çalışmada cleavage oranlarının sırasıyla %71,4, %66,8, %68,7 ve %63 olduğu; blastosist oranlarının ise %21,6, %30,9, %33,9 ve %21,7 olduğu bildirilmektedir (Zullo ve ark., 2014). Sunulan çalışmada L-ergotiyonin kültür medyumuna ilavesi sonucunda blastosist oranlarının her replikasyonda belirgin oranda arttığı ve blastosist gelişimini desteklediği görüldü.

Düşük moleküler ağırlıklı bir tiyol bileşiği olan sisteamin, sistein ile reaksiyona girer ve muhtemelen karışık bir disülfid oluşturmak üzere sülfidril-disülfid değişimi yoluyla sistin ile reaksiyona girer. Benzer şekilde karışık disülfidler, memeli hücreleri tarafından alınır ve bir

sistein kaynağı sağlamak için hücre içinde bölünür (Issels ve ark., 1988). Sistein, olgunlaşan sığır oositlerinde GSH sentezi için gerekli olan harici bir substrattır (De Matos ve ark., 1996). GSH sentezi, kararsız bir amino asit olan sisteinin mevcudiyetine bağlıdır (Furnus ve de Matos, 1999). TCM199'daki sistein konsantrasyonu çok düşüktür; sistin çok daha yüksektir (sistein, 0,6 M; sistin, 83,2 M) ve hücre dışında, sistine otooksidasyon nedeniyle TCM-199'da sistein yetersiz kalmaktadır (Sagara ve ark., 1993). Bu tür düşük konsantrasyonlarda, ortamdaki sisteinin tamamı hatta eklenen FCS'de bulunan sistein bile sistine oksitlenebilir (Mohindru ve ark., 1985). Bu nedenle, bu sistinin kümülüs hücreleri tarafından sistine dönüştürülmesi ve daha sonra IVM sırasında GSH sentezine dahil edilmesi mümkündür (Yoshida ve ark., 1993, Takahashi ve ark 1995). Fizyolojik koşullar altında, toplam serbest sistininin sadece %10-20'si indirgenmiş formda bulunmaktadır (Meier ve Issels, 1995).

Reaktif oksijen türlerinin aracılık ettiği oksidatif stres, hücre içi redoks potansiyelinde bir dengesizlik ile sonuçlanır (Balaban ve ark., 2005). Glutasyon (L-g-glutamil-L-sisteinil-glisin; GSH), hücreleri reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine karşı korumada ve redoks durumunu değiştirerek protein ve DNA sentezini düzenlemede önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir (Meister, 1983). Üremede GSH, hamsterlerde (Perreault ve ark., 1988), domuzlarda (Yoshida ve ark., 1993) ve ineklerde (Sutovsky ve Schatten, 1997) sperm yoğunlaşmasına ve erkek pronükleus oluşumuna katılır (Yoshida ve ark, 1993; Furnus ve De Matos, 1999). Ayrıca sitoplazmik GSH, sitoplazmik olgunlaşma göstergelerinden biri olarak da tanımlanır (Funahashi ve ark., 1994; de Matos ve ark., 1997; Abeydeera ve ark., 1998; Furnus ve ark., 1998; De Matos ve Furnus, 2000). Kültür ortamındaki sistein eksikliğinin (TCM-199'da 0,6 mM) kararsız bir yapıda olması ve sistin için kolay otooksidasyonu nedeniyle in vitro koşullarda GSH sentezinin bozulabileceği düşünülmektedir (Sagara ve ark., 1993). Somatik hücrelerde sisteamin, sistini sistine indirgeyerek, sistein alımını teşvik edebilir ve dolayısıyla GSH sentezini artırabilir (Issels ve ark., 1988).

Sığır ve koyun oositlerinin maturasyon medyumuna sisteamin eklenmesi, besiyerinde oksitlenmiş sisteinin sistine indirgenmesiyle GSH düzeylerinde bir artış ve blastosist aşamasına kadar embriyo gelişim hızında bir iyileşme ile sonuçlanmıştır (De Matos ve ark., 1996; 2002a). Bu gerçek, sisteaminin in vitro olgunlaşma ve müteakip embriyo gelişimi üzerindeki faydalı etkilerine GSH'nin aracılık ettiğini göstermektedir (Isles ve ark., 1988).

Kültüre eklenen 100 µM sisteaminin bölünme oranlarında istatistiksel bir farklılığa neden olmadığı rapor edilmektedir (Sandal ve Özdaş, 2015). Yürütülen bir çalışmada sisteamin takviyeli ortamda oositlerin bölünme oranını %60,7 olarak bildirilmektedir (Singhal ve ark., 2009). Bir diğer çalışmada epidermal büyüme faktörü ve sisteaminin sığır oositlerinin olgunlaşması üzerindeki etkisini araştırmış ve 100 µM sisteamin ilave ettikleri grupta bölünme oranını %62,4, epidermal büyüme faktörü ve sisteamin ilave ettikleri grupta ise bölünme oranının %63,2'ye yükseldiğini rapor edilmektedir (Oyamada ve Fukui, 2004).

Maturasyon ve kültür medyumlarına 100 µM sisteamin eklenmesi ile cleavage oranlarının belirlenmesi amaçlanan bir çalışmada sisteamin uygulamasının cleavage oranlarını arttırdığı bildirilmekte ancak blastosist oranları hakkında bilgi verilmemektedir (Sandal, 2020). Sisteaminin kültür medyumuna ilavesinin denendiği bir çalışmada cleavage ve blastosist oranlarını istatistiki olarak etkilemediği rapor edilmiştir (Sandal ve Özdaş, 2015). Yapılan bir başka çalışmada ise kültür medyumuna ilave edilen 100 µM sisteaminin cleavage oranlarını değiştirmedeği ancak blastosist oranlarını istatistiki olarak arttırdığını bildirmektedir (Balasubramanian ve Rho, 2007). Kültür ortamına ilave edilen 600 µM sisteaminde diğer çalışmalarda olduğu gibi cleavage oranlarını etkilemediği ancak blastosist gelişim oranlarını arttırdığı rapor edilmiştir (De Matos ve Furnus, 2000).

Farklı iki kültür medyumunda (SOF, CR1aa) fetal calf serum (FCS) ve sisteamin ilavesinin bölünme ve embriyo gelişimine etkinliğin değerlendirildiği bir çalışmada her iki medyumda da FCS ilavesinin embriyo gelişimini arttırdığı sisteamin gelişiminin ise düşürdüğü rapor edilmiştir. Uygulama sırasında cleavage oranlarının gruplar arasında önemsiz olduğu bildirilmektedir (Sandal ve ark., 2021).

Maturasyonda 100 µM, kültürde 0, 25, 50 ve 100 µM sisteamin ilave edilen bir çalışmada cleavage oranlarında istatistiki fark şekillenmezken, blastosist gelişim oranlarında sisteamin ilave edilen grupların kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, en yüksek blastosist oranının 50 µM ilave edilen grupta şekillendiği bildirilmektedir (De Matos ve ark., 2002b).

Sisteaminin etkinliğinin belirlenmeye çalışıldığı araştırmada kültüre sisteamin eklenen blastosistlere olumlu etkisinin olmadığını bildirilmektedir (Song ve Lee, 2007). Yürütülen bazı araştırmalarda ise IVM ortamına sisteamin eklenmesinin blastosist oranına olumlu etki gösterdiğini bildirilmektedir (Takahashi ve ark., 1993; Balasubramanian ve Rho, 2007). Maturasyon medyumuna ilave edilen 50, 100 ve 200 µM/L sisteaminin cleavage oranlarında farklılığa neden olmazken, blastosist oranlarını yükselttiği en yüksek sonucun 50 µM/L eklenen grupta alındığı rapor edilmiştir (Gasparrini ve ark., 2000). Kültür medyumuna 50, 100 ve 200 µM sisteamin eklenen bir çalışmada cleavage oranlarında gruplar arasında istatistiki fark önemsiz bulunurken, blastosist oranlarında 100 µM ilave edilen grupta en yüksek sonucun alındığı bildirilmektedir (Lojkic ve ark., 2012).

Maturasyon ve kültür aşamalarına farklı dozlarda sisteamin ilave edilen ve farklı oksijen düzeylerinde yürütülen bir çalışmada 10 mM sisteamin ilave edilip %5 ve %20 O₂'li ortamda kültüre edilen zigotlarda bölünme oranları 0,1, 0,5 ve 1 mM sisteamin ilavesinden daha düşük olduğu %5 O₂'li ortamda diğer oranlarda bölünme oranlarında değişkenlik şekillenmediği bildirilmektedir. Ayrıca %20 O₂'li ortamda diğer gruplar arasında istatistiki farkın anlamlı olduğu ve en yüksek bölünme oranının 0,5 mM eklenen grupta şekillendiği rapor edilmiştir. Blastosist oranlarında ise 10 mM eklenen her iki O₂ seviyesinde de en yüksek sonucun ise %20 O₂'li 0,5 mM ilave edilen grupta olduğu bildirilmektedir (Canel ve ark., 2018).

Maturasyon medyumuna 50 ve 100 µM sisteamin eklenen bir grupta bölünme oranlarında kontrol grubu ile farklılık şekillenmediği, morula ve blastosist gelişiminin ise

her iki grupta da kontrol grubundan daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Ranjbar ve ark., 2019).

Koyulardan maturasyon medyumuna ilave edilen sisteaminin farklı kültür medyumlarındaki bölünme oranlarına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada bölünme oranlarında istatistiki olarak farklılık oluşturmadığını bildirilmektedir (Enginler ve ark., 2015). Koyun oositlerinde maturasyon medyumuna ve farklı kültür medyumlarına ovidukt sıvısı ile birlikte sisteamin ilavesinin etkinliğinin belirlenmeye çalışıldığı bir araştırmada cleavage ve blastosist gelişim oranlarında istatistiki bir değişimin olmadığı bildirilmektedir (Enginler ve ark., 2016). Keçi embriyolarının 100 µM sisteamin ilave edilerek kültürlenmesi çalışmasında bölünme, morula ve blastosist gelişiminde kontrol grubu ile istatistiki farkın şekillenmediği rapor edilmiştir (Kharche ve ark., 2016). Keçi COC'leri, farklı sisteamin konsantrasyonları ile takviye edilmiş TCM-199'da kültürlendiğinde, 100 mM sisteamin ilave edilen grupta blastosist oranları en yüksek bulunduğu ancak daha yüksek konsantrasyonlarda oranın azaldığı rapor edilmiştir (Zhou ve ark., 2008).

Yapılan diğer çalışmalarda, maturasyon ve kültür medyumlarına eklenen 100 µM sisteaminin, kontrol gruplarına göre iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir. Maturasyonda %55-61 oranında blastosiste ise %17,1-23,8 oranında artışlar gözlemlenmiştir. Ayrıca yapılan oksidatif stres ölçimlerinde antioksidanların embriyo ortamındaki kapasitesini ve intrasellüler GSH sisteamin seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (De Matos ve ark., 2002b; Gasparrini ve ark., 2006). IVM sırasında sırasıyla kültüre eklenen 100-200 µmol/L sisteamin, bölünme ve embriyo gelişimini olumlu yönde etkilediği bildirilmektedir (Rodriguez ve ark., 2003).

Vitamin E'nin oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi üzerindeki olumlu, antioksidatif yanıt, hücre gelişiminin ve apoptozisin düzenlenmesi, kümülüs ekspansiyonu ile bağlantılı mRNA transkriptlerindeki hızlı değişikliklerle ilgilidir (Arias-Álvarez ve ark., 2018).

Yapılan bazı çalışmalarda a-tokoferolün embriyo kültür ortamına ilave edilmesinin sığır ve domuz blastosist kalitesini ve embriyo gelişimini iyileştirdiği bildirilmektedir (Natarajan ve ark., 2010; Olson ve Seidel Jr., 2000). Embriyo kültür ortamına 200 µM Vitamin E ilavesi, kontrol ile karşılaştırıldığında bölünme (%61,21), morula (%27,92) ve blastosist (%10,62) oluşumunu ve blastosist toplam hücre sayısını (%94,50) önemli ölçüde iyileştirdiği rapor edilmiştir (Sırasıyla 59,06, 26,16, 8,9 ve 88,18) (Natarajan ve ark., 2010).

Maturasyon ortamına 100 µM Vit E eklenmesinin oksidatif stres ile apoptozu kontrol etmede ve tavşan oositlerinin in vitro gelişim yeterliliğini arttırmada etkili olduğu bildirilmektedir (Arias-Álvarez ve ark., 2018). α-tokoferol (Vit E), hücreleri ROS'a karşı korumak için in vitro ve in vivo olarak bir antioksidan ajan olarak güçlü bir role sahip bir vitamindir (Rush ve ark., 2014; Attia ve ark., 2017; 2020). Yapılan bazı çalışmalarda a-tokoferolün embriyo kültür ortamına ilave edilmesinin sığır ve domuz blastosist kalitesini ve embriyo gelişimini iyileştirdiği bildirilmektedir. Embriyo kültür ortamına 200 µM Vitamin E ilavesi, kontrol ile karşılaştırıldığında bölünme (%61,21), morula (%27,92) ve blastosist (%10,62) oluşumunu ve blastosist toplam hücre sayısını (%94,50)

önemli ölçüde iyileştirdiği rapor edilmektedir (Sırasıyla 59,06, 26,16, 8,9 ve 88,18) (Natarajan ve ark., 2010).

Kültür medyumuna 200 µM Vitamin E ilave edilen invitro sığır embriyo üretim çalışmasında deneme ve kontrol gruplarında cleavage oranları sırasıyla %60,74 ve %73,7 olduğu blastosist oranlarının ise %19,7 ve %30,1 olduğu rapor edilmektedir (Sudano ve ark., 2010). Sığır oositlerinin embriyo kültür çalışmasında kültür medyumuna 100 µM Vitamin E ilave edilen grupta morula gelişme oranı %41 iken kontrol grubunda bu oranın %34 olduğu, blastosist gelişme oranlarının ise sırasıyla %18 ve 24 olduğu bildirilmektedir (Olson ve Seidel Jr., 2000).

Vitamin E (1 mM) ilavesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığı çalışmada 2-4 hücre gelişim oranları %72,2 ve %68,7; 8-16 hücre oranları %60,9 ve %57,7; morula oranları %33,7 ve %30,7 blastosist oranları ise %13,9 ve %19,0 olarak bildirilmektedir (Tareq ve ark., 2012). Kültür medyumuna 25, 50, 100 ve 200 µM Vitamin E ilave edilen çalışmadan blastosist oranları kontrol grubunda %18,46 deneme gruplarında sırasıyla %21,11, %27,92, %31,66 ve %8,01 olarak bildirilmektedir (Marques ve ark., 2007).

Yapılan bir çalışmada kültüre eklenen 200 µM α-tokoferol %20 O₂ seviyesinde, bölünme (P < 0,05), morula (P < 0,05) ve blastosist (P < 0,01) oluşumunu ve blastosist toplam hücre sayısını (P < 0,01) kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttırdığı rapor edilmektedir. Blastosist oluşum oranlarında ise kontrol grubuna kıyasla 100 µM (P < 0,01) ve 400 µM (P < 0,05) takviyeli grupların oranı anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Rajesh ve ark., 2010). Bir çalışmada domuz embriyo üretiminde, kültür α-tokoferol' un 100 µM konsantrasyonda eklenmesinin blastosist kalitesini ve gelişimini olumlu yönde etkilediği bildirilmektedir (Yeon ve ark., 2006). Buffalo oositlerinde yürütülen in vitro embriyo üretim çalışmasında kültür medyumuna ilave edilen 250 µM ve 500 µM Vitamin E ilavesi ile morula gelişim oranları sırasıyla %44, %43 ve %32 (kontrol); blastosist gelişim oranları ise %23, %24 ve %20 olarak rapor edilmektedir (Saikhun ve ark., 2008).

Bir çalışmada somatik hücreli nükleer transfer (SCNT) embriyoları için kültür ortamına eklenen 100 µM konsantrasyonda alfa tokoferol ilave edilerek blastosistlerin kalitesi ile toplam hücre sayısının hesaplandığı ve blastosist oranlarının kontrol grubunda %22,3, alfa tokoferol ilave edilen grupta ise %26,3 olduğu ve önemli bir farkın tespit edilmediği rapor edilmektedir (Peng ve ark., 2008). Başka bir çalışmada kültüre eklenen 400 µM tokoferolün üzerindeki konsantrasyonların, blastosist gelişiminde ve blastosist hücre sayısında doza bağlı bir azalmaya neden olmuştur (Wang ve ark., 2012).

Yürütülen bir çalışmada IVM ortamına eklenen 100 µM alfa tokoferolün oosit kalitesini geliştirdiği ve oositlerdeki azaltılmış oksidatif stresi (SOD2 ve CAT), hücre hasarını ve apoptotik kaskad aktivasyonunu (TP53 ve CASP) yansıtan mRNA transkriptlerini değiştirdiğini göstermektedir. Tavşan oositlerinde IVM ortamına eklenen alfa tokoferolün oksidatif stresi azalttığı rapor edilmektedir (Arias-Álvarez ve ark., 2018).

İn vivo fertilize edilen tek hücreli fare embriyolarının Vitamin E (50 nM, 100 nM ve 150 nM) ilave edilerek kültüre edilmesi sonucunda morula oranları sırasıyla %100, %100 ve %21 kontrol grubunda ise %84 olduğu, blastosist oranlarının sırasıyla %52,3, %67,5 ve %25

olduğu kontrol grubunda ise aynı oranın %46,2 olduğu rapor edilmektedir (Tareq ve ark., 2012).

Maturasyon ortamına 100 µM Vit E eklenmesinin oksidatif stres ile apoptozu kontrol etmede ve tavşan oositlerinin in vitro gelişim yeterliliğini arttırmada etkili olduğu bildirilmektedir (Arias-Álvarez ve ark., 2018). Ancak yürütülen bazı çalışmalarda sığır (Dalvit ve ark., 2005), manda (Thiyagarajan ve Valivittan, 2009) ve küçükbaş hayvanlarda Vitamin E ilavesinin oosit maturasyonu, fertilizasyon, blastosist üretim oranları ve erken embriyonik gelişimde üzerinde hiçbir etkisi olmadığı bildirilmektedir (Natarajan ve ark., 2010).

Sunulan çalışmada toplanan oositlerin tek yıkama petrisinde toplanıp rastgele maturasyon medyumlarına aktarılması, fertilizasyon aşamasında aynı protokolün uygulanması ve kültür aşamasına kadar bütün şartların eşit olduğu dikkate alındığında elde edilen sonuçlar tamamen kültür ortamına bağlanmaktadır. Grupların tamamında cleavage oranlarının benzer olması uygulanan maturasyon ve fertilizasyon işlemlerinin kültür aşamasındaki farka neden olmayacağını göstermektedir. Cleavage sonrası iki hücrede kalan zigotların oranları benzerlik göstermekte ve asıl bloklanma 4-16 hücrede meydana gelmektedir. Vitamin E grubunda en yüksek bloklanma 4-16 hücrede şekillenirken Sisteamin grubunda morula aşamasında yaşandığı belirlendi. L-Ergotionine ve kontrol gruplarında alınan blastosist oranlarının Vitamin E ve sisteamin gruplarında alınmamasının kullanılan antioksidanın embriyo gelişimini baskılaması nedeniyle yaşandığı kanaatine varıldı. Antioksidan kullanımında negatif etkilerin, embriyodaki prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin kurulamamasına bağlı olabileceği bildirilmektedir. Ortamda antioksidan konsantrasyonunun yüksekliği, proteinlerin disülfid bağlarını azaltıp, redoks durumunu değiştirip, inaktivasyon ya da denatürasyon sebep olarak embriyo gelişimini olumsuz etkileyebileceği rapor edilmektedir. Buna ilaveten antioksidan maddelerin ilave edildiği medyumlarla etkileşime girerek faydalı bir etkiye sahip olabileceken, farklı bir medyumda etkisiz kalabileceği hatta zararlı bir etkiye yol açabileceği bildirilmektedir (Guerin ve ark., 2001). Sunulan çalışmada non-defined ticari medyumlar kullanıldı. Literatür çalışmalarının tamamında defined ya da semi-defined medyumlar kullanıldığı bildirilmektedir. Şekillenen olumsuzluğun kullanılan ticari medyuma bağlı olabileceği ve medyumda bulunan bir bileşen ile antioksidanların etkileşime girerek embriyo gelişimini baskılamış olabileceği düşünüldü.

Teşekkürler

Sunulan Çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20212030 Proje numarası ile desteklenen tez projesinden üretilmiştir.

Kaynaklar

- Abbasihormozi SH, Babapour V, Kouhkan A, Naslji AN, Afraz K, Zolfaghary Z, Shahverdi AH. 2019. Stress hormone and oxidative stress biomarkers link obesity and diabetes with reduced fertility potential. *Cell J*, 21: 307–313.
- Abdelnour SA, Abd El-Hack ME, Khafaga AF, Arif M, Taha AE, Noreldin AE. 2018. Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: A review. *J Therm Biol*, 79: 120–134.

- Abdelnour SA, Abd El-Hack ME, Swelum AA-A, Saadeldin IM, Noreldin AE, Khafaga AF, Al-Mutary MG, Arif M, Hussein E-SO. 2019. The usefulness of retinoic acid supplementation during in vitro oocyte maturation for the in vitro embryo production of livestock: a review. *Animals*, 9: 561.
- Abeydeera LR, Wang W-H, Cantley TC, Rieke A, Day BN. 1998. Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biology of Reproduction*, 58: 213–218.
- Agarwal A, Said TM. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*, 9: 331–345.
- Agarwal A, Allamaneni SS. 2004. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, 9: 338–347.2
- Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar B.J, Shaman A, Gupta S. 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 10: 49–80.
- Ahmed A, Cudmore MJ, 2009. Can the biology of VEGF and haem oxygenases help solve pre- eclampsia? *Biochem Soc Trans*, 37, 1237–1242.
- Aitken RJ. 2019. Impact of oxidative stress on male and female germ cells; implications for fertility. *Reproduction*, 159: R189–R201.
- Akanmu D, Cecchini R, Aruoma OI, Halli B. 1991. The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys*, 288: 10–6.
- Arias-Álvarez M, García-García R, López-Tello J, Rebollar P, Gutiérrez- Adán A, Lorenzo P. 2018. α -Tocopherol modifies the expression of genes related to oxidative stress and apoptosis during in vitro maturation and enhances the developmental competence of rabbit oocytes. *Rep Fert Develo*, 30: 1728–1738.
- Aruoma OI, Whiteman ME, Halliwell B. 1997. The antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun*, 231: 389–91.
- Asmus KD, Bensasson RV, Bernier JL, Houssin R, Land EJ. 1996. One electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reactions involving ergothioneine and vitamin C. *Biochem J*, 315: 625–9.
- Attia YA, Al-Harathi MA, El-Shafey AS, Rehab YA, Kim WK, 2017. Enhancing tolerance of broiler chickens to heat stress by supplementation with vitamin E, vitamin C and/or probiotics. *Ann Anim Sci*, 17, 1–15.
- Attia YA, Abou-Shehema B, Abdellah AA, Aly OM, El-Naggar A. 2020. Effect of ascorbic acid and/or alpha-tocopherol supplementation on semen quality, metabolic profile, antioxidants status, and DNA of roosters exposed to heat stress. *J Anim Plant Sci*, 30: 325–335.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. 2005. Mitochondria, oxidants and aging. *Cell*, 120: 483–495
- Balasubramanian S, Rho GJ. 2007. Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. *Animal Reproduction Science*, 98: 282–292.
- Brackett BG, Zuelke KA. 1993. Analysis of factor involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 43–64.
- Braga OV, Komninou ER, Vieira AD, Mondadori RG. 2019. Approaches to reduce lipids: a review of its impacts on in vitro embryo production. *Rev Bras Reprod Anim*, 43: (1), 3–7.
- Canel NG, Suva M, Bevacqua RJ, Arias ME, Felmer R, Salamone DF. 2018. Improved embryo development using high cysteamine concentration during IVM and sperm co-culture with COCs previous to ICSI in bovine. *Theriogenology*, 117: 26–33.
- Çizmeçi SÜ, Dinç DA, Bucak MN, Yeşilkaya ÖF, Çiftçi MF, Ağır V, Gölbaşı M, Sarı A, Çay HA. 2022. L-ergotiyonin ve fetuinin blastosist gelişim oranlarına etkisi. *Eurasian J Vet Sci*, 38 (1): 17–23.
- Da Broi MG, Navarro PA. 2016. Oxidative stress and oocyte quality: Ethio-pathogenic mechanisms of minimal/mild endometriosis-related infertility. *Cell Tissue Res*, 364: 1–7.
- Dalvit G, Llanes SP, Descalzo A, Insani M, Beconi M, Cetica P. 2005. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Domest Anim*, 40(2): 93–7.
- De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Molecular Reproduction and Development*, 45: 451–457.
- De Matos DG, Furnus CC, Moses DF. 1997. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction* 57: 1420–1425.
- De Matos DG, Furnus CC. 2000. The importance of having high glutathione (gsh) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of P-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, 53: 761–771.
- De Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. 2002a. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*, 57: 1443–1451.
- De Matos DG, Herrera C, Cortvrindt R, Smitz J, Van Soom A, Nogueira D, Pasqualini SR. 2002b. Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. *Mol Reprod Dev*, 62: 203–209.
- Du BT, Takahashi K, Ishida GM, Nakahara K, Saito H, Kurachi H. 2006. Usefulness of intralovarian artery pulsatility and resistance indices measurement on the day of follicle aspiration for the assessment of oocyte quality. *Fertil. Steril.* 85: 366–370.
- Enginler SÖ, Özdaş ÖB, Sandal Aİ, Arıcı R, Ertürk E, Baran A, Toydemir TFS, Tek Ç, Kılıçarslan MR, Ak K. 2016. The Effect of Cysteamine and Oviductal Cells in Different Culture Media on the Development of Sheep Embryos. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22 (1): 139–145.
- Enginler SÖ, Özdaş ÖB, Sandal Aİ, Arıcı R, Gündüz MC, Baran A, Tek Ç, Kılıçarslan MR, Ak K. 2015. Effects of Cysteamine on Sheep Embryo Cleavage Rates. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ*, 41 (1): 37–42.
- Ey J, Schömig E, Taubert D. 2007. Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine. *J Agric Food Chem*, 55: 6466–74.
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day B. 1994. Use of low salt culture medium with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biology of Reproduction*, 51: 633–639.
- Furnus CC, de Matos DG, Moses DF. 1998. Cumulus expansions during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship level and its role on subsequent embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 51: 76–83.
- Furnus CC, de Matos DG. 1999. The availability of cysteine in culture media appears to be the limiting factor for glutathione synthesis in mammalian oocytes. *Theriogenology*, 51: 373.
- Gasparrini G, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L. 2000. Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology*, 54: 1537–1542.
- Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, Zicarelli L. 2006. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology*, 65: 275–287.
- Grabowska R, Błaszczak B, Stankiewicz T, Banaś T, Hale S, Udała J. 2016. Prepubertal ve pubertal domuzlarda oosit kalitesi. *Türk J Veterinerlik Anim Sci*, 40: 89–94.

- Guerin P, El Moutassim S, Menezo Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in preimplantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7: 175-189.
- Halliwell B, Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen derived species. *FEBS Lett*, 281: 9-19.
- Halliwell B, Cheah IK, Drum CL. 2016. Ergothioneine, an adaptive antioxidant for the protection of injured tissues? A hypothesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 470:245-250.
- Haris SE, Picton HM. 2007. Metabolism of follicles and oocytes during growth and maturation. In: Tan SL, Chian RC, Buckett WM (editors). *In-Vitro Maturation of Human Oocytes, Basic Science to Clinical Application*, 1st ed. Montreal, Informa Health Care press. pp. 15-36.
- Hartman PE. 1990. Ergothioneine as an antioxidant. *Methods Enzymol*, 186: 310-8.
- Hashem NM, Gonzalez-Bulnes A, Simal-Gandara J. 2020. Polyphenols in farmed animals: source of reproductive gain or waste? *Antioxidants*, 9:1023.
- Issels RD, Nagele A, Eckert KG, Wilmanns W. 1988. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochemical Pharmacology*, 37: 881-888.
- Kang JT, Atikuzzaman M, Kwon DK, Park SJ, Kim SJ, Moon JH, Koo OJ, Jang G, Lee BC. 2012. Developmental competence of porcine oocytes after in vitro maturation and in vitro culture under different oxygen concentrations. *Zygote*, 20: 1-8.
- Kehrer JP, Lund LG. 1994. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17: 65-75.
- Kerley RN, McCarthy C, Kell DB, Kenny LC. 2018. The potential therapeutic effects of ergothioneine in pre-eclampsia. *Free Radic Biol Med*, 117: 145-157.
- Kharache SD, Agrawal S, Pathak J, Sikarwar AKS, Gangawar C, Ranjan R, Goel AK, Jindal SK, Agarwal SK. 2016. Influence of cysteamine supplementation during in vitro culture of early stage caprine embryos on blastocyst production. *Indian Journal of Animal Sci*, 86 (3): 304-306.
- Kiani-Esfahani A, Bahrami S, Tavalae M, Deemeh MR, Mahjour AA, Nasr-Esfahani MH. 2013. Cytosolic and mitochondrial ROS: Which one is associated with poor chromatin remodeling? *Syst Biol Reprod Med*, 59: 352-359.
- Lamhounwah AM, Tein I. 2006. Novel localization of OCTN1, an organic cation/ carnitine transporter, to mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 345: 1315-1325.
- Lian HY, Gao Y, Jiao GZ, Sun MJ, Wu XF, Wang TY. 2013. Antioxidant supplementation overcomes the deleterious effects of maternal restraint stress induced oxidative stress on mouse oocytes. *Reproduction*, 146: 559-568.
- Lojkić M, Getz I, Samardžija M, Matković M, Bacić G, Karadžole T, Macesić N, Folnozić I, Sporić B. 2012. Effect of cysteamine supplementation during in vitro culture of early stage bovine embryos on blastocyst rate and quality. *Acta Vet Brno*, 81: 229-234.
- Lu J, Wang Z, Cao J, Chen Y, Dong YA. 2018. Novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 16: 80.
- Marques MG, Nicacio AC, Oliveira VP, Nascimento AB, Milazzotto MP. 2007. In vitro maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. *Animal Reproduction Sci*, 97(3-4): 375-381.
- Meier T, Issels R. 1995. Promotion of cysteine uptake. *Methods in Enzymology*, 252: 103-112.
- Meister A. 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Sci*, 220: 472-477.
- Meldrum DR, Casper RF, Diez-Juan A, Simon C, Domar AD, Frydman R. 2016. Aging and the environment affect gamete and embryo potential: Can we intervene? *Fertil Steril*, 105: 548-559.
- Mishra A, Reddy IJ, Dhali A, Javvaji PK. 2018. L-Ergothioneine improves the developmental potential of in vitro sheep embryos without influencing OCTN1-mediated cross-membrane transcript expression. *Zygote*, 1: 13.
- Mitsuyama H, May JM. 1999. Uptake and antioxidant effects of ergothioneine in human erythrocytes. *Clin Sci*, 97: 407-11.
- Mohindru A, Fisher JM, Rabinovitz M. 1985. Endogenous copper is cytotoxic to a lymphoma in primary culture which requires thiols for growth. *Experientia*, 41: 1064-1066.
- Natarajan R, Shankar MB, Munuswamy D. 2010. Effect of α -tocopherol supplementation on in vitro maturation of sheep oocytes and in vitro development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. *J Assist Reprod Genet*, 27: 483-490.
- Obayashi K, Kurihara K, Okano Y, Masaki H, Yarosh DB. 2005. L-Ergothioneine scavenges superoxide and singlet O and suppresses TNF- α and MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts. *J Cosmet Sci*, 56: 17-27.
- Olson SE, Seidel Jr GE. 2000. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol Rep*, 62: 248-252.
- Oyamada T, Fukui Y. 2004. Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Dev*, 50: 107-117.
- Öztürkler Y. 2015. Koyun ve Keçilerde Kısa Süreli Östrus Senkronizasyonu. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics*, 1(2): 9-19
- Paul BD, Snyder SH. 2010. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell Death Differ*, 17: 1134-1140.
- Peng J, Xiang W, Tang Q, Sun N, Chen F, Yuan J. 2008. Comparative analysis of astaxanthin and its esters in the mutant E1 of *Haematococcus pluvialis* and other green algae by HPLC with a C30 column. *Sci China C Life Sci*, 51(12): 1108-15.
- Perreault SD, Barbee RR, Slott VL. 1988. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Developmental Biology*, 125: 181-186.
- Rajesh N, Madhira BS. 2010. Deecaraman Munuswamy *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27: 483-490.
- Ranjbar A, Eslampour MA, Moghadam MR. 2019. Effect of Cysteamine and 13-Cis-Retinoic Acid on Bovine In Vitro Embryo Production. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 25 (2): 231-237.
- Richards JS. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev*, 15: 725-751.
- Rodríguez-González E, López-Bejar M Izquierdo D, Paramio M-T. 2003. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue matured with cysteamine supplementation. *Reprod Nutr Dev*, 43: 179-187.
- Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. 2008. Oxidative stress and antioxidants: Exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update*, 14: 345-357.
- Rush EC, Katre P, Yajnik CS. 2014. Vitamin B12: One carbon metabolism, fetal growth and programming for chronic disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1-6
- Sagara J, Miura K, Bannai S. 1993. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *Journal of Neurochemistry*, 61: 1667-1671.
- Saikhun K, Faisaikarm T, Ming Z, Lu KH, Kitiyanant Y. 2008. α -Tocopherol and l-ascorbic acid increase the in vitro development of IVM/IVF swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Animal*, 10: 1486-1490.
- Sandal Aİ. 2020. İn Vitro Sığır Embriyo Üretimi: FCS ve Sisteaminin Bölünme Hızındaki Rolü. *CBU-SBED*, 7(2): 136-139.
- Sandal Aİ, Özdaş ÖB. 2015. Vitrification of in vitro-produced bovine embryos matured in modified TCM-199 medium. *Turk J Vet Anim Sci*, 39: 688-692.

- Sandal Aİ, Şenlikçe H, Elgün T, Arıcı R, Enginler SÖ, Baran A, Ak K, İrez T, Özdaş ÖB. 2021. Improvement of bovine in vitro embryo production by fetal calf serum and cysteamine supplementation and investigation of freezability. Ankara Univ Vet Fak Derg, 68: 33-38.
- Singhal S, Prasad S, Singh B, Prasad JK, Gupta HP. 2009. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for in vitro culture of buffalo oocytes recovered in vivo. Anim. Reprod. Sci, 113: 44-50.
- Sohel MMH, Akyuz B, Konca Y, Arslan K, Sariozkan S, Cinar MU. 2019. Oxidative stress modulates the expression of apoptosis-associated microRNAs in bovine granulosa cells in vitro. Cell Tissue Res. 376: 295-308.
- Song K, Lee E. 2007. Modification of maturation condition improves oocyte maturation and in vitro development of somatic cell nuclear transfer pig embryos. J Vet Sci, 8: 81-87.
- Sudano MJ, Mattos MCC, Fernandes CB, Mazieiro RR, Landim-Alvarenga FC. 2010. In vitro production of bovine embryos using Sigma antioxidant supplement®, α -tocopherol and L-ascorbic acid. Anim Reprod, 7: 42-48.
- Sugino N. 2006. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. Anim Sci, 77: 556-565.
- Sutovsky P, Schatten G. 1997. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. Biology of Reproduction 56: 1503-1512.
- Swelum AA, Abdelnour SA, Sheiha AM, Hashem NM, Taha AE, Khafaga AF, Attia Y, Al-Mutary MG, Abd El- Bar MM, Ohran H, Nagadi SA, Abd El-Hack ME. 2022. Enhancing in vitro oocyte maturation competence and embryo development in farm animals: roles of vitamin-based antioxidants – a review. Ann Anim Sci, 22: 1-33-19.
- Szpera-Gozdziwicz A, Breborowicz GH. 2014. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of pre-eclampsia. Front Biosci, 19: 734-746.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A. 1993. Biology of Reproduction, 49(2): 28-232.
- Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Okano A. 1995. Effect of co-culture cells on the uptake of cystine into bovine embryos. Theriogenology 43: 332.
- Tareq KM, Akter QS, Khandoker MA, Tsujii H. 2012. Selenium and vitamin E improve the in vitro maturation, fertilization and culture to blastocyst of porcine oocytes. J Reprod Dev, 58: 621-628.
- Thiyagarajan B, Valivittan K. 2009. Ameliorating effect of vitamin E on in vitro development of preimplantation buffalo embryos. J Assist Rep Genet, 26: 217-225.
- Wang F, Yang J. 2012. A comparative study of caffeic acid and a novel caffeic acid conjugate SMND-309 on antioxidant properties in vitro. Food Sci Technol, 46: 239-244.
- Yeon WJ, Sun W P, Mohammad SH, Sue K, Ji HK, So HL, Sung KK, Byeong CL, Woo SH. 2006. Antiapoptotic and embryotrophic effects of α -tocopherol and l-ascorbic acid on porcine embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer, Theriogenology, 66(9): 2104-2112.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Prusel VG. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. Biol Reprod, 49: 89-94.
- Zhou P, Wu YG, Li Q, Lan GC, Wang G, Gao D, Tan JH. 2008. The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes. Reproduction, 135: 605-611.
- Zhu BZ, Mao L, Fan RM, Zhu JG, Zhang YN, Wang J, Kalyanaraman B, Frei B. 2011. Ergothioneine prevents copper-induced oxidative damage to DNA and protein by forming a redox-inactive ergothioneine-copper complex. Chem Res Toxicol, 24: 30-34.
- Zullo G, Albero F, Neglia G, De Canditiis C, Bifulco G, Campanile G, Gasparrini B. 2016. Ergothioneine supplementantion during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. Theriogenology, 86: 688-697.
- Zullo G, Salzona A, Bifulco G, Longobardi V, Albero G, Neglia G, Gasparrini B. 2014. Effect of L-Ergothioneine supplementation during culture on in vitro embryo development in buffalo (*bubalus bubalis*). Reproduction, Fertility and Development, 27 (1): 160.