

Sığır Embriyolarının *in vitro* Gelişiminde Kültür Medyumlarına Katılan Antioksidanların Etkisi ^[1]

Mustafa Numan BUCAK *  Muharrem SATILMIŞ * Sedat Hamdi KIZIL *
Tahir KARAŞAHİN * Numan AKYOL *

[1] Bu çalışma TUBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 107 O 884)

* Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, Lalahan, Ankara - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-413

Özet

Bu çalışmanın konusu, *in vitro* sığır embriyolarının gelişiminde kültür medyumlarına katılan antioksidanların etkisinin araştırılması olmuştur. Lokal mezbahadan sağlanan inek ovaryumları fizyolojik tuzlu su (%0.9), antibiyotik içeren taşıma sıvısı içerisinde ve 30°C'lik sabit sıcaklık sağlayan termosta 2-3 saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Oositlerin *in vitro* maturasyonu, fertilizasyonu sonrası, farklı antioksidanların (sisteamin 25 µM, sisteamin 50 µM; dithioerythritol 25 µM, dithioerythritol 50 µM; glutatyon 5 µM, glutatyon 10 µM) ilave edildiği Charles Rosencrans (CR1aa) ve Sentetik Ovidukt Sıvısı (SOF) embriyo kültür medyumlarında kültür periyoduna alınarak embriyo gelişim aşamaları takip edilmiştir. Glutatyon (5 ve 10 µM) içeren CR1aa kültür medyumunda, diğer gruplara nazaran ekspand blastosist aşamasında embriyo elde edilememiş, bu fark ise önemli sayılmıştır ($P<0.05$). Glutatyon içeren gruplar diğer gruplara göre morula, blastosist ve hatched (zonadan çıkmış) blastosist aşamasına gelen embriyo oranlarını önemli düzeyde olmasa da kötüleştirmiştir. Bölünmüş embriyo, bölünme ve kültüre alınan oosit aşamasından blastosist aşamasına gelen embriyo oranlarında dithioerythritol (50 µM) içeren CR1aa medyumunu, diğer gruplara göre daha yüksek sonuçlar vermesine rağmen, bu durum istatistiksel olarak önemli görülmemiştir ($P>0.05$). Farklı antioksidanlar içeren SOF kültür medyumunda, dithioerythritol (50 µM)'un antioksidan içermeyen gruba göre, bölünmüş embriyo oranında önemli artışlar sağladığı görülmüştür ($P<0.05$). Dithioerythritol (25 µM) ve glutatyon (5 ve 10 µM) içeren gruplarda ekspand ve hatched blastosist aşamasına gelen embriyo elde edilememiştir. Çalışma grupları arasında morula, ekspand ve hatched blastosiste gelişen embriyo oranlarında istatistiksel olarak farklılıklar oluşmamıştır. Bu çalışmada ilave olarak, CR1aa ve SOF embriyo kültür medyumlarında embriyoların gelişim oranları karşılaştırılmıştır. Hatched blastosist aşamasına gelen embriyo oranları hariç, diğer embriyo gelişim aşamaları oranlarda CR1aa medyumunun, SOF medyumuna göre önemli oranda üstünlük sağladığı görülmüştür ($P<0.01$).

Anahtar sözcükler: Sığır embriyosu, Embriyo gelişimi, Antioksidan, CR1aa, SOF

Effect of Antioxidants Added to Culture Media on the *in vitro* Development of Bovine Embryos

Summary

The objective of the present study was to investigate the effect of antioxidants added to culture media on the development of *in vitro* bovine embryos. Cow ovaries provided from local slaughterhouses were transported to the laboratory in transport medium, consisting of physiological saline (0.9%) and antibiotics, at 30°C within 2-3 hours. Following their *in vitro* maturation and fertilization, the oocytes were cultured in Charles Rosenkrans medium (CR1aa) and synthetic oviduct fluid (SOF) medium containing different antioxidants (25 µM cysteamine, 50 µM cysteamine; 25 µM dithioerythritol, 50 µM dithioerythritol; 5 µM glutathione, 10 µM glutathione) and were monitored for embryonic development. In the CR1aa culture medium containing glutathione (5 and 10 µM), the expanded blastocyst stage was not obtained, compared to the other groups, and this difference was considered to be significant ($P<0.05$). The percentages of embryos reaching the stages of morula, blastocyst and hatched blastocyst decreased insignificantly in the groups with glutathione. As regards percentages of cleavage embryos, cleavage and development of blastocyst embryos from cultured oocytes, CR1aa medium with dithioerythritol (50 µM) gave higher results than the other groups, but this difference was statistically insignificant ($P>0.05$). Upon the investigation of SOF culture medium containing different antioxidants, it was determined that dithioerythritol (50 µM) provided significant increase in the percentage of cleavage embryos ($P<0.05$), compared to the group with no antioxidant. Embryos did not reach the expanded blastocyst and hatched blastocyst stages in the groups with dithioerythritol (25 µM) and glutathione (5 and 10 µM). Statistically, differences did not exist in the percentages of embryos reaching the morula, and expanded and hatched blastocyst stages among study groups. Furthermore, in the present study, development rates of embryos were compared in culture media of CR1aa and SOF. It was determined that CR1aa medium produced higher percentages of embryonic developmental stages, excluding percentages of embryos reaching the hatched blastocyst stage, in comparison to SOF medium ($P<0.01$).

Keywords: Bovine embryo, Embryonic development, Antioxidant, CR1aa, SOF



İletişim (Correspondence)



+90 312 8651196



mustafanbucak@yahoo.com

GİRİŞ

Dünyada *in vitro* embriyo üretimi, sığır yetiştiriciliğinde en önemli biyoteknolojik yöntemlerden biridir. Bununla birlikte, oositten blastosist üretim oranı %25-30 düzeylerinde olmakta ve bu oran düşük sayılmaktadır. Bu düşük oranın nedeni ise olasılıkla embriyonun gelişim için *in vivo* ortam şartlarını tam olarak bulamayışı ve *in vitro* ortamda morfolojik ve gen ekspresyonu yönünden değişimlere uğramasıdır ¹. Bu değişimler çok çeşitli faktörlerce uyarılmaktadır. Bu faktörler arasında, oositin gelişimi için folliküler yapı, oosit büyüklüğü, yaş, ırk, spermaya bağlı faktörler, kültür medyumlarının oluşturduğu ortamlar ve ortamda gelişen oksidatif stres sayılabilir ²⁻⁵. Günümüzde sığır embriyolarının gelişiminde en yaygın kültür medyumu olarak kullanılanlar, sentetik ovidukt sıvısı (SOF), charles rosencrans (CR1aa), doku kültür medyum 199 (TCM 199), KSOM medyumlarıdır. Bu medyumların etkinlikleri ise çalışıldığı laboratuvarlara göre değişim göstermektedir. Medyumlar içerdikleri katkı maddeleri (kalf serum, serum albumini, aminoasitler, büyüme faktörleri, somatik hücrelerden hazırlanmış kokültür katkı maddeleri, antioksidanlar vs) yönüyle *in vitro* embriyo gelişiminde de büyük farklılıklar oluşturmaktadır ^{1,6,7}.

Oksidatif stres faktörü ise, ortamdaki serbest oksijenin yanında hasarlı embriyo gelişiminin etiolojisiyle de ilişkilidir. Oksidatif stres sonrası embriyo ve embriyo ortamı kökenli olarak gelişen fazla miktardaki serbest oksijen radikalleri (ROS), hücrelerin içerdiği moleküllerde değişimlere yol açarak, embriyonun gelişimini baskı altına almaktadır. Aerobik metabolizma normal şartlar altında ROS üretimi yapmaktadır. ROS üretimi, embriyo için gerekli olan moleküler oksijen metabolizmasında serbest oksijenin indirgenmesiyle oluşmaktadır. Embriyo tarafından üretilen serbest radikallerin başlıcaları, superoksit anyon radikali, hidrojen peroksit ve hidroksi radikalidir. Bazal düzeyde salınan ROS, embriyo metabolizmasında, gelişiminde ve implantasyonunda düzenleyici etki göstermektedir ⁸. Serbest radikal üretimini tetikleyen faktörler endojen ve ekzojen faktörler olarak gruplandırılabilir. Endojen faktörler arasında, oksidatif fosforilasyon, NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, glikolat oksidaz sıralanabilir. Ekzojen faktörler ise genel olarak ortamdaki oksijen konsantrasyonu, metalik katyonlar, gün ışığına maruz kalma, amin oksidazlar ve spermatozoa olarak sınıflandırılabilir ^{8,9}. Oksidatif stres sonrası gelişen hasarlar, aşırı düzeyde salınan ROS tarafından oluşturulmakta ve bu serbest radikaller, hücre membranlarını geçerek lipit, protein, nükleik asit gibi hücresel moleküllerin yapısını değiştirerek mitokondride değişimlere, embriyonal hücre gelişiminde bloklanmaya, aşırı düzeyde ATP tüketimine ve apoptoza yol açmaktadır ^{8,10}. Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres ve hasara karşı, *in vivo* şartlarda embriyonun kendisinde ve yaşadığı dişi dölerme kanalının sahip

olduğu antioksidan sistemler bulunmakta ve embriyoyu koruma altına almaktadır. Bu antioksidan sistemler arasında, glutatyon, taurine, hipotaurin, askorbat, pyruvat, vitamin E, glutatyon peroksidaz, superoksit dismutaz, katalaz sayılabilir ⁸. Fakat *in vitro* şartlarda gelişen embriyolarda embriyonun kendi içerdiği antioksidan sistemleri dışında oksidatif strese karşı koruyucu başka bir mekanizmaya sahip olmadıklarından, *in vitro* embriyo üretiminde oksidatif stresin kontrol ve koruma altına alınması gerekli olmaktadır. Bu amaçla embriyonun gelişeceği *in vitro* kültür medyumlarına, antioksidan enzimler (SOD, CAT vb), metal şelatörler (EDTA vb), thiol bileşikleri (glutatyon, sisteamin vb), proteinler ve vitaminler katılmakta, ROS'un embriyo gelişimi üzerindeki olumsuz etkileri azaltılmaya çalışılmaktadır. Fakat, embriyo kültür ortamının oksidatif stres ve oksidatif stres faktörlerinden arındırılması kaçınılmaz ve aynı zamanda kompleks bir problemdir. Kültür ortamlarında kullanılacak antioksidanların ve dozlarının saptanması kimi zaman zor olmakta, ortama katılan aşırı dozlardaki antioksidanların olumsuz etkiler yaptıkları gözlenmektedir. Bununla birlikte, ortama ilave edilen antioksidanların etkileri üzerinde kültür medyumları ve bileşenleri, kullanılan suyun saflık derecesi gibi çok çeşitli faktörler de sorumlu olmaktadır ^{1,4}. Bu nedenlerden yapılan çalışmanın amacı, embriyo kültür ortamlarına katılan bazı antioksidanların *in vitro* embriyo gelişimi üzerine etkilerinin araştırılması olmuştur.

MATERYAL ve METOT

Lokal mezbahadan sağlanan 2-4 yaşlı Holstein inek ırkına ait ovaryumlar fizyolojik tuzlu su (%0.9) ve antibiyotik (gentamisin 1 ml/L) içeren taşıma sıvısı içerisinde ve 30°C'lik sabit ısı sağlayan termosta 2-3 saat içerisinde laboratuvara getiriltiler *in vitro* embriyo üretim sürecine alınmıştır. Oositlerin *in vitro* maturasyonu amacıyla %10 fetal kalf serum (FCS) + 2 µg/ml FSH katkılı TCM-199 medyumunu kullanılmış ve 22 saat süreyle %5 CO₂, %95'in üzerinde nem ve 39°C'deki inkubatörde maturasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kumulus ekspansiyonu görülen oositlerin Brackett Oliphant (BO) medyumunu ile direkt yıkama yöntemi ile 5-6 saat süreyle fertilizasyonları sağlanmıştır. Fertilizasyon işlemi Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Suni Tohumlama laboratuvarında üretilen ve içerisinde 175x105 spermatozoa bulunan 0.25 ml'lik payetlerde dondurulmuş Holstein ırkı boğa spermaları kullanılmıştır. Fertilizasyon aşamasından sonra kumulus hücrelerinden pipetlenerek uzaklaştırılan oositler farklı dozlarda antioksidanların (sisteamin 25 µM, 50 µM; dithioerythritol 25 µM, 50 µM; glutatyon 5 µM, 10 µM) ilave edildiği ve edilmediği (kontrol) CR1aa ve SOF embriyo kültür medyumlarında kültür periyoduna alınmıştır. Her bir 100 mikrolitrelik

kültür drobunda 15-20 oosit kültüre edilmiş ve iki dene-
me protokolü oluşturulmuştur.

Kültür ortamının 2. günü sonunda bölünme kont-
rollerin ardından embriyoların kültür medyumunda orta-
mında gelişimleri sağlanarak, 7. gün blastosist oranları
ve embriyo kaliteleri değerlendirilmiştir, 8 ve 9. günlerde
ise embriyo gelişimleri takip edilerek hatched (zonadan
çıkma) oranları kayıt edilmiştir. Farklı antioksidan içeren
ve içermeyen kültür medyumlarındaki embriyo gelişim
oranlarının karşılaştırılmasında Z testi kullanılmıştır. Fark-
lılığın $P<0.05$ 'den düşük olması istatistiksel olarak önem-
li kabul edilmiştir. Uygulamalar, birbirinden bağımsız en
az 8 replikasyondan oluşmuştur.

BULGULAR

Farklı antioksidanlar içeren CR1aa kültür medyumunda
ortamında kültüre alınan oositlerden 8. günde yapılan
kontrollerde glutatyon (10 ve 5 μM) içeren grupta, diğer
gruplara nazaran ekspanded blastosist aşamasında
embriyo elde edilememiş, bu fark ise önemli sayılmıştır
($P<0.05$). Benzer şekilde, glutatyon içeren gruplar diğer
gruplara göre morula, blastosist ve hatched (zonadan
çıkan) blastosist aşamasına gelen embriyo oranlarını
önemli düzeyde olmasa da kötüleştirmiştir. Kültür 48.
saat sonu bölünmüş embriyo, bölünmüş aşamasından ve
kültüre alınan oosit aşamasından blastosist aşamasına

Table 1. Sığır oositlerinin maturasyonu ve fertilizasyonu sonrası farklı antioksidanlar içeren CR1aa kültür medyumunda embriyo gelişim oranları
Table 1. Embryo development rates in CR1aa culture medium including different antioxidants after maturation and fertilisation of bovine oocytes

Gruplar	In vitro kültür 48. saat	In vitro kültür 7. gün		In vitro kültür 7.-8. gün		In vitro kültür 8. gün		In vitro kültür 9.-10. gün	
	Kültür ortamında 48. saat sonu bölünmüş embriyo %	Bölünme aşamasından morula aşamasına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten morula aşamasına gelen embriyo %	Bölünme aşamasından blastosist aşamasına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten blastosist aşamasına gelen embriyo %	Bölünme aşamasından ekspanded blastosist aş- masına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten ekspanded blastosist aş- masına gelen embriyo %	Bölünme aşamasından hatched blastosist aşama- sına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten hatched blastosist aş- masına gelen embriyo %
CR1aa (kontrol)	41.3 (50/121)	26.0 (13/50)	10.7 (13/121)	24.0 (12/50)	9.9 (12/121)	12.0 (6/50) ^a	5.0 (6/121) ^a	4.0 (2/50)	1.7 (2/121)
Dithioerythritol (50 μM)	46.4 (58/125)	25.9 (15/58)	12.0 (15/125)	25.9 (15/58)	12.0 (15/125)	5.2 (3/58) ^{ab}	2.4 (3/125) ^{ab}	3.4 (2/58)	1.6 (2/125)
Dithioerythritol (25 μM)	49.1 (53/108)	26.4 (14/53)	13.0 (14/108)	20.8 (11/53)	10.2 (11/108)	11.3 (6/53) ^a	5.6 (6/108) ^a	1.9 (1/53)	0.9 (1/108)
Sisteamin (50 μM)	49.2 (61/124)	24.6 (15/61)	12.1 (15/124)	23.0 (14/61)	11.3 (14/124)	11.5 (7/61) ^a	5.6 (7/124) ^a	3.3 (2/61)	1.6 (2/124)
Sisteamin (25 μM)	44.0 (48/109)	16.7 (8/48)	7.3 (8/109)	12.5 (6/48)	5.5 (6/109)	8.3 (4/48) ^a	3.7 (4/109) ^a	4.2 (2/48)	1.8 (2/109)
Glutatyon (10 μM)	49.1 (57/116)	14.0 (8/57)	6.9 (8/116)	14.0 (8/57)	6.9 (8/116)	0 (0/57) ^b	0 (0/116) ^b	0.0 (0/57)	0 (0/116)
Glutatyon (5 μM)	48.1 (39/81)	17.9 (7/39)	8.6 (7/81)	17.9 (7/39)	8.6 (7/81)	0 (0/39) ^b	0 (0/81) ^b	0.0 (0/37)	0 (0/81)
P	-	-	-	-	-	*	*	-	-

*: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası farklılıklar önemlidir ($P<0.05$), ($P>0.05$)

Table 2. Sığır oositlerinin maturasyonu ve fertilizasyonu sonrası farklı antioksidanlar içeren SOF kültür medyumunda embriyo gelişim oranları
Table 2. Embryo development rates in SOF culture medium including different antioxidants after maturation and fertilisation of bovine oocytes

Gruplar	In vitro kültür 48. saat	In vitro kültür 7. gün		In vitro kültür 7.-8. gün		In vitro kültür 8. gün		In vitro kültür 9.-10. gün	
	Kültür ortamında 48. saat sonu bölünmüş embriyo %	Bölünme aşamasından morula aşamasına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten morula aşamasına gelen embriyo %	Bölünme aşamasından blastosist aşamasına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten blastosist aşamasına gelen embriyo %	Bölünme aşamasından ekspanded blastosist aş- masına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten ekspanded blastosist aş- masına gelen embriyo %	Bölünme aşamasından hatched blastosist aşama- sına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten hatched blastosist aş- masına gelen embriyo %
SOF (kontrol)	22.6 (26/115) ^b	15.4 (4/26)	3.5 (4/115)	15.4 (4/26) ^a	3.5 (4/115) ^a	0.0 (0/26)	0.0 (0/115)	0.0 (0/26)	0.0 (0/115)
Dithioerythritol (50 μM)	37.0 (51/138) ^a	7.8 (4/51)	2.9 (4/138)	5.9 (3/51) ^{ab}	2.2 (3/138) ^{ab}	3.9 (2/51)	1.4 (2/138)	3.9 (2/51)	1.4 (2/138)
Dithioerythritol (25 μM)	28.0 (23/82) ^{ab}	4.3 (1/23)	1.2 (1/82)	0.0 (0/23) ^b	0.0 (0/82) ^b	0.0 (0/23)	0.0 (0/82)	0.0 (0/23)	0.0 (0/82)
Sisteamin (50 μM)	31.9 (37/116) ^{ab}	13.5 (5/37)	4.3 (5/116)	13.5 (5/37) ^a	4.3 (5/116) ^a	5.4 (2/37)	1.7 (2/116)	5.4 (2/37)	1.7 (2/116)
Sisteamin (25 μM)	28.0 (26/93) ^{ab}	15.4 (4/26)	4.3 (4/93)	11.5 (3/26) ^{ab}	3.2 (3/93) ^{ab}	7.7 (2/26)	2.2 (2/93)	7.7 (2/26)	2.2 (2/93)
Glutatyon (10 μM)	30.9 (42/136) ^{ab}	9.5 (4/42)	2.9 (4/136)	9.5 (4/42) ^a	2.9 (4/136) ^a	0.0 (0/42)	0.0 (0/136)	0.0 (0/42)	0.0 (0/136)
Glutatyon (5 μM)	27.7 (23/83) ^{ab}	4.3 (1/23)	1.2 (1/83)	4.3 (1/23) ^{ab}	1.2 (1/83) ^{ab}	0.0 (0/23)	0.0 (0/83)	0.0 (0/23)	0.0 (0/83)
P	*	-	-	*	*	-	-	-	-

*: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası farklılıklar önemlidir ($P<0.05$), ($P>0.05$)

gelen embriyo oranları bakımından dithioerythritol (50 μ M) içeren kültür grubu, diğer gruplara göre daha yüksek sonuçlar vermesine rağmen, bu durum istatistiksel olarak önemli görülmemiştir ($P>0.05$) (Tablo 1).

Farklı antioksidanlar içeren SOF kültür medyumunda ortamında kültüre alınan oositlerden, 48. saat sonu yapılan kontrollerde dithioerythritol (50 μ M)'ün antioksidan içermeyen gruba göre bölünmüş embriyo oranında artışlar sağladığı görülmüştür ($P<0.05$). Dithioerythritol (25 μ M) ve glutatyon (10 ve 5 μ M) içeren gruplarda ekspanded ve hatched blastosist aşamasına gelen embriyo elde edilememiştir. Çalışma grupları arasında morula, ekspanded ve hatched blastosiste ulaşma oranlarında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmamıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Bu çalışmada CR1aa ve SOF embriyo kültür medyumlarında embriyoların gelişim oranları karşılaştırılmış ve Tablo 3'te elde edilen oranlar verilmiştir. Hatched blastosist aşamasına gelen embriyo oranları hariç, diğer embriyo gelişim aşamaları oranlarda CR1aa medyumunun, SOF medyumuna göre önemli oranda üstünlük sağladığı görülmüştür ($P<0.01$).

tadır^{10,13}. Bu nedenlerle, çoğu memeli hücre ortamındaki reaktif oksijen türleri için temizleyici görevi gören etkili antioksidanları (glutatyon, sistein, hipotaurine, katalaz, superoksit dismutaz vb) içermektedir¹⁴. Fakat bu endojen antioksidan sistemler, embriyoların *in vitro* kültür ortamında yeterli gelmemektedir¹⁵. Embriyoda en etkili antioksidan bileşiklerinden bazıları, glutatyon (GSH; glutamylcysteinylglycine) ve sistein'dir. Glutatyon ve sistein hücre içi fonksiyonlarının (DNA, protein sentezi) korunmasında ve reaktif türlerin zararlı etkilerine karşı önemli etkinliğe sahiptir¹⁶⁻¹⁸. Ortamda gelişebilecek GSH seviyesindeki artış, var olan peroksit seviyesindeki azalmayla eş zamanlı olarak meydana gelmekte ve fertilizasyon sonrası çekirdek dekondenzasyonuna, erkek gamet pronükleus formasyonuna eşlik etmektedir¹⁹⁻²¹.

Memeli embriyoların çok çeşitli kültür ortamlarında gelişmeleri sağlanmakta ve amaç blastosist verimini artırmaktır. Bu amaçlarla fertilizasyon sonrası oositler, farklı katkı maddeli kültür medyumlarında inkübe (CR1aa, SOF, katkı maddeli M199 vb) edildikleri gibi^{22,23} maturasyon ve fertilizasyon medyumlarına bazı antioksidanların da ilavesi yapılarak kültür sürecine katkıda bulunmaktadır^{24,25}. Yang ve ark.²⁶ sığırlarda yaptık-

Tablo 3. Sığır oositlerinin maturasyonu ve fertilizasyonu sonrası CR1aa ve SOF kültür medyumlarında embriyo gelişim oranları

Table 3. Embryo development rates in CR1aa and SOF culture media after maturation and fertilization of bovine oocytes

Gruplar	In vitro kültür 48. saat	In vitro kültür 7. gün		In vitro kültür 7.-8. gün		In vitro kültür 8. gün		In vitro kültür 9.-10. gün	
	Kültür ortamında 48. saat sonu bölünmüş embriyo %	Bölünme aşamasından morula aşamasına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten morula aşamasına gelen embriyo %	Bölünme aşamasından blastosist aşamasına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten blastosist aşamasına gelen embriyo %	Bölünme aşamasından ekspanded blastosist a- şamasına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten ekspanded blastosist a- şamasına gelen embriyo %	Bölünme aşamasından hatched blastosist a- şamasına gelen embriyo %	Kültüre alınan oositten hatched blastosist a- şamasına gelen embriyo %
CR1aa	46.7 (366/784) ^a	21.9 (80/366) ^a	10.1 (80/784) ^a	19.9 (73/366) ^a	9.3 (73/784) ^a	7.1 (26/366) ^a	3.3 (26/784) ^a	2.5 (9/366)	1.1 (9/784)
SOF	29.9(288/763) ^b	10.1 (23/228) ^b	3.0 (23/763) ^b	8.8 (20/228) ^b	2.6 (20/763) ^b	2.6 (6/228) ^b	0.8 (6/763) ^b	2.6 (6/228)	0.8 (6/763)
P	***	***	***	***	***	**	***	-	-

** : Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası farklılıklar önemlidir ($P<0.01$)

- : ($P>0.05$)

*** : Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası farklılıklar önemlidir ($P<0.001$)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Sığırlarda *in vitro* embriyo gelişimini olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörlerin başında oksidatif stres gelmektedir. Embriyo membran yapısının büyük oranda doymamış yağ asitlerinden oluşması, embriyoların kültür ortamında lipit peroksidasyonuna uğramasına neden olmaktadır^{11,12}. Neticede ortamda gelişen reaktif oksijen radikallerinin (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksi radikali vb) yol açtığı hücredeki oksidatif hasar, hücre fonksiyonlarının sürdürülmesine engel olmak-

ları bir çalışmada, CR1aa kültür medyumunda fertilizasyon sonrası %30 oranında blastosist oranı elde etmiş ve bu oranın elde ettiğimiz sonuçtan yüksek olduğu görülmüştür. Buna karşın, Sung ve ark.²⁷ ise morula aşamasındaki embriyo oranını %26, blastosist aşamasındaki embriyo oranını ise %19 bularak, bizim bulduğumuz sonuçlara yakın değerler elde etmiştir. Ayrıca çalışmamızda, ekspanded blastosist eldesinde CR1aa medyumunun SOF'a göre üstün olduğu görülmüş, fakat hatched blastosist oranlarında ise iki kültür medyumunu arasında önemli bir fark elde edilememiştir. Buradaki farklılıklar olasılıkla, kültür medyumunu bileşenleri, iyonik ve metabolik denge-

vb. bazı faktörleri içeren *in vitro* matürasyon/fertilizasyon/kültür şartlarından kaynaklanabilir.

Büyük ruminantlarda yapılan çalışmalarda matürasyon ve kültür medyumlarına katılan 100 µM sisteaminin, kontrol gruplarına göre matürasyon (%61 ve 55) ve blastosiste ulaşma oranlarında (%23.8 ve 17.1) önemli artışlar sağladığı gözlenmiştir^{28,29}, bunun yanısıra yapılan oksidatif stres ölçümlerinde antioksidanların embriyo ortamındaki antioksidan kapasiteyi²⁹⁻³² ve intrasellüler GSH-sistein seviyelerini³³ artırdığı belirtilmiştir. Bu noktada yapılan bir çalışmada sisteaminin etkinliği üzerinde katıldığı doz ve medyumun etkili olduğu vurgulanmıştır³⁴. Sisteaminin etkisinin ise ortamdaki GSH sentezi etkinliği üzerinden olduğu belirtilmiştir¹¹. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz sisteamin ilaveli kültür medyumlarındaki blastosist oranlarımızın kontrol gruplarına göre önemli artışlar sağlamamasına karşın, yukarıda değindiğimiz bazı çalışmalardan yüksek, bazılarında ise düşük oranlar verdiği görülmüştür. Elde edilen farklı sonuçların, matürasyon ve kültür medyumlarına ve bu medyumlara ilave edilen katkı maddeleri (hormonlar, büyüme faktörleri, tiol bileşikleri, amino asitler vb), inkübatör şartları, ovaryum materyali, hayvanın yaşı vb. bir takım faktörlere göre değişebileceğini düşündürmektedir.

Dithioerythritol ile aynı kimyasal yapıya ve moleküler ağırlığa sahip olan dithiothreitol ile ilgili yapılan çalışmalarda, dokularda çeşitli toksinlerle oluşturulan apoptozis ve oksidatif strese karşı önemli oranda koruyucu etkiler sağladığı belirtilmiştir^{35,36}. Domuzlarda spermatozoanın dithiothreitol ile inkübasyonu sonrası yapılan intrasitoplazmik spermatozoon enjeksiyonunda fertilitate ve blastosist oranlarında önemli artışlara neden olduğu gösterilmektedir³⁷. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlarda ise SOF medyumuna ilave edilen dithioerythritol (50 µM)'un kontrol grubuna göre bölünmüş embriyo oranında önemli düzeyde artış sağladığı görülmüştür.

Glutatyon enzimatik olmayan antioksidan olarak embriyo ve embriyonun bulunduğu ortamda oksidatif hasara ve ROS ürünlerine karşı etkinlik göstermektedir^{8,38}. Glutatyon, hücrelerde aminoasit transportu, DNA ve protein sentezi, disülfid bağlarının redüksiyonunda önemli fonksiyonlara sahiptir¹⁸. Sığır embriyolarında erken embriyonik gelişim oranlarının, embriyodaki GSH yoğunluğuyla direk ilişkili olduğu belirtilmiştir. Embriyoda GSH sentezinin inhibe edildiği durumlarda ortamda gelişen oksidatif stres ve açığa çıkan hidrojen peroksit radikali DNA'da hasarlar oluşmaktadır^{21,38,39}. Fare ve sığır embriyolarında yapılan çalışmalarda kültür medyumuna katılan GSH'nin bölünmüş embriyo aşamasında blokajın engellenmesinde ve embriyonun gelişiminde önemli katkılar yaptığı gösterilmiştir^{17,40,41}. Ancak çalışmamızda glutatyon içeren CR1aa ve SOF kültür ortamlarında, embri-

yo gelişim süresince diğer gruplara göre önemli farklılıklar görülmemiş ve ekspand ve hatched aşamasına gelen embriyo elde edilememiştir. Bu farklılıklardan olasılıkla ortam pH'sındaki değişimler, ortamdaki antioksidan varlığında embriyodaki GSH sentezinin artarak ROS ürünlerin oluşumunda aşırı bir inhibisyon meydana gelmesi, bu nedenle embriyo yaşamı için gerekli ROS ürün kaynağının ortamda kalmaması sorumlu olabilir.

Sonuç olarak, kültür medyumuna ilave edilen antioksidanların farklı kültür ortamlarında farklı davranışlar sergileyebildiği, SOF medyumuna ilave edilen dithioerythritol (50 µM)'un bölünmüş embriyo oranına önemli katkılar sağladığı söylenebilir. CR1aa ve SOF kültür ortamında antioksidanların embriyo gelişim üzerinde etkilerinin olmadığı, hatta ekspand ve hatched blastosist aşamasında CR1aa ortamına katılan glutatyonun ve SOF ortamına katılan dithioerythritol (25 µM)'un embriyo gelişimi üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu görülmüştür. CR1aa ve SOF kültür medyumlarının karşılaştırılmasında da, CR1aa embriyo kültürünün SOF'a göre embriyo gelişimi üzerinde üstün olduğu sonucuna varılmıştır.

Farklı kültür medyumlarına katılan antioksidanlar ile ilgili başka çalışmaların yapılması ve kültür ortamlarında etkili antioksidanların ve dozlarının saptanmasıyla kültür medyumlarının iyileştirilebileceği açıktır. Bunun yanında kültür medyumlarına katılacak antioksidanların, kültür ve matürasyon ortamlarında bulunan diğer başka katkı maddeleriyle (hormonlar, aminoasitler, büyüme faktörleri, serumlu/serumsuz ortam vb) etkileşimlerinin araştırılmasına da gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, Ramos AA, Vale Filho VR: Factors influencing in vitro embryo production. *Anim Reprod*, 3, 19-28, 2006.
2. Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, Vale Filho VR: Developmental competence of oocytes from prepubertal (*Bos indicus crossbred*) cattle. *Anim Reprod Sci*, 85, 53-59, 2005.
3. Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, Ramos AA, Freitas C, Vale Filho VR: Developmental competence of oocytes obtained from *Bos taurus* and *Bos indicus* dairy cows raised in tropical climate. *Reprod Fertil Dev*, 18, 243-244, 2006.
4. Gordon I: Laboratory Production of Cattle Embryos. Cambridge University Press, London, 1994.
5. Kruip TAM, Bevers MM, Kemp B: Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology*, 53, 611-618, 2000.
6. Lechniak D, Kaczmarek D, Stanislawski D, Adamowicz T: The ploidy of *in vitro* matured bovine oocytes is related to the diameter. *Theriogenology*, 57, 1303-1308, 2002.
7. Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC: Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 65, 137-152, 2006.
8. Guérin P, Mouatassim SE, Ménézo Y: Oxidative stress and

protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7, 175-189, 2001.

9. Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL: Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod*, 62, 1866-1874, 2000.

10. Johnson MH, Nasr-Esfahani MH: Radical solutions and cultural problems: Could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioassays*, 16, 31-38, 1994.

11. Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L: Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology*, 54, 1537-1542, 2000.

12. Halliwell B, Gutteridge JMC: Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford, 1989.

13. Kehrer JP, Lund LG: Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Rad Biol Med*, 17, 65-75, 1994.

14. Del Corso A, Cappiello M, Mura U: Thiol-dependent oxidation of enzymes: The last chance against oxidative stress. *Inter J Biochem*, 26, 745-750, 1994.

15. Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T: Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, 31, 28-33, 1992.

16. De Matos DG, Furnus CC, Moses DF: Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells. *Biol Reprod*, 57, 1420-1425, 1997.

17. Gardiner CS, Reed DJ: Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod*, 51, 1307-1314, 1994.

18. Lafleur MVM, Hoorweg JJ, Joenje H, Westmijze EJ, Retel J: The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Rad Res*, 21, 9-17, 1994.

19. De Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG: Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*, 57, 1443-1451, 2002.

20. Franzoni F, Colognato R, Galetta F, Laurenza I, Barsotti M, Di Stefano R, Bocchetti R, Regoli F, Carpi A, Balbarini A, Migliore L, Santoro G: An *in vitro* study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: Comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomedical Pharma*, 60, 453-457, 2006.

21. Yoshida M: Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 5, 639-658, 1993.

22. Izquierdo D, Villamediana P, Paramio MT: Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*, 52, 847-861, 1999.

23. Wan PC, Hao ZD, Zhou P, Wu Y, Yang L, Cui MS, Liu SR, Zeng SM: Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. *Anim Reprod Sci*, (in press), 2008.

24. Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M: Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology*, 50, 365-375, 1998.

25. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T: Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, 62, 1186-1197, 2004.

26. Yang BK, Yang X, Foote RH: Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in*

vitro fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 40, 521-523, 1993.

27. Sung LY, Du F, Xu J, Chang W, Nedambale TL, Zhang J, Jiang S, Tian XC, Yang X: The differential requirement of albumin and sodium citrate on the development of *in vitro* produced bovine embryos. *Reprod Nut Dev*, 44, 551-564, 2004.

28. De Matos DG, Herrera C, Cortvrint R, Smitz J, Van Soom A, Nogueira D, Pasqualini R: 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, 2002.

29. Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, Zicarelli L: 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, 2006.

30. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN: Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 50, 747-756, 1998.

31. Hamano S, Kuwayama M, Takahashi M, Okamura N, Okano A, Nagai T: Effect of β -mercaptoethanol on the preimplantation development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *J Reprod Dev*, 40, 355-359, 1994.

32. Rodriguez GE, Bejar ML, Mertens MJ, Paramio T: Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol Reprod Dev*, 65, 446-453, 2003.

33. De Matos DG, Furnus CC: The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, 53, 761-771, 2000.

34. Roushandeh AM, Pasbakhsh P, Alizadeh Z, Roudkenar MH: *In vitro* maturation media, cysteamine concentration and glutathione level affect blastocysts development in Mouse. *Iranian J Reprod Med*, 5, 159-263, 2007.

35. Deshpande VS, Kehrer JP: Oxidative stress-driven mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced apoptosis in FL5.12 cells. *Toxicol Applied Pharmacol*, 214, 230-236, 2006.

36. Seok SH, Baek MW, Lee HY, Kim DJ, Na YR, Noh KJ, Park SH, Lee HK, Lee BH, Ryu DY, Park JH: Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicol In Vitro*, 21, 870-877, 2007.

37. Watanabe H, Fukui Y: Effects of dithiothreitol and boar on pronuclear formation and embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Theriogenology*, 65, 528-359, 2006.

38. Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A: Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod*, 49, 228-232, 1993.

39. Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG: Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: Relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod*, 49, 89-94, 1993.

40. Luvoni GC, Keskinetepe L, Brackett BG: Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Mol Reprod Dev*, 43, 437-443, 1996.

41. Nasr-Esfahani MH, Johnson MH: How does transferrin overcome the *in vitro* block to development of the mouse preimplantation embryo? *J Reprod Fertil*, 96, 41-48, 1992.