

تأثیر گلوتاتیون بر از سرگیری میوز، بلوغ و تکوین آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش

*****(Ph.D.) سید علی حائری روحانی (M.D.) *** محمد حسین ناصر اصفهانی *(Ph.D.) حسین ایمانی
******(MS.c.) سعید کاظمی آشتیانی (Ph.D.) عبدالحسین شاهوری (M.S.) مجتبی رضازاده *** اعظم دالمن (Ph.D.) *****(Ph.D.)

چکیده

سابقه و هدف: هدف از این مطالعه، بررسی مطالعه تاثیر گلوتاتیون بر از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش و تکوین جنین‌های حاصل از آن است.

مواد و روش‌ها: تخمک‌های نارس از تخدمان موش‌های سوری نژاد NMRI (۶-۴ هفت‌های) در شرایط استریل جدا شدند، و در ۳ گروه آزمایشی و یک گروه شاهد دسته‌بندی شدند. تخمک‌های گروه شاهد در محیط MEM-α حاوی mM FCS (minimum essential medium eagle) در درصد، گروه اول (Alpha) در درصد، گروه دوم در محیط MEM-α حاوی ۵ FCS ۱ گلوتاتیون، گروه سوم در محیط MEM-α حاوی ۵ درصد، ۷/۵ IUhCG/ml درصد، ۱۰۰ mIUrFSH ۷/۵ IUhCG/ml درصد، ۱۰۰ mIUrFSH ۷/۵ IUhCG/ml درصد، ۱ mM و ۱ گلوتاتیون قرار داده شدند. تخمک‌های نارس جهت بلوغ به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷°C با CO₂ پنج درصد قرار گرفتند. لقاح و تکوین در محیط T₆ انجام شد.

یافته‌ها: میزان از سرگیری میوز در گروه‌های آزمایشی یک (P=0.0001) و سه (P=0.0001) از نظر آماری نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد که در گروه شاهد، اول، دوم و سوم به ترتیب ۷۴/۲۰، ۸۶/۲۰، ۹۲/۸۸ و ۸۴/۴۹ درصد بوده است. همچنین میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه‌های آزمایشی یک (P=0.0001) و سه (P=0.0001) از نظر آماری نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد که در گروه‌های آزمایشی به ترتیب ۷۷/۲۸، ۵۹/۷۷ و ۵۲/۷۴ و ۷۰ درصد بود. در این مطالعه نرخ تشکیل جنین در روز اول در گروه‌های آزمایشی یک (P=0.001) و سه (P=0.007) نسبت به گروه ۲ اختلاف معنی‌داری را نشان داد و میزان از گروه شاهد و گروه ۲ که فاقد این ماده بودند، بیشتر بود.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان داد گلوتاتیون با غلظت ۱ mM از سرگیری میوز، شکسته شدن هسته و آزاد شدن اولین جسمک قطبی، بلوغ آزمایشگاهی، لقاح، شکل‌گیری جنین و تکوین آن تاثیر دارد

واژه‌های کلیدی: بلوغ آزمایشگاهی، تخمک نارس، موش، گلوتاتیون

* تهران: خیابان ولی‌عصر، زعفرانیه، کوی آصف، کوی سیمین، پژوهشکده رویان

* متخصص علوم تشریح و آناتومی، (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی تهران

** متخصص فیزیولوژی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی تهران

** داشتگردی کارشناسی ارشد فیزیولوژی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** متخصص علوم تشریح و آناتومی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی تهران

*****دانشجوی دکترای تخصصی علوم تشریح و آناتومی دانشگاه تهران

تاریخ تصویب: ۸۳/۱۱/۱۴

تاریخ انجام اصلاحات: ۸۳/۹/۱۰

تاریخ دریافت: ۸۳/۷/۱

E

مقدمه

اما در تخمک های لقاح یافته در مرحله پرونوکلئوس مقدار این ماده در مقایسه با تخمک های بالغ، پایین تر است (۱۳ تا ۹%). نقش های متفاوتی برای گلوتاتیون از جمله انتقال آمینواسید، سنتز DNA و پروتئین و احیای دی سولفیدها در نظر گرفته شده است (۱۴). Yamauchi و همکاران (۱۹۹۹) نیز نشان دادند که گلوتاتیون نقش های ذکر شده را در داخل تخمک در حال بلوغ ایفا می کند. همچنین گزارش دادند که کمبود گلوتاتیون در تخمک ها قبل از لقاح باعث می شود که تشکیل گلوتاتیون پرونوکلئوس نر (MPN) ۳ دچار نقصان شود (۱۵) گلوتاتیون همچنین در Decandensation هسته اسperm هم زمان با فعال سازی تخمک، تغییر شکل سراسperm به پرونوکلئوس نزد رهنگام لقاح نقش دارد (۱۶ تا ۱۷). سنتز گلوتاتیون در طی بلوغ تخمک در موش (۱۰)، هامستر (۱۱) و خوک (۱۲) گزارش شده است. بنابراین سطح گلوتاتیون یافت شده در انتهای بلوغ تخمک ها به عنوان یک شاخص بیوشیمیایی خوب برای بقا (Viability) تخمک می باشد (۱۳). در طی تکوین و بلوغ تخمک در تخدمان، همانطوری که تخمک به زمان تخمک گذاری نزدیک می شود، محتوى گلوتاتیون داخل سلولی نیز افزایش پیدا می کند (۱۱) و این تجمع گلوتاتیون ذخیره های را به وجود می آورد که سلول را در مراحل بعدی پس از لقاح حفاظت خواهد کرد (۱۹). در تحقیقی گزارش شده است که تخمک های لقاح یافته متوقف شده در مرحله دو سلولی در آزمایشگاه در مقایسه با تکوین جنین در بدنه این است که محتوى گلوتاتیون تخمک و جنین دهنده این است که محتوى گلوتاتیون تخمک و جنین آزمایشگاهی نسبت به بدنه کمتر است (۱۹). Reed و

از آن جا که آنتی اکسیدان ها رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS)^۱ را به دام می اندازند، اضافه کردن آن ها به محیط کشت مفید است (۱). کشت جنین ها در آزمایشگاه تحت فشار اکسیژن بالا (۰ دارصد) نسبت به کشت جنین ها تحت فشار ۵ دارصد یا ۷ دارصد ممکن است رادیکال های آزاد بیشتری تولید کند (۳، ۲). تعادل بین تولید انواع رادیکال های آزاد اکسیژن و به دام انداختن آن ها، عامل مهمی برای به دست آوردن توانایی لقاح در آزمایشگاه است (۴). به نظر می رسد جنین هایی که در آزمایشگاه کشت داده می شوند در معرض رادیکال های آزاد اکسیژن قرار می گیرند که مکانیسم دفاعی شان برای حفاظت از ساختمان های سلولی طریف کافی نیست. اثرات مضر این رادیکال های آزاد باعث از بین رفتن عملکرد میتوکندری و آسیب به RNA، DNA، پروتئین می شود (۵) و همچنین اتصال اسperm - تخمک را مهار می کند (۶). برای حفاظت تخمک ها و جنین ها از فشار اکسیداتیو در طی کشت، اضافه کردن انواع آنتی اکسیدان ها به محیط کشت توصیه می شود؛ برای مثال اضافه کردن آنتی اکسیدان های آنزیم خارج سلولی از قبیل سوپراکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز یا آنتی اکسیدان های قابل متابولیزه به محیط کشت پیشنهاد شده است (۷، ۱).

گلوتاتیون یک ترکیب سولفیدریل غیرپروتئینی و یک آنتی اکسیدان طبیعی می باشد که در سلول های پستانداران وجود دارد و نقش مهمی را در حفاظت سلول از آسیب های اکسیداتیو بازی می کند. این ماده در هر دو گامت با مقادیر متفاوت وجود دارد (۸، ۱). هم زمان با پیشرفت تخمک ها از حفره زاینده (GV)^۲ به مرحله متافاز II غلظت گلوتاتیون داخل سلولی افزایش می یابد،

1- Reactive Oxygen Species
2- Germinal Vesicle

3- Male pronucleus

مواد و روش ها

تهیه تخمک های نارس: در این تحقیق از موش های سوری نژاد NMRI ۶-۴ هفته ای تهیه شده از انتستیورازی کرج (ایران) استفاده شد. موش های ماده با قطع نخاع، کشته شده و تخدمان آن ها در شرایط استریل خارج و پس از انتقال درون قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، چربی های اضافی اطراف تخدمان حذف و با استفاده از سرنگ های انسولین Dissect (تشريح) شده و تخمک های نارس و حاوی حفره زاینده (GV) همراه با سلولهای گرانولوزا جدا شد. سپس با روش پیپت کردن، سلول های گرانولوزای اطراف آن برداشته شد.

تخمک های نارس هسته دار (Germinal Vesicle) با سیتوپلاسم روش ZP (Zone pollucida) یکنواخت با فضای مناسب یکسان برای ۴ گروه انتخاب شدند.

بلغ تخمک ها:

گروه شاهد: ۳۴۵ تخمک نارس از موش های طبیعی گرفته شده و در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد قرار داده شد. گروه آزمایشی اول: ۳۳۸ تخمک نارس در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد و ۱mM گلوتاتیون GssG، Merck (قرار داده شد. گروه آزمایشی دوم: ۲۳۷ تخمک نارس در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، 100mIUrFSH، ۷/۵IUhCG/ml قرار داده شد. گروه آزمایشی سوم: ۳۲۷ تخمک نارس در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد ۷/۵IUhCG/ml و ۱mM گلوتاتیون قرار داده شد.

تخمک های هر گروه به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با CO_2 ۵ درصد قرار داده شدند و سپس با میکروسکوپ معکوس، مراحل بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز در تمام گروه ها بررسی

(Gardiner ۱۹۹۴) ثابت کردند که بلاستوستیت موش توانایی ساختن گلوتاتیون را دارد اما جنین های اولیه تا مرحله مورولا توانایی محدودی برای ساختن این ماده دارند (۲۰). بلوغ تخمک، مستلزم بلوغ هسته و سیتوپلاسم است. تغییرات مولکولی بی شماری از جمله فسفریلاسيون پروتئین ها و فعال شدن راه های متابولیکی ویژه در بلوغ سیتوپلاسمی دخالت دارند. یکی از این راه های متابولیکی، سنتز گلوتاتیون در داخل تخمک می باشد که این ماده بلوغ سیتوپلاسمی را افزایش داده و از این طریق تکوین جنین را بهبود می بخشد (۲۱، ۲۲). در تخمک گاو میزان گلوتاتیون بعد از (In Vitro IVM Maturation) نشانگری برای بلوغ سیتوپلاسمی شناخته شده است (۲۳، ۲۴). ترکیبات تیولی با وزن مولکولی کم از جمله سیستامین و بتا مرکاپتواتانول سنتز گلوتاتیون داخل سلولی را افزایش می دهند و از این طریق سرعت تکوین جنین را بهبود می دهند (۲۴). اضافه کردن سیستامین در طی IVM به تخمک های خوک (۲۵)، گوسفند (۸) و گاو میش (۲۶) به واسطه ساختن گلوتاتیون و در نتیجه افزایش بلوغ سیتوپلاسمی، سرعت تکوین جنین حاصله را بهبود می بخشد و همچنین اثرات مشابهی را با افزودن بتا مرکاپتواتانول در طی IVM بر سنتز گلوتاتیون و تکوین جنین در تخمک های گوسفند (۸) گاو (۲۰) و خوک (۲۷) مشاهده کرده اند. با توجه به مطالب بالا و آنتی اکسیدان بودن، گلوتاتیون، علاوه بر افزایش بلوغ سیتوپلاسمی تخمک های نارس میزان ROS را نیز کاهش داده و تخمک نارس را از آسیب های اکسیداتیو محافظت می کند. لذا هدف از این مطالعه بررسی تاثیر گلوتاتیون به عنوان یک آنتی اکسیدان بر از سرگیری میوز، بلوغ و تکوین آزمایشگاهی جنین های حاصل از این تخمک های نارس موش می باشد.

معنی داری را نشان داد و از این میزان ۱۴/۴۹ درصد هسته آنها شکسته شد و ۵۹/۷۱ درصد تخمک ها تا مرحله MII پیشرفت و بالغ شدند. میزان بلوغ از نظر آماری نسبت به گروه های آزمایشی یک (P=0.0001) و سه (P=0.0001) اختلاف معنی داری را نشان داد. ۱۴۴ عدد تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسperm های موش نر مجاور (Inseminate) گردید. جدول یک نشانگر میزان لقاح و وضعیت تکامل تخمک های بارور شده است. نرخ تشکیل جنین در روزاول در گروه های آزمایشی یک و سه نسبت به گروه شاهد افزایش داشت ولی از نظر آماری اختلاف معنی داری را نشان نداد. در گروه اول (از ۳۳۸ تخمک نارس سالم) پس از ۲۶ ساعت در ۷/۹۸ درصد تخمک های نشانی از عالیم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۸۸/۹۲ درصد تخمک های نارس مشاهده شد که از نظر آماری با گروه شاهد (P=0.0001) اختلاف معنی داری را نشان داد و از این میزان ۱۳/۶۰ درصد هسته شکسته و ۷۹/۲۸ درصد تخمک های تا مرحله MII پیشرفت و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه شاهد (P=0.0001) تفاوت معنی داری داشت. ۱۰۰ تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسperm های موش نر مجاور (Inseminate) شد (جدول یک). نرخ تشکیل جنین در روز اول نسبت به گروه ۲

(P=0.001) اختلاف معنی داری را نشان داد

در گروه دوم آزمایشی: (از ۲۳۷ تخمک نارس سالم) پس از ۲۶ ساعت در ۵۷/۲۳ درصد آنها نشانی از عالیم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۲۶/۷۴ درصد تخمک های نارس مشاهده شد که از این میزان، هسته ۵۱/۲۱ درصد آنها شکسته شد و ۷۴/۵۲ درصد آنها تا مرحله MIII پیشرفت و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه شاهد، اختلاف معنی داری را نشان نداد. ۷۰ عدد تخمک بالغ شده با اسperm نر مجاور شد (جدول شماره ۱).

شد. تخمک های با هسته شکسته شده به عنوان با نشانه شروع تقسیم میوز و تخمک های دارای جسمک قطبی (Metaphase II) (MII) به عنوان تخمک های بالغ یا MII (Metaphase II) شناسایی گردید.

لقادسیه و تکوین تخمک های بالغ شده: ابتدا موش های سوری نر نژاد NMRI به روش قطع نخاعی کشته، دم اپیدیدیم آنها جدا و به قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت T₆ حاوی ۴ میلی گرم Bovin SerumAlbumin(BSA) در هر میلی لیتر منتقل شده، سپس نمونه ها به مدت ۱/۵ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی CO₂ ۵ درصد انکوباتور انتقال اسperm های فعال، سالم از کنار قطره (در هر میلی لیتر ۱×۱۰^۵ عدد اسperm) به داخل قطرات محیط T₆ حاوی ۱۵ میلی گرم BSA بر میلی لیتر، تخمک های بالغ شده نیز به آنها منتقل شد. تخمک های پس از ۶-۴ ساعت از محیط فعلی به قطره های محیط T₆ حاوی ۴ میلی گرم BAS بر میلی لیتر منتقل شدند. وضعیت تخمک های پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت به وسیله میکروسکوپ معکوس برای ثبت مراحل تکوین جنینی Chi-square بررسی شد و نتایج حاصل با آزمون آماری square بررسی شد.

یافته ها

در این مطالعه ۱۲۴۷ تخمک نارس و سالم از تخدمان موش های سوری جدا شد و به طور تصادفی در ۳ گروه آزمایشی و یک گروه شاهد تقسیم بندی شد. همان طور که در جدول یک آمده است در گروه شاهد ۳۴۵ تخمک جدا شد که پس از ۲۶ ساعت در ۷۹/۲۵ درصد آنها نشانی از عالیم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۲۰/۷۴ درصد تخمک های نارس مشاهده شد که از نظر آماری نسبت به گروه های آزمایشی یک (P=0.0001) و سه (P=0.0001) اختلاف

آنٹی اکسیدان کارآمد می توانند فشار اکسیداتیو را توسط به دام انداختن ROS تضعیف کنند (۴۱).

گلوتاتیون یک ترکیب سولفیدریل غیرپروتئینی مهم در سلول‌های پستانداران است و نقش مهمی را در حفاظت سلول از آسیب اکسیداتیو دارد. ساخته شدن گلوتاتیون در طی بلوغ تخمک موش (۱۰)، خوک (۱۸) و گاو (۲۴، ۱۲) گزارش شده است. این ترکیب دارای ۲ فرم اصلی می‌باشد ۱-GSH (فرم سولفیدریل)-GSSG (فرم دی سولفید) GSH به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کند؛ به این ترتیب که ۲GSH توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز به GSSG تبدیل می‌شود، این ماده با اکسید خود، O_2^- را که ماده‌ای خطرناک و سمی برای سلول است به آب تبدیل می‌کند، در نتیجه از این طریق، غلظت ROS کاهش می‌یابد (۴۲).

گلوتاتیون به واسطه سیکل ۷ گلوتامیل ساخته می‌شود (۴۴، ۴۳) و ساخته شدنش وابسته به در دسترس بودن سیستئین در محیط کشت است. مشخص شد که بتامر کاپتواتانول و سیستامین، سیستین را به سیستئین احیاء می‌کنند و منجر به افزایش سیستئین می‌شوند که این ماده پیش‌ساز گلوتاتیون است و باعث افزایش تشکیل گلوتاتیون می‌شود (۴۵ تا ۴۷). همچنین اضافه کردن سیستامین، بتامر کاپتواتانول و سیستین به محیط کشت بلوغ تخمک گاو و خوک محتوى گلوتاتیون داخل سلولی را بعد از بلوغ افزایش می‌دهند و تکوین و کیفیت جین را بهبود می‌دهند (۱۹). لذا می‌توان مدعی شد که محتوى گلوتاتیون داخل سلولی یک علامت برای توانایی بلوغ سیتوپلاسمی است. مشخص شده که ROS در طی کشت آزمایشگاهی در متوقف کردن جنین‌های موش در مرحله ۲ سلولی نقش دارند، در حالی که طبق مطالعات انجام شده گلوتاتیون سلول را از آسیب‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند. اضافه کردن بتامر کاپتواتانول به محیط کشت بلوغ تخمک گوسفند، ساخته شدن گلوتاتیون را تحریک می‌کند و تکوین

غیرمستقیم نشان دهنده بلوغ سیتوپلاسمی تخمک است (۲۲).

Wang و همکاران (۱۹۹۲) گزارش دادند تکوین

جنین‌های گاو به بلاستوسیت در اکسیژن ۵ درصد بیش تر از اکسیژن ۱۰ درصد است (۳۴). بنابراین به نظر می‌رسد که غلظت بالای اکسیژن از رسیدن جنین‌های گاو به مرحله بلاستوسیت جلوگیری می‌کند. غلظت بالای اکسیژن در طی کشت آزمایشگاهی بدلیل افزایش انواع اکسیژن فعال (ROS) در سیتوپلاسم جنین‌های در حال تکوین، توانایی تکوین را کاهش می‌دهد (۳۶، ۳۵). این ترکیبات شامل پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)، آنیون‌های سوپراکسید (O_2^-) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH[•]) هستند که برای غشاها سلولی (۳۷) و DNA (۶) زیان‌آور هستند و باعث آپوتوزیس می‌شوند (۳۸). OH[•] آزاد می‌کند که با دیگر مولکول‌ها در سیتوپلاسم، بسیار واکنش می‌دهد و باعث آسیب سلولی می‌شود و عملکرد H_2O_2 در تنظیم بیان ژن و غلظتش به وسیله اکسیدازهای مرتبط تنظیم می‌شود (۳۹). فعالیت اکسیدازی وابسته به غلظت O₂ محیطی دارد و غلظت مناسب اکسیژن برای فعالیت این اکسیدازها در محیط کشت بیش تر از آن‌هایی است که در بدن قرار دارند (۴۰). مقدار H_2O_2 در جنین‌های کشت شده تحت فشار اکسیژن ۲۰ درصد بالاست که اکسیدازها تحت این شرایط به مقدار بالاتری تولید می‌شوند.

تغییرات اکسیداتیو ترکیبات داخل سلولی توسط انواع اکسیژن‌های واکنش دهنده (ROS) یکی از مهم‌ترین فرآیندهای خطرناک و مضر برای عملکرد مناسب سلولی است. در بسیاری سلول‌ها، سیستم‌های

سپاسگزاری

کلیه هزینه‌های بررسی حاضر، توسط معاونت پژوهشی پژوهشکده رویان تامین گردیده است. از کلیه همکاران شاغل در بخش‌های مختلف تحقیقاتی و بالینی رویان به خصوص سرکار خانم طائی و جناب آقایان صبور و فاخری که در تمام مراحل انجام طرح صمیمانه همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

جنین را بهبود می‌دهد(۴۹). احتمالاً گلوتاتیون عامل کلیدی مهمی در کاهش پراکسیدهای داخل سلولی است. در این مطالعه نیز مشخص شد که اضافه کردن گلوتاتیون به عنوان یک آنتی اکسیدان به محیط کشت بلوغ تنخ. مک‌های نارس موش، بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز را افزایش می‌دهد و تعداد جنین‌ها را در روز اول نسبت به گروه شاهد افزایش می‌دهد.

فهرست منابع

1. A.A. Ali, J. F. Bilodeau, M.A. sirard. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*. (2003); 59: 939-949.
2. Liu Z, Foote RH. Development of bovin embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod.* (1995); 53: 786-90.
3. Nasr Esfahani MH, Aitken JR, Jahnon MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stages embryos developed in vitro or in vivo. *Development*. (1990); 109: 501-7.
4. De Lamirande, E Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod.* (1997); 2: 48-54.
5. Comporti M. Three models of free radical induced cell injury. *Chern Biol Interact.* (1986); 72: 472-7.
6. Aitken RJ. Harkiss D. Buckingham D. Relationship between iron catalysed lipid peroxidation potential an human sperm function *J Repord Fertil.* (1993); 98: 257-65.
7. Meister A. selective modification of glutathione metabolism. *Sience*. (1983); 220: 472-7.
8. Daniel G. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*. (2002); 57: 1443-1457.
9. Kitakawa 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 embryos *Theriogenology*. (2004); 1-12.
10. Calvin HI, Grossham K, Blake EJ. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepubertal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res.* (1986); 14: 265-75.
11. Perreault SD, Salott VI. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol.* (1988); 125: 181-6.
12. Miyamura M, Yoshida M, Hamano S. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology*. (1995); 43: 282 [Abstract].
13. Funahashi H, Stumpf TT, Cantely TC, Kin NH, Day BN. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of in vitro matured porcine oocytes following in vitro fertilization and/or electrical activation. *Zygote*. (1995); 3: 273-81.
14. Lafeur Mum, Hoorweg JJ, Retel J. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Rad Res.* (1994); 21:9-17.
15. Yamauchi N, Nagai T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod.* (1999); 61:828-33.
16. Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR. The role of sulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev Biol.* (1984); 1: 160-71.
17. Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev.* (1992); 31: 68-71.
18. Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod.* (1993); 49: 89-94.
19. De Mutos 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. *Threnology* 2000; (53): 761- 771.
20. Gardiner CS, Reed JD. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.* (1994); 51: 13-13.
21. Eppig J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in

- eutherian mammals. *Reprod Fertile Dev.* (1996); 8: 985-89.
22. Krishev RL, Bavister. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*. (1998); 49: 103-114.
23. De matos, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprode.* (1997); 57: 1420-1425.
24. De matos DG. Furnus CC, Moses DF, Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol Reprod Dev.* (1995); 42: 430-432.
25. Y.Z Bing T. Nagai and H. Rodrigue Z. Martinez. Effect of cysteamine, FSH and estradiol 1713 on in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology*. (2001); 55: 878-887.
26. B.G. Parrini. G. Neglia R. Di Palo. Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology*. (2000); 54. 1537-1542.
27. Newton H. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients, *Human Reprod.* (1998); 9: 237-147.
28. Escriba MJ, Garcia Ximenez Fe: use of a variable electrical pulsing sequence in rabbit oocyte activation. *Reprod.* (2000); 40: 261-269.
29. Edwadr RG. Mammalian Eggs in the laboratory. *Sci Am.*(1966); 215: 72-81.
30. Pincus G, Enzmann E. The Comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro part 1. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med.* (1935); 62: 665-75.
31. Crozet N, Huneau D, De smedt V, Torres S. In vitro fertilization with normal development in sheep Gamete Res. (1987); 16: 159-70.
32. Lu KH, Gordon I, Chen HB, Mc Govern H. In vitro culture of early bovine embryos derived from in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. In proceedings of the third scientific meeting of the european embryo. *Transfer Association, Lyon.* (1987); 70 [Abstract].
33. Abeydeera LR, Wang WH, Cantly TC, Day BN. Presence of B-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology*. (1998); 50: 747-56.
34. Wang WL, Jiang HS, LU KH, Polge C. The effect of gas phase on the in vitro development of bovine embryos drived from in vitro maturation and fertilization of ovarian oocytes.



- Theriogenology.** (1992); 37: 320 [abstract].
35. Goto Y, Noda Y. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. **Free Biol Med.** (1993); 15: 69-75.
36. Kwon HC, Yang HW. Hwang KJ. Effect of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro. **J obstet Gynaecal Res.** (1999); 25: 359-66.
37. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biol reprod.** (1989); 141: 183-97
38. Yang WH, Hwang KJ, Detection of reactive oxygen species (Ros) and apoptosis in **human fragmented** embryos. **Hum reprod.** (1998); 13: 998-1002.
39. Guerin P, EL, Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. **Hum reprod update.** (2001); 7: 175-89.
40. Halliwell B. Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. **FEBS Lett.** (1978); 92: 321-6.
41. Del corso A, Cappiello M, Mura U. thiol dependent oxidation of enzymes: the lost chunce against oxidative stress. **Int J Biochem.** (1994); 26: 745-50.
42. Uday B, Dipak D, Ranajit k. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. **Current Science.** (1999); 77:658-666
43. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroxyperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev.** (1979); 59: 527-605.
44. Meister A, Tate SS. Glutathione and related r- glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Ann Rev Biochem.** (1976); 45: 559-604.
45. Farnus CC, de Matos DG. The availability of cysteine in culture medium appears to be the limiting factor for glutathione synthesis in mammalian oocytes. **Theriogenology.** (1999); 51 (suppl): 373 [Abstract].
46. Ishii T, Bannai S, Sugita Y. Mechanism of growth stimulation of L 1270 cells by 2-mercaptoethanol in vitro. **J Biol chem.** (1981); 256(23): 12387-92.
47. Issels RD, Nagele A, Eckert KG, Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis by cyteamine and N-acetyl-cysteine. **Biochem pharmacol.** (1988); 37(5): 881-8.
48. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell

block. *Mol Reprod dev.* (1991); 28: 355-36048-.