



## RESEARCH ARTICLE

### L-ergotiyonin ve fetuinin blastosist gelişim oranlarına etkisi

Sakine Ülküm Çizmeci<sup>1\*</sup>, Dursun Ali Dinç<sup>1</sup>, Mustafa Numan Bucak<sup>2</sup>, Ömer Faruk Yeşilkaya<sup>1</sup>  
Muhammed Furkan Çiftçi<sup>1</sup>, Vahit Ağır<sup>2</sup>, Maide Gölbaşı<sup>1</sup>, Ayşe Sarı<sup>2</sup>, Hasan Ali Çay<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

<sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

Geliş: 31.08.2021, Kabul: 22.12.2021

\*ulkum@selcuk.edu.tr

### The effect of l-ergothioneine and fetuin on blastocyst development rates

Eurasian J Vet Sci, 2022, 38, 1, 17-23

DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2022.360

#### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada kültür vasatına ilave edilen L-Ergotiyonin ve Fetuin'in blastosist gelişimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmanın materyalini mezbahadan alınan ovaryumlardan toplanan oositler oluşturmuştur. Maturasyon (IVM) medyumunda 22 saat inkübe edilen oositler fertilizasyon (IVF) medyumunda sperma ile 20-22 saat inkübe edilmiştir. Fertilizasyon aşamasından sonra antioksidan (Grup 1: L-Ergotiyonin (L-Erg) 0.05 mM (n:100), Grup 2: Fetuin 1 mg/ml (n:100), Grup 3: kontrol (n:120) ilave edilen kültür (IVC) droplarına aktarılan zigotlar kültüre edilmiştir. Blastosist gelişimi 6. ve 7. günde kontrol edilmiştir. İn vitro embriyo üretim aşamalarında oluşan farklılıklar Ki-kare testi ile değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** İn vitro maturasyona alınan toplam 320 oositin 299'unun (%93,44) mature olduğu belirlenmiştir. Grup I, II ve III'ün maturasyon oranları sırasıyla %94, %92 ve %94,17 olarak tespit edilmiştir. Grupların cleavage oranlarının sırasıyla %92,55, %94,57 ve %92,04 olduğu belirlenmiştir. Kültür aşamasına alınan 299 zigottan 65 (%21,74) adet blastosist elde edilmiş ve gruplardaki blastosist oranlarının sırasıyla %45,74, %11,96 ve %18,58 olduğu görülmüştür. Yapılan çalışma sonrasında blastosist oranlarında L-Erg ve diğer iki grup arasında istatistiksel farkın önemli olduğu belirlenmiştir (p<0.05).

**Öneri:** Sonuç olarak L-Erg'in blastosist gelişim oranlarını iyileştirdiği görülmüştür. L-Erg'in farklı dozlarda kullanımının araştırılarak antioksidan etkinliğinin en yüksek olduğu dozunun in vitro embriyo üretiminde kullanılabileceği ve daha fazla sayıda blastosist üretilebileceği düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Blastosist, fetuin, l-ergotiyonin

#### Abstract

**Aim:** This study, it was aimed to determine the effect of L-ergothioneine and Fetuin added to the culture medium on blastocyst development.

**Materials and Methods:** The material of the study consisted of oocytes collected from the ovaries taken from the abattoir. Oocytes, which were incubated for 22 hours in maturation (IVM) medium, were kept in the incubator for 20-22 hours with semen in fertilization (IVF) medium. After the fertilization step, zygotes were transferred in to culture (IVC) drops with antioxidant (Grup 1: L-ergothioneine (L-Erg) 0.05 mM (n:100), Grup 2: fetuin 1 mg/ml (n:100), Grup 3: control (n:120)). The 6th and 7th-day blastocysts development were checked. Differences in in vitro embryo production stages were evaluated with the Chi-square test.

**Results:** It was determined that 299 (93.44%) of 320 oocytes were mature. It was determined that the maturation rates of the groups were 94%, 92%, and 94.17%, respectively. It was determined that the cleavage rates were 92.55%, 94.57%, and 92.04%. It was observed that 65 (21.74%) blastocysts were obtained from 299 zygotes taken into the culture stage, and the blastocyst rates in the groups were 45.74%, 11.96%, and 18.58%, respectively. It was determined that the statistical difference between L-ergothioneine and the other two groups in blastocyst rates was significant (p<0.05).

**Conclusion:** As a result, L-Erg was seen to improve blastocyst development rates. By investigating the use of L-Erg in different doses, it was thought that the dose can be used with the highest antioxidant activity in vitro embryo production and more blastocysts could be produced.

**Keywords:** Blastocyst, fetuin, l-ergothioneine



## Giriş

İn vitro embriyo üretim (IVEP) sisteminde oositler ve embriyoların gelişimi ve yaşayabilirliği için iki önemli sınırlayıcı faktör vardır. Bunlardan ilki bazı evcil türlerde ortaya çıkan yüksek lipit içeriğine bağlı olarak lipit damlacıklarının (LD) birikimidir. İkinci sınırlayıcı faktör ise yağ asitleri,  $\beta$ -oksidasyon ve kültür koşullarına yanıt olarak üretilen reaktif oksijen türleridir (ROS) (Kang ve ark 2012, Mishra ve ark 2018, Braga ve ark 2019). ROS; hücrede fizyolojik olarak ortaya çıkan, endojen veya eksojen kaynaklı faktörlere bağlı olarak oluşan, yüksek derecede reaktif ve stabil olmayan moleküllerdir (Seifried ve ark 2007). ROS, proton ve elektron transfer reaksiyonlarına rağmen mitokondrideki oksijenin azaltılmasıyla ATP' nin sentezlendiği bir süreç olan hücrel oksidatif metabolizmanın ürünleridir (Elamran ve ark 2012, Braga ve ark 2019). En önemli serbest radikaller oksijen kaynaklı reaktif oksijen türevleridir (Seifried ve ark 2007). Bunlardan başlıcaları süperoksit radikali (O<sub>2</sub>-), hidrojen peroksit radikali (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve hidroksil (OH-) radikalidir (Agarwal ve ark 2005, Fujii ve ark 2005).

Sığırlarda in vitro embriyo gelişimini etkileyen en büyük problemlerin başında oksidatif stres (OS) gelmektedir. Embriyonun membran yapısının, büyük oranda doymamış yağ asitlerinden oluşması ve kültür ortamında lipit peroksidasyonuna uğraması yapılarının bozulmasına yol açmaktadır (Gasparini ve ark 2014). Şekillenen OS lipit peroksidasyonu, DNA çift sarmalının kırılması ve mitokondriyal DNA mutasyonu gibi sebeplerle embriyo ve oositlerin yaşayabilirliğini azaltmakta ve IVEP' de optimal sonuçların alınmamasına neden olmaktadır (Aruoma ve ark 2006, Wrenzycki ve ark 2007; Mishra ve ark 2010b, Agarwal ve ark 2012).

Diğer canlı aerobik hücreler gibi, embriyolar ve oositlerin de mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretmek için oksijen kullanımları ROS' un başlıca kaynaklarıdır (Agarwal ve ark 2012). Bu nedenle, daha iyi in vitro embriyo gelişimi ve erken dönemdeki embriyoların apoptozunu önlemek için ortamdaki OS durumunu düzenlemek gereklidir (Sirard ve Coenen 2006, Abdelrazik ve ark 2009, Mishra ve ark 2010a, 2016, Mukherjee ve ark 2014).

L-Erg tiohistidin betain amino asididir. Uzun süre önce çavdar ergotunda keşfedilmiş doğal bir antioksidandır (Halliwell ve ark 2016, Paul ve Synder 2010, Zhu ve ark 2011). L-Erg, çeşitli ROS türlerine karşı antioksidan ve hücrel koruyucu olarak görev yapmaktadır (Kerley ve ark 2017). Ayrıca L-Erg' in mitokondriyi hedefleyebileceği ve dolayısıyla oksidatif strese yanıt olarak mitokondriye özgü ROS' u (mROS) azaltabileceği de bildirilmektedir (Lamhonwah ve Tein 2006).

L-Erg, esas olarak mantarlarda bulunan, diyetle suda çözünür, doğal olarak oluşan bir amino asittir. L-Erg, güçlü bir OH temizleyicisidir ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' den demir veya bakır iyonuna bağlı

OH oluşumunun bir inhibitörüdür (Akanmu ve ark 1991). L-Erg bazı bakteri ve mantarlar tarafından sentezlenir ancak hayvanlar tarafından sentezlenmez (Hartman 1990). L-Erg hidroksil radikalleri, hipokloröz asit ve peroksil radikallerini temizlediği (Asmus ve ark 1996, Aruoma ve ark 1997, Obayashi ve ark 2005), proteinlerin ve DNA'nın peroksintrite bağımlı nitrasyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir (Aruoma ve ark 1999). L-Erg' in antioksidan aktivitesinin oldukça yüksek olduğu ve glutatyon (GSH), ürik asit ile troloks gibi bazı klasik iyi bilinen antioksidanlara kıyasla en aktif serbest radikalleri ortadan kaldırdığı ifade edilmektedir (Franzoni ve ark 2006).

Mikroheterojen bir protein olan Fetuin, fetal buzağı serumunda proteaz inhibitörü olarak ortaya çıkmaktadır (Dell'Aquila ve ark 1999). Fetuin' in IVF sonuçları üzerindeki olası etkisi net olarak bilinmemektedir (Mori ve ark 2011). Ancak kısır oositlerinin in vitro olgunlaşması sırasında zona pellusida (ZP) sertleşmesine neden olduğu rapor edilmektedir (Dell'Aquila ve ark 1999). Fetuin; obezite, diabetes mellitus tip 2, metabolik sendrom, yağlı karaciğer sendromu ve ateroskleroz gibi çeşitli metabolik ve vasküler hastalıklarda kritik rol oynayan, çok işlevli bir proteindir (Mori ve ark 2011, Rasul ve ark 2012). Tüm bu problemlerin fertilizasyon potansiyeli üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu bilinmektedir (Ix ve ark 2006, Srinivas ve ark 2009). Ayrıca, Fetuin' in hücre büyümesini, farklılaşmasını, göçünü ve hücrel canlılığı düzenlediği ve bu sayede embriyonik ve erken fetal gelişime katkıda bulunduğu da bildirilmektedir (Saunders ve ark 1994).

Bazı antioksidan maddelerin İn vitro embriyo üretimi sırasında kültür medyumlarına ilave edilmesinin oksidatif stresi azaltıp blastosist gelişim oranlarını arttırdığı bildirilmektedir. Sunulan çalışmada da kültür vasatına antioksidan olarak ilave edilen L-Erg ve Fetuin' in blastosist gelişimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada IVF Bioscience (UK) Bovine IVF (BO-Wash, BO-IVM, BO- IVF, Semenprep, BO-IVC, BO-Oil) medyumları ve L-ergotiyonin (Sigma-Aldrich, E7521, Germany) ile fetuin (Sigma-Aldrich, F3385, Germany) kullanılmıştır. Çalışmada her grup için en az 20'şer oositte 5 replikasyon yapılmıştır. Replikasyonlar üç grubun dropları aynı petride olacak şekilde yürütülmüştür.

Çalışmanın materyalini mezhabadan alınan ovaryumlardan toplanan oositler oluşturmuştur. Lokal mezhabalardan sağlanan Holstein inek ırkına ait ovaryumlar fizyolojik tuzlu su (%0,9), % 5 fetal calf serum ve antibiyotik içeren taşıma sıvısı içerisinde, 30-35°C'lik sabit ısı sağlayan termosta 2-3 saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir (Camargo ve ark 2005, Zullo ve ark 2016). Ovaryumlarda bulunan 3-8 mm çapında-

ki foliküller 20-G iğne kullanılarak enjektör ile manuel olarak aspire edilmiştir. Alınan folikül sıvılarından kümülüs oosit kompleksleri (COC) stereo mikroskop altında toplanmış ve kümülüs oosit kompleksinin yapısına göre sınıflandırılmıştır (A, B, C ve D kalite COC). Toplanan COC'ler değerlendirilirken aşağıdaki kriterler kullanılmıştır;

**A Kalite:** ≥ 5 kompakt hücre katmanına ve homojen sitoplazmaya sahiptir,

**B Kalite:** 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:** 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:** Kümülüs katmanı tamamen kaybolmuş, küçük, granüler, homojen olmayan sitoplazmaya sahiptir (Petyim ve ark 2001). A ve B kalite oositler in vitro embriyo üretim sürecine dahil edilmiştir. Oositler BO WASH (HEPESLİ) solüsyonunda yıkandıktan sonra petri kutularında en az 4 saat ekilibre edilmiş, mineral yağ ile kaplanmış 100 µl HEPES içermeyen BO-IVM (In vitro maturasyon) medyumuna 10 oosit konularak mono gaz inkübatörde (Hera Cell, %5,5 CO<sub>2</sub>, 38,8 °C, nemlendirilmiş hava) 22 saat mature edilmiştir. Maturasyon kontrolleri kümülüs hücrelerinin ekspansiyonu ve polar body varlığına göre yapılmıştır. Bu parametrelerden birinin varlığı maturasyon olarak kabul edilmiştir. Semenprep solüsyonu ile 1200 rpm'de 5 dakika iki kez santrifüj edildikten sonra (IVF Bioscience), ekilibre edilmiş BO-IVF (In vitro fertilizasyon) vasatı ile oosit başına 10.000 (100.000 spermatozoa/30 µl) spermatozoa olacak şekilde sulandırılan sperma bir gece önceden ekilibre edilen 70 µl IVF droplarına ilave edilmiştir. Matür oositler IVF droplarına alınarak 20-22 saat inkübatörde bekletilmiştir. Kümülüs temizleme işlemleri vortexleme sonrası kayıplar yaşanabileceği düşüncesi ile pipetleme ile gerçekleştirilmiştir. Fertilizasyon kontrolü kümülüs hücreleri temizlendikten sonra ikinci polar body, spermin girdiği bölgede oositin sitoplazması ile ZP arasında fertilizasyon boşluğunun görülmesi ya da ZP'ya bağlı spermlerin varlığı görülerek yapılmıştır (Gürer 2003). Fertilizasyon aşamasından sonra kümülüs hücrelerinden pipetlenerek uzaklaştırılan muhtemel zigotlar (n:299) 10'arlı olarak antioksidanların (Grup 1: L-ergotiyonin 0.05 mM (n:100) (Zullo ve ark), Grup 2: fetuin 1 mg/ml (n:100) (Landim-Alveranga ve ark 2002), Grup 3: kontrol (n:120)) ilave edildiği ve bir gece ekilibre edilmiş olan 100 µl kültür (IVC) droplarına aktarılarak tri gaz (Hera Cell, %6 O<sub>2</sub>, %6 CO<sub>2</sub>, %88 N, 38,8 °C) inkübatörde 7 gün süreyle kültüre bırakılmıştır (Razza ve ark 2018). Kültür ortamındaki 3. gün

2-16 hücreli aşama, 6. ve 7. günlerde blastosist oranları değerlendirilmiştir. Antioksidanların etkileri cleavage ve blastosist oranları ile belirlenmiştir.

Hesaplamalarda aşağıdaki formüller kullanılmıştır (Gron-dahl ve ark 2017, Hammond ve Morbeck 2019);

$$\text{Maturasyon Oranı} = \frac{\text{Kümülüs ekspansiyonu yada polar body tespit edilen oosit sayısı (Matür oosit)}}{\text{Maturasyona bırakılan oosit sayısı}}$$

$$\text{Cleavage Oranı} = \frac{\text{İki hücre ve üzerinde bölünme görülen embriyo sayısı}}{\text{Matür oosit sayısı}}$$

$$\text{Blastosist oranı} = \frac{\text{Blastosist sayısı}}{\text{Matür oosit sayısı}}$$

İstatistiki analizde SPSS-Statistics-22 paket program kullanılmıştır. In vitro embriyo üretim aşamalarında oluşan farklılıklar Ki-kare testi ile değerlendirilmiştir.

## Bulgular

Kümülüs ekspansiyonu ve polar bodynin en az birinin görülmesi ile in vitro maturasyona alınan toplam 320 oositin 299'unun (%93,44) mature olduğu belirlenmiştir. Grupların maturasyon oranlarının sırasıyla Grup 1 %94, Grup 2 %92 ve Grup 3 %94,17 olduğu ve istatistiki olarak farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir (p>0.05).

Kültür aşamasına alınan matüre olan tüm muhtemel zigotların (299) 273 adedinin en az iki hücreye bölündüğü (%91,84) görülmüştür. Grupların cleavage oranları sırasıyla %92,55, %94,57 ve %92,04 olduğu ve çalışılan oosit sayısına göre istatistiki farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir (p>0.05). Bu embriyolardan 148 adedinin 2-16 hücreli aşamaya ulaştığı ve gruplara göre oranların sırasıyla %29,79, %67,39 ve %51,33 olduğu belirlenmiştir. Grup 1 ve diğer gruplar arasında istatistiki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Dejenere embriyo sayısının toplam 55 olduğu ve gruplara göre oranları sırasıyla %17,02, %15,22 ve %22,12 olduğu tespit edilmiştir. Kültür sonrasında 65 (%21,74) adet blastosist elde edilmiştir ve gruplardaki blastosist oranları sırasıyla %45,74, %11,96 ve %18,58 olduğu görülmüştür. Yapılan çalışma sonrasında blastosist oranlarında Grup 1 ile diğer gruplar arasında istatistiki farkın önemli olduğu ancak 2. ve 3. grup arasında istatistiki farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir (p<0.05).

Tablo 1. Maturasyon, cleavage ve blastosist oranları

	Grup 1	Grup 2	Grup 3 (Kontrol)
Oosit	100	100	120
Mature Olan Oosit Sayısı	94	92	113
Maturasyon Oranı %	94	92	94.17
Fertilizasyona Alınan Oosit Sayısı	94	92	113
Fertilize Olan Oosit Sayısı	87	82	104
UFO	7	5	9
2-16 Hücreli Embriyo	28 <sup>d</sup>	62 <sup>c</sup>	58 <sup>c</sup>
Dejenere Embriyo	16	14	25
Cleavage Oranı %	92.55	94.57	92.04
Blastosist Sayısı	43	11	21
Blastosist Oranı	45.74 <sup>a</sup>	11.96 <sup>b</sup>	18.58 <sup>b</sup>

İstatistikî fark anlamlı bulunmuştur (p<0.05)

## Tartışma

Kültür medyumuna 0.05 mM ve 0.1 mM L-Erg ilave edilerek yapılan bir araştırmada in vitro embriyo üretim denemesi sonucunda cleavage oranlarının kontrol grubunda %78; 0.05 mM ilave edilen grupta %78; 0.1 mM ilave edilen grupta ise %80,4 olduğu bildirilmiştir (Zullo ve ark 2016). Aynı çalışmada blastosist oranları ise sırasıyla %46, %43,5 ve %41,5 olduğu rapor edilmiştir. İn vitro kültür ortamının L-Erg (0.1 mM) ile zenginleştirilmesinin, implantasyon sonrası gelişimi etkileyen en önemli faktör olan genel embriyo kalitesini iyileştirdiği bildirilmiştir (Zullo ve ark 2016).

Koyun oositlerinin maturasyon medyumuna katılan L-Erg'in 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 bildirilmiştir. Ayrıca 8 hücreli aşamaya ulaşma oranı L-Erg ilave edilen grupta %14,1, kontrol grubunda ise %5,4 olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar koyun oositlerinde L-ergotiyonin'in maturasyon ve özellikle bölünmeden morulaya kadarki embriyonik gelişim üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Öztürkler ve ark 2010).

Koyun oositleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada maturasyon medyumuna ilave edilen 5 mM ve 10mM L-Erg'in maturasyon oranlarını değiştirmezken (%80), cleavage ve blastosist oranlarının antioksidan ilave edilen gruplarda kontrol grubundan daha yüksek olduğu 10 mM ilave edilen grupta en yüksek blastosist elde edildiği bildirilmiştir (Mishra ve ark 2018).

Manda oositlerinin IVF uygulamasına alındığı çalışmada; L-Erg'in kültür medyumuna 0.05 mM, 0.1 mM ve 1 mM ilave

edildiği çalışmada cleavage oranlarının kontrol grubundan başlanarak sırasıyla %71,4, %66,8, %68,7 ve %63 olduğu; blastosist oranlarının ise %21,6, %30,9, %33,9 ve %21,7 olduğu bildirilmiştir (Zullo ve ark 2014).

Sunulan çalışmada L-ergotiyonin'in kültür medyumuna ilavesi sonucunda blastosist oranlarının her replikasyonda belirgin oranda arttığı ve blastosist gelişimini desteklediği görülmüştür. Elde edilen blastosist oranlarının literatürlerle uyumlu ya da daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Fetuin-B'nin ZP'nin fertilizasyon sonrası sertleşmesi ve kapanmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle kültür vasatına ilave edilen Fetuinin ZP'nin geri dönüşümsüz olarak sertleşmesine ve embriyoların blastosist aşamasına ulaşmasına engel olabileceği ya da blastosist aşamasına ulaşsa bile hatching aşamasına ZP'nin çatlamamasına neden olabileceği bildirilmiştir (Dietzel ve ark 2016). Ayrıca yüksek serum Fetuin-B seviyesinin ZP sertleşmesine neden olması sebebiyle IVF uygulamasında normal fertilizasyon mu ICSI mi yapılması gerektiğine karar vermede bu parametrenin kullanılabilmesi bildirilmiştir (Floehr ve ark 2016). Kadınlarda yürütülen bir çalışmada serum ve folikül sıvısı Fetuin-B seviyelerinin paralellik gösterdiği ve düşük Fetuin seviyesine sahip kadınların fertilizasyon oranlarının da düşük olduğu bildirilmiştir (Hu ve ark 2017).

Sığır oositlerinin maturasyon medyumuna ilave edilen fetuinin maturasyon oranlarına etkisinin belirlenmeye çalışıldığı bir çalışmada 1mg/ml dozunda fetuin'in kümülüs ekspansiyonunu arttırmadığı ancak fertilizasyon oranını kontrol grubuna oranla arttırdığı bildirilmiştir (Ün 2002). Fetuin-B seviyesinin fertilizasyon oranlarını farklı açılardan yükselttiği literatürlerde bildirilse de yapılan çalışmada antioksidan olarak kullanımında blastosist oranlarını düşürdüğü görül-

müştür. Antioksidan kullanımında dozun yüksek olmasına bağlı şekillenen toksisitenin, embriyodaki antioksidanlar ve prooksidanlar arasındaki dengenin sağlanamamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ortamda antioksidan bileşiklerinin fazlalığı, redoks durumunu değiştirerek, proteinlerin disülfid bağlarını azaltarak, denatürasyon veya inaktivasyona yol açarak embriyo üzerinde zararlı etkilere neden olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca bir antioksidan bileşiğin belirli bir medyumda embriyo gelişimi üzerinde faydalı bir etkiye sahip olabileceken, farklı bir medyumda etkisiz kalabileceği hatta zararlı bir etkiye yol açabileceği bildirilmektedir (Guerin ve ark 2001). Fetuin grubunda blastosist oranlarındaki düşüşün sebebinin doz aşımı ya da kültür medyumunda yeterli etkiyi gösterememesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Fetuinin kültür medyumuna ilave edilerek blastosist oranlarının araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak fetuin kullanımının blastosist oranlarını arttırmadığı aksine kontrol ve L-Erg gruplarından her replikasyonda daha düşük blastosist oranına ulaşılabilirdiği görülmüştür.

### Öneriler

Sunulan bilgiler ışığında antioksidan etkinliği yüksek olan L-Ergotiyonin'in blastosist gelişim oranlarını iyileştirdiği, kontrol grubu ve diğer antioksidana kıyasla daha yüksek blastosist oranlarına ulaşılabilirdiği görülmüştür. Blastosist gelişimindeki faydasının antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı düşünülse de L-Erg'in embriyolar üzerindeki etki mekanizmasının belirlenmesi için daha çok araştırma-ya ihtiyaç vardır. Ayrıca, L-Erg'in rutin olarak kullanımından önce, üretilen embriyoların transfer sonrasındaki gebelik ve doğum oranlarının da belirlenmesi faydalı olacaktır. Fetuinin kültür medyumlarında antioksidan etkinliğinin belirlenebilmesi için farklı dozlarda ve medyumlarda denenmesi gerektiği kanaatine ulaşılmıştır.

### Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

### Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

### Kaynaklar

- Abdelrazik H, Sharma R, Mahfouz R, Agarwal A, 2009. L-Carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil Steril*, 91, 589–596.
- Akanmu D, Cecchini R, Aruoma OI, Halli B, 1991. The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys*, 288, 10–16.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK, 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 1-21.
- Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, et al., 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 10, 49–80.
- Aruoma OI, Whiteman ME, Halliwell B, 1997. The antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun*, 231, 389–391.
- Aruoma OI, Spencer JP, Mahmood N, 1999. Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine. *Food Chem Toxicol*, 37, 1043–1053.
- Aruoma OI, Sunb B, Fujii H, Neergheen VS, et al., 2006. Low molecular proanthocyanidin dietary biofactor Oligonol: Its modulation of oxidative stress, bioefficacy, neuroprotection, food application and chemoprevention potentials. *Biofactors*, 27, 245–265.
- Asmus KD, Bensasson RV, Bernier JL, Houssin R, et al., 1996. One electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reactions involving ergothioneine and vitamin C. *Biochem J*, 315, 625–629.
- 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, 3-7.
- Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, et al., 2005. Developmental competence of oocytes from prepubertal Bos indicus crossbred cattle. *Anim Reprod Sci*, 85, 53–59.
- Dell'Aquila ME, De Felici M, Massari S, Maritato F, et al., 1999. Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured in vitro. *Biol Reprod*, 61, 533-540.
- Dietzel E, Floehr J, Jahnen-Dechent W, 2016. The biological role of fetuin-B in female reproduction. *Ann Reprod Med Treat*, 1, 1003.
- Elamaran G, Singh KP, Singh MK, Singla SK, et al., 2012. Oxygen concentration and cysteamine supplementation during in vitro production of buffalo *Bubalus bubalis* embryos affect mRNA expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. *Reprod Dom Anim*, 47, 1027–1036.
- Floehr J, Dietzel E, Neulen J, Rösing B, et al., 2016. Association of high fetuin-B concentrations in serum with fertilization rate in IVF: a cross-sectional pilot study. *Hum Reprod*, 31, 630–637.
- Franzoni RC, Galeta F, Laurenza I, Barsotti M, et al., 2006. An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric





- acid and trolox. *Biomed Pharmacother*, 60, 453-457.
- Fujii J, Iuchi Y, Okada F, 2005. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 43.
- Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, et al., 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 2014, 1, 152-169.
- Grondahl ML, Christiansen SL, Kesmodel US, Agerholm IE, et al., 2017. Effect of women's age on embryo morphology, cleavage rate and competence- A multicenter cohort study. *PLoS One*, 12, 1722456.
- Guerin P, El Moutassim S, Menezo Y, 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7, 175-189.
- Gürer F, 2003. İn vivo ve in vitro koşullarda oosit maturasyonu, in: İnfertil olgularda klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamaları, Ed; Hassa H, 1. baskı, Osmangazi üniversitesi Basımevi, Eskişehir, Türkiye, pp:229-240
- 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.
- Hammond ER, Morbeck DE, 2019. Tracking Quality: can embryology key performance indicators be used to identify clinically relevant shifts in pregnancy rate?. *Hum Reprod*, 34, 37-43.
- Hartman PE, 1990. Ergothioneine as an antioxidant. *Methods Enzymol*, 186, 310-318.
- Hu X, Mo F, Ma Q, Cui L, Lyu P, et al., 2017. Correlation of fetuin-B concentrations in serum and follicular fluid with outcomes of in vitro fertilization. *Journal of Zhejiang University Medical Sciences*, 25, 285-289.
- Ix JH, Shlipak MG, Brandenburg VM, Ali S, et al., 2006. Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study. *Circulation*, 113, 1760-1767.
- Kang JT, Atikuzzaman M, Kwon DK, Park SJ, et al., 2012. Developmental competence of porcine oocytes after in vitro maturation and in vitro culture under different oxygen concentrations. *Zygote*, 20, 1-8.
- Kerley RN, McCarthy C, Kell DB, Kenny LC, 2017. The potential therapeutic effects of ergothioneine in pre-eclampsia. *Free Radic Biol Med*, 117, 145-157.
- Lamhonwah AM, Tein I, 2006. Novel localization of OCTN1, an organic cation/ carnitine transporter to mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 1315-1325.
- Landim-Alvarenga FC, Boyazoğlu SEA, Carvalho LR, Choi YH, et al., 2002. Effect of Fetuin on zona pellucida hardening, fertilization, and embryo development in cattle. *Anim Reprod Sci*, 71, 181-191.
- Mishra A, Chandra V, Sharma GT, 2010a. Effect of epidermal growth factor on in vitro maturation of buffalo oocytes and embryo development with insulin like growth factor-1 and  $\beta$ -mercaptoethanol. *Ind J Anim Sci*, 808, 721- 724.
- Mishra A, Sharma GT, Kumar GS, 2010b. Expression profile of connexin 43 Cx43 and polyA polymerase PAP genes in buffalo *Bubalus bubalis* embryos produced in vitro. *J Appl Anim Res*, 38, 29-32.
- Mishra A, Gupta PSP, Reddy IJ, Sejian V, et al., 2016. Maturation timing and fetal bovine serum concentration for developmental potential of sheep oocytes in vitro. *Ind J Exp Biol*, 54, 630-633.
- 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*, 26, 149-161.
- Mori K, Emoto M, Inaba M, 2011. Fetuin-A: a multifunctional protein. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 5, 124-146.
- Mukherjee A, Malik H, Saha AP, Dubey A, et al., 2014. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *J Assist Reprod Genet*, 31(2), 229-239.
- Obayashi K, Kurihara K, Okano Y, Masaki H, et al., 2005. L-Ergothioneine scavenges superoxide and singlet O and suppresses TNF- $\alpha$  and MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts. *J Cosmet Sci*, 56, 17-27.
- Özturkler Y, Yıldız S, Gungor O, Pancarci SM, et al., 2010. The effects of l-ergothioneine and l-ascorbic acid on the in vitro maturation (IVM) and embryonic development (IVC) of sheep oocytes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 757-763.
- Paul BD, Snyder SH, 2010. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell Death Differ*, 17, 1134-1140.
- Petyim S, Bage R, Forsberg M, Rodriguez-Martinez, H., et al., 2001. Effects of repeated follicular puncture on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. *J Vet Med A*, 48, 449-463.
- Rasul S, Wagner L, Kautzky-Willer A, 2012. Fetuin-A and angiopoietins in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*, 42, 496-505.
- Saunders NR, Sheardown SA, Deal A, Mollgard K, et al., 1994. Expression and distribution of fetuin in the developing sheep fetus. *Histochemistry*, 102, 457-475.
- Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA, 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*, 18, 567-579.
- Sirard MA, Coenen K, 2006. In vitro maturation and embryo production in cattle. *Methods Mol Biol*, 348, 35-42.
- Srinivas SK, Sammel MD, Bastek J, Ofori E, et al., 2009. Evaluating the association between all components of the metabolic syndrome and pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 22, 501-509.
- Ün ZP, 2002. Östrustaki Sığır Serumu ve Fetuin'in Sığır Oositlerinin in vitro Maturasyonu Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Wrenzycki C, Hermann D, Niemann H, 2007. Messenger RNA





- in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68, 77–83.
- Zhu BZ, Mao L, Fan RM, Zhu JG, et al., 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, Salzona A, Bifulco G, Longobardi V, et al., 2014. Effect of L-Ergothioneine supplementation during culture on in vitro embryo development in buffalo (*bubalus bubalis*). *Reprod Fertil Dev*, 27, 160.
- Zullo G, Albero G, Neglia G, De Canditiis C, et al., 2016. L-Ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. *Theriogenology*, 85, 688–697.

### Yazar Katkıları

- Fikir/Kavram: Sakine Ülküm Çizmeçi, Dursun Ali Dinç, Mustafa Numan Bucak
- Tasarım: Sakine Ülküm Çizmeçi, Mustafa Numan Bucak, Vahit Ağır
- Denetleme/Danışmanlık: Sakine Ülküm Çizmeçi Dursun Ali Dinç, Mustafa Numan Bucak
- Veri Toplama ve/veya İşleme: Sakine Ülküm Çizmeçi, Vahit Ağır, Ayşe Sarı, Maide Gölbaşı, Hasan Ali Çay
- Analiz ve/veya Yorum: Sakine Ülküm Çizmeçi, Vahit Ağır, Ayşe Sarı, Maide Gölbaşı, Hasan Ali Çay, Furkan Çiftçi, Ömer Faruk Yeşilkaya
- Kaynak Taraması: Sakine Ülküm Çizmeçi, Furkan Çiftçi
- Makalenin Yazımı: Sakine Ülküm Çizmeçi, Mustafa Numan Bucak, Vahit Ağır
- Eleştirel İnceleme: Sakine Ülküm Çizmeçi, Mustafa Numan Bucak, Vahit Ağır

### Etik Onay

Sunulan çalışma, 20.08.2020 tarihli 2020/73 karar sayılı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu Kararı

**CITE THIS ARTICLE:** Çizmeçi SÜ, Dinç DA, Bucak MN, Yeşilkaya Ö, 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.

