

***In vitro* embriyo kültür medyumlarına ilave edilen eritropoietinin oksidatif stres ve embriyo gelişimi üzerine etkisi**

Muharrem Satılmış^{1*} , Ali Bilgili² 

¹ Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Mdrlg, Ankara, Türkiye

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 21.01.2020, **Kabul tarihi** / Accepted: 28.05.2020

zet: Çalışmada, *in vitro* embriyo kültür medyumuna ilave edilen eritropoietinin antioksidan etkinliği incelendi. Siğir ovaryumlarından elde edilen oositlerin *in vitro* maturasyonu ve fertilizasyonlarını izleyen süreçte eritropoietinin 3 farklı dozu (0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg /ml) ilave edilerek 3 deneme grubu ve eritropoietin ilave edilmemiş (antioksidansız) kontrol grubu oluşturularak kültür ortamına alınarak bölünen oosit oranları, blastosiste erişim oranları biyokimyasal parametreler değerlendirildi. Morula ve 48. saat bölünen oosit oranları bakımından gruplar arasındaki farklılık önemli iken, diğer özellikler için gruplar arası farklılıkların istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edildi ($p>0,05$).

Anahtar kelimeler: Antioksidan, embriyo, eritropoietin, *in vitro*, oksidatif stres

Effects of erythropoietin addition to *in vitro* embryo culture mediums, on oxidative stress and embryo development

Abstract: In this study, effectiveness of erythropoietin addition to *in vitro* culture mediums on oxidative stress and embryo development was investigated. *in vitro* maturation and fertilization of oocytes from cow ovaries, cleaved oocyte ratios, reaching to blastocyst ratios, and biochemical parameters were evaluated using 3 trial groups with different doses of erythropoietin (0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg /ml) to culture mediums and 1 control group without erythropoietin (no antioxidant). Morula and 48th hour cleaved oocyte ratios were significantly different between groups whereas differences regarding the other parameters were insignificant ($p>0,05$).

Key words: Antioxidant, embryo, erythropoietin, *in vitro*, oxidative stress

Giriş

Eritropoietin (EPO), hematopoietin olarak da adlandırılan glikoprotein yapısında yerel bir hormondur. 30.4 kDa ağırlığında bir glikoprotein ve insanlarda genomik DNA da 7. kromozomda bulunan 5.4 kb'lik bölgeden 193 amino asit içeren polipeptit zinciri şeklinde ifade edilir [15,19]. Başlıca böbrekler tarafından salgılanan EPO'nun karaciğer, makrofajlar ve salgı bezleri ile diğer doku ve hücrelerde varlığı tespit edilmiştir. Ancak en önemli üretim kaynakları böbreklerde kortikal peritubular hücreler olup, eritrosit üretiminden sorumludur [14,16]. Eritropoietinin birincil olarak eritrosit üretiminden kontrolünden sorumlu olmakla birlikte çeşitli klinik raporlar oksidatif stresi azaltabileceğini bildirmektedir. Bu alışmalarda EPO'nun *in vitro* embriyo üretim aşamasında hüresel hasarın önemli nedenlerinden biri olan oksidatif stresi azaltarak hücreleri koruya bilirdiği ortaya koymaya çalışıldı [3,9,17,24].

Embriyonun hücre membran yapısı büyük oranda doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu durumda gerek *in vitro* kültür ortamlarında gerekse kültür öncesi manipulasyonları esnasında oosit ve embriyolar lipit peroksidasyonuna maruz kalmaktadırlar [6].

Bazı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda embriyoların *in vitro* kültür sürecinde oluşan serbest radikal oranlar ile embriyo gelişiminin olumsuz etkilenmesi arasındaki ilişkinin önemli olduğunu bildirmektedirler [18,23].

Oositlerin gerek maturasyonu gerekse fertilizasyonunun *in vitro* kültür ortamında gerçekleştirilmesi esnasında oluşan serbest radikaller (süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksi radikali) hücrede oksidatif hasara neden olarak hücrenin normal fonksiyonlarını etkilemektedir. Bu oksijen radikalleri özellikle hücre zarlarını aşarak nükleik asit, protein, lipit gibi yapıları etkileyerek mitokondride bozukluklara

* Bu makale birinci yazarın doktora tezinin bir kısmından üretilmiştir.

Yazışma adresi / Correspondence: Muharrem Satılmış, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Mdrlg, Ankara, Türkiye
E-posta: satilmis96@gmail.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-4758-9508 • ²0000-0001-6819-7952

neden olurlar. Oluşan bu bozukluklar ise embriyonun normal gelişimini engelleyerek fertilizasyondan sonra embriyonik gelişimde bloklanmaya ve apoptozise neden olmaktadır [11,13].

In vivo şartlarda, embriyonun kendi yapısında ve yaşadığı dişi kanalında tiol bileşikler (glutasyon, sistein, hipotaurine) ve enzimler (katalaz, superoksit dismutaz) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşturduğu hasara karşı koruyucu endojen kaynaklı antioksidan etkili maddeler bulunmaktadır. Bu antioksidan maddeler ortamda gelişen ROS'un zararlı etkilerini önleyerek embriyoyu korumaktadır. Fakat bu endojen kaynaklı antioksidanlar *in vitro* kültür esnasında yetersiz kalmakta ve endojen antioksidanlar dışında başka ekzojen antioksidan maddelerin ilave edilmesine gereksinim duyulmaktadır [4].

Bu çalışmada *in vitro* Charles Rosencrans 1 aminoasit (CR1aa) embriyo kültür medyumuna eritropoietinin farklı dozları ilave edilerek embriyo gelişiminde ROS'un etkilerini elimine ve detoksifiye etkisi ile kullanılacak etkili uygun dozlarının belirlenmesi araştırıldı.

Materyal ve Metot

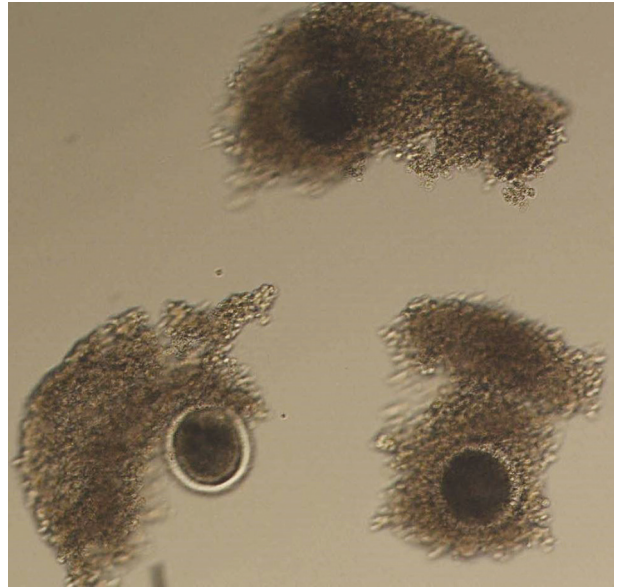
Ankara İli Çubuk İlçesi'nde ve Kırıkkale İl'inde bulunan çevre mezbahalarda kesilen dişi hayvanlardan toplanan ovaryumlar oosit kaynağını oluşturdu. Eritropoietin (Rat Recombinat Erythropoietin; SIGMA E 8905 USA) antioksidan olarak, Tissue Culture Medyum (TCM-199; M7528/Sigma-Aldrich Co.) maturasyon medyumunu, Charles Rosencrans (CR1aa) kültür medyumunu ve total oksidan ölçümleri için spektrofotometrik kit (Total Oxidant Status Assay Kit, Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti.) kullanıldı.

Ovaryumdan Oosit Aspirasyonu

In vitro embriyo elde edilmesi amacıyla bölgedeki mezbahalarda kesilen kültür ırkı ve melezlerine ait ineklerin ovaryumları kullanıldı. Hayvanların kesimini takip eden 15-20 dakikalık süre içerisinde alınan ovaryumlar antibiyotik (gentamisin 100 mg/L) ilave edilmiş %0.9 fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisine nakledildi. FTS içerisinde ve 30°C'lik sabit ısı sağlayan termosta 3 saat içerisinde laboratuvara getirildi [8]. Çapı 2-8 mm'lik büyüklüğe sahip folliküller normal enjektör ile Resim 1'deki gibi oositler aspire edilerek 90 mm petrilere toplandı [20]. Ardından çalışma için kullanılacak olan oositler kalite yönünden değerlendirildi [1]. A ve B kaliteye sahip olan oositler Resim 2'deki gibi (A kalite: etrafında 2 ve daha fazla kumulus hücre katmanı bulunan, B kalite: etrafında 2 sıralı kumulus hücre katmanı bulunan oosit) *in vitro* embriyo üretim sürecine alındı.



Resim 1. Oosit aspirasyonu.



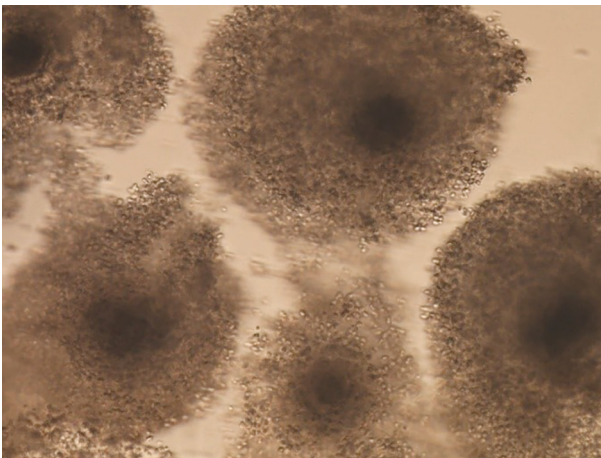
Resim 2. Aspire edilen oosit

Oositlerin *in vitro* Maturasyonu ve Fertilizasyonu

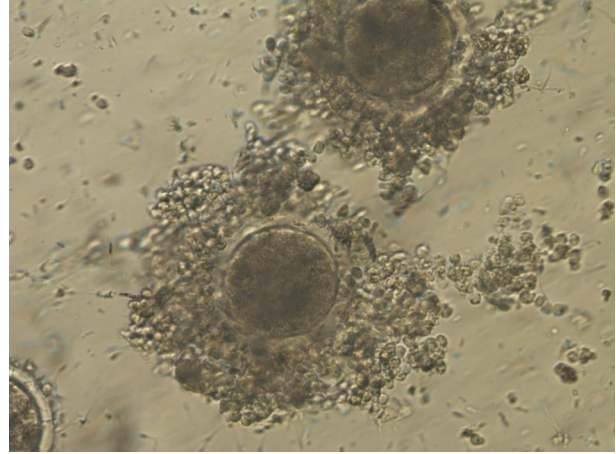
Aspire edilen A ve B kalite oositlerin maturasyonunu gerçekleştirmek amacıyla 2 µg/ml FSH, %10 fetal calf serum (FCS, SIGMA F9665), 0.1 mg/ml L-Glutamin (G8540/Sigma-Aldrich Co.), 100 IU/ml kristalize penisilin-G potasyum ve 100 µg/ml kristalize streptomisin sülfat ilave edilmiş TCM-199 doku kültürü medyumunu kullanıldı. Maturasyon sürecine alınan oositler 20-22 saat %95 bağıl nem, %5 CO₂ ve 38,5°C'deki karbondioksit inkubatörde inkübasyona bırakıldı [22]. % 90 ve üzeri kumulus ekspansiyonu gösteren oositler mature olmuş olarak değerlendirilerek (Resim 3) fertilizasyon sürecine alındı.

Bu amaçla Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü Suni Tohumlama

Laboratuvarı'nda üretilmiş olan, payet içerisinde 175×10^5 spermatozoaya sahip 0,25 ml'lik suni tohumlama payetlerinde dondurulan boğa spermaları kullanıldı. Kanagawa ve arkadaşlarının (12) yöntemine göre, Spermatozoonların kriyoprotektanlar, seminal plazmadan ayrılması, sulandırılması ve kapasitasyonu için modifiye Brackett Oliphant (BO) medyumları kullanıldı. BO stok medyumlarından Sperm Yıkama Solüsyonu (SYS), Sperm Sulandırma Solüsyonu (SSS) ve Oosit Yıkama Solüsyonu (OYS) hazırlanarak SYS ve OYS 35°C 'deki su banyosuna, SSS ise inkubatöre kaldırıldı. Kapasitasyon amacıyla 5 U/ml heparin (H3149/Sigma-Aldrich Co.) ve 2 mM kafein (C4144/Sigma-Aldrich Co.) kullanıldı. 0.25 'lik 5 sperma payeti 37°C 'deki su banyosunda 25-30 saniyede çözdürüldü. Ardından santrifüj tüplerine alınarak üzerine 6 ml SYS ilave edildikten sonra 1800 rpm devirde 5 dk santrifüj edildi. Ardından supernatant kısmı sifon yaptırılarak uzaklaştırıldı. İşlem 2 tekrar şeklinde gerçekleştirildi. Spermatozoonların mikroskoptaki sayımlarının kolay yapılabilmesi için üzerine 1.2 ml daha SYS ilave edildi. Bundan 50 μl alınarak 4950 μl %5'lik NaCl içeren tuzlu suya aktarılarak thoma lamında sayım işlemi gerçekleştirildi. Sayımın ardından elde edilen sayıya göre final yoğunluk 6.25×10^6 spermatozoa/ml olacak şekilde SSS ilave edilerek fertilizasyon medyumuna hazırlandı. 30.000 spermatozoa / oosit olacak şekilde son sulandırması yapılan spermatozoonlardan 35 mm kültür petrilerinde (Falcon 3001/Dickinson) 100 μl olmak üzere 4 mikro damla ve üzerleri mineral yağ ile kaplanarak fertilizasyon dropları oluşturuldu. *In vitro* maturasyonu tamamlanan oositler fertilizasyon için OYS ile en az 2 kez yıkandıktan sonra her bir mikro damlaya 20 adet oosit ilave edilerek 5-6 saat süreyle fertilizasyon (Resim 4) işlemleri gerçekleştirildi [22].



Resim 3. Oositlerin maturasyonu



Resim 4. Oositlerin fertilizasyonu

***In vitro* Embriyoların Elde Edilmesi**

5-6 saat fertilizasyon sürecinden sonra kumulus hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla dar pastör pipeti kullanıldı. Kumulusları uzaklaştırılan oositler eritropoietinin 3 farklı dozu ilave edilerek (0,125 μg , 0,25 μg , 0,5 μg /ml) deneme [26] ve eritropoietin ilave edilmemiş (antioksidansız) kontrol olmak üzere 4 grup oluşturularak CR1aa kültür medyumuna alındı. Kültür ortamı olarak $38,5^\circ\text{C}$, %5 CO_2 , % 95 nem içeren inkubatörden yararlanıldı. Her bir 100 μl kültür drobundaki en az 20 oosit kullanılarak çalışma gerçekleştirildi. Kültüre alınan oositlerin 2. günü (48 saat) sonunda mikroskopta bölünme oranları (Resim 5 ve Resim 6) kontrol edildi. Elde edilen bulgular kayıt edilerek bölünen oosit sayılarına göre bölünme oranları tespit edildi. İkinci gün bölünme kontrolü yapılan oositler tekrar inkübasyona alındı. Kültür sürecinin 7. gününde embriyo gelişimleri takip edilerek morula-blastosiste ulaşma oranları bakımından ve toplam embriyo sayıları stereo mikroskop (Olympus SZH10 Japonya) altında incelendi. Elde edilen embriyolar daha sonra total oksidan düzeyi ölçümleri yapılmak üzere -40°C 'ye kaldırıldı.

Embriyoların Total Oksidan Düzeyi Analizi

Örneklerdeki mevcut oksidanlar, demir iyonları ile birleşerek demirli şelat bileşimler halinde bulunurlar. Bu demir iyonları asidik solüsyonlarda renkli yapılar oluştururlar. Bu renk oluşumları da spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Total oksidan düzeyi (TOS) analizi bu prensiple yapılmaktadır. Total oksidan düzeyi ölçümleri ticari spektrofotometrik kit (Total Oxidant Status Assay Kit, Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti. Gaziantep, Türkiye) kullanılarak spektrofotometre cihazında (Perkin Elmer Lambda 25) belirlendi. -40°C 'den çıkarılan embriyolar oda ısısında

çözündürüldü. Embriyoların parçalanması işlemi dar pastör pipeti ile pipetleme yöntemiyle gerçekleştirildi. 1.2 mL'ye kadar distile su ilave edildi. 10 milimol etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren 0,2 molar 1.2 ml Fosfat tamponu ile karıştırıldı. Analiz için hazırlanan bu embriyo solüsyonundan 75 µl 1 ml'lik spektrofotometre küvetine konuldu. Üzerine kit içerisinde bulunan Reagent 1 (Assay Buffer) solüsyonundan 500 µL eklendi. Aynı şekilde kit içerisinde bulunan Standart 2 solüsyonunda 75 µL alınarak küvete konuldu ve üzerine 500 µl reagent 1 solüsyonu ilave edildi. Örnekler ve standart 530 nm'de okundu. Örneklerin ve standardın üzerine kit içerisinde bulunan 25 µl reagent 2 (Prochromogen solution) solüsyonundan ilave edilerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tekrar 530 nm'de okundu. Sonuçlar aşağıdaki formülle hesaplandı [7].

$$\text{Sonuç} = (\Delta \text{Absorbans Örnek} / \Delta \text{Absorbans Standart}) \times 20 \text{ Equiv/L}$$

Δ Absorbans Örnek: Örneğin, 530 nm de 2. absorbans değeri - 530 nm'de 1. absorbans değeri

Δ Absorbans Standart: Standardın, 530 nm de 2. absorbans değeri - 530 nm'de 1. absorbans değeri.

İstatistiksel Analiz

Embriyo gelişiminde expanse oosit, 48. saat bölünen oosit, morula, blastosist ve toplam embriyo oranları bakımından gruplar arası karşılaştırmalarda Khikare; expanded blastosiste erişme oranları bakımından gruplar arası karşılaştırmalarda ise bazı gruplarda gözlem sayısının (frekansların) 5'ten az olması nedeniyle G (Likelihood Ratio Chi-Square) istatistiği uygulanmıştır [5].

Bulgular

Embriyo kültür sürecine alınan fertilize oositlerin bölünme oranları Çizelge 1'te verilmiştir. Fertilize oositlerin 48. saatteki bölünme oranları bakımından 0.25 µg (% 66.49) ve 0.125 µg (% 62.19) eritropoietin içeren kültür medyumlarında, kontrol grubuna (% 50.78) göre daha yüksek sonuçlar elde edildi ($P < 0.001$). Morula aşamasına ulaşan embriyo oranları üzerinde ise, 0.5 µg (% 66.67) eritropoietin içeren kültür medyumuna, diğer gruplara göre daha yüksek sonuç verdi ($P < 0.05$). Blastosist ve expanded blastosist oranları üzerinde, eritropoietinin önemli bir etkisi görülmedi ($P > 0.001$). Oksidatif stres parametreleri üzerinde de eritropoietinin herhangi bir etkinlik göstermediği görüldü.

Çizelge 1. Kültür sürecine alınan fertilize oositlerin 48. saat ve 7-8. gün gelişim süreçlerine ait istatistiksel tablo.

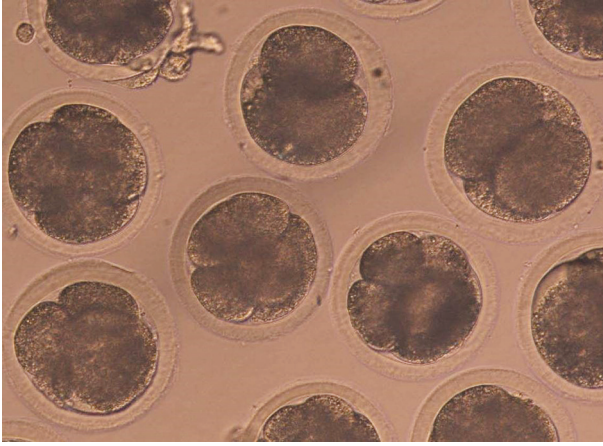
Gruplar	Maturasyona alınan oosit sayısı	Expanse oosit oranı (%)	Kültüre alınan oosit sayısı (CR1aa)	48. saat bölünen oosit oranları (%)	7. Gün Kültür Sonu Morula/Blastosist Oranları			
					Morula %	Blastosist %	Exp. Blast. %	Toplam Embriyo %
Kontrol	200	86,50	193	50,78 (98/193) ^b	17,65 (3/17) ^b	64,71 (11/17)	17,65 (3/17)	17,35 (17/98)
Deneme I (0,125 µg erit.)	201	85,57	201	62,19 (125/201) ^a	38,24 (13/34) ^b	47,06 (16/34)	14,71 (5/34)	27,20 (34/125)
Deneme II (0,25 µg erit.)	200	88,50	194	66,49 (129/194) ^a	32,00 (8/25) ^b	60,00 (15/25)	8,00 (2/25)	19,38 (25/129)
Deneme III (0,5 µg erit.)	200	89,50	177	46,33 (82/177) ^b	66,67 (12/18) ^a	33,33 (6/18)	0 (0/18)	21,95 (18/82)
p	-	-	-	***	*	-	-	-

-: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$

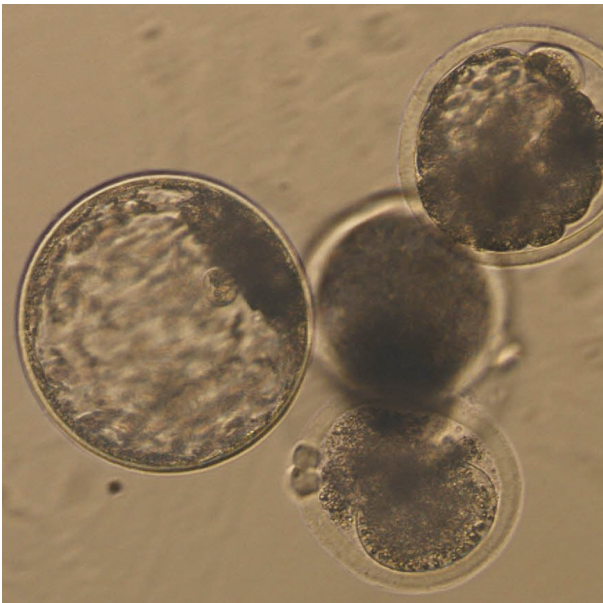
a, b: Aynı sütündeki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir

Çizelge 2. Kültür sürecine alınan fertilize oositlerin 7. gün total oksidan düzeyi analizi

Gruplar	Okuma 1	Okuma 2	DS	Sonuç Equiv/L
Kontrol	0,148	0,199	0,051	53,68
Deneme I (0,125 µg eritropoietin)	0,185	0,228	0,48	50,90
Deneme II (0,25 µg eritropoietin)	0,182	0,231	0,049	51,57
Deneme III (0,5 µg eritropoietin)	0,201	0,244	0,043	45,26
p	-	-	-	-



Resim 5. Fertilizasyondan sonra 48. Saat



Resim 6. Fertilizasyondan sonra 7. Gün

Tartışma ve Sonuç

Memeli hayvanlarda *in vitro* fertilizasyon sonrası gelişen oksidatif stres ve buna bağlı ortamda şekillenen serbest radikaller embriyonun gelişimini etkileyen önemli etkenlerden birisidir. Özellikle embriyonun yapısında meydana gelen hasara bağlı olarak blastosiste erişme oranında ve kaliteli embriyo elde edilmesinde oldukça önemlidir. Buradaki temel etken, embriyo hücre membranlarının yapısının doymamış yağ asitleri oranının yüksek olmasıdır. Serbest radikallerin oluşturduğu lipid peroksidasyon, hücre yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Fertilizasyondan sonra *in vitro* kültüre alınan oositlerin 48. saati embriyo gelişimi için oldukça önemli ve kritik bir dönemdir. Bu dönemde oksijen radikal-

lerin etkisi daha büyük olmakta ve embriyonal bloklanmalara sebep olmaktadır [6]. Netice olarak bu oksijen radikallerinin (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksi radikali) neden olduğu hücredeki hasar, hücre fonksiyonlarının devam ettirilmesini engelleyerek elde edilecek embriyo sayı ve kalite oranlarını düşürmektedir [11,13].

Memeli embriyoların *in vitro* elde edilmesinde çok farklı kültür ortamları kullanılmaktadır. Bunda temel amaç en uygun kültür ortamını sağlayarak embriyo kalitesini ve sayısını artırmaktır. Kaliteli blastosist elde edilmesi halinde embriyoların dondurulup çözülmesi sonrası nakillerinde gebelik oranları üzerinde oldukça önemli katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda kaliteli blastosist elde edilmesi ile embriyoda yapılacak işlemlerden (biyopsi, kriyoprotektanlardan daha az oranda etkilenme, blastomer seperasyonu vb.) etkilenmesi de daha az olacaktır. Bu amaçlarla oositlerin gerek maturasyon gerekse fertilizasyon sonrası kültür medyumlarına çok çeşitli antioksidan etkili maddelerin ilavesi yapılarak uygun bir kültür ortamının oluşturulmasına çalışılmaktadır [10,25].

Yapılan bu çalışmada, oositlerin fertilizasyonu sonrası kültürün 48. saatinde yapılan bölünme kontrollerinde; 0.25 µg ve 0.125 µg eritropoietin, kontrol grubuna göre daha yüksek (% 62 ve % 66) oran verdiği görüldü. Alınan bu sonuçlar Bucak ve ark. [2] Sisteamin ile yaptıkları çalışmaları sonuçlarından daha (% 49) yüksek bulunmuştur. Morula aşamasına ulaşan embriyo oranları üzerinde ise, 0.5 µg eritropoietin içeren kültür medyumları, diğer gruplara göre daha üstün çıktığı tespit edildi ($P < 0.05$). Sung ve ark. [21] ise morula aşamasındaki embriyo oranını %26, blastosist aşamasındaki embriyo oranını ise %19 bularak, bizim bulduğumuz sonuçlardan daha düşük bulmuşlardır.

Embriyo oksidatif stres parametreleri üzerinde de eritropoietin herhangi bir etkinlik vermediği tespit edildi. Bu sonuç, ortama katılan eritropoietinin antioksidan seviyelerini (glutatyon ve total antioksidan kapasite) artırmadığından hareketle, blastosist ve ekspanded blastosist oranlarına bir etkinliğin olmadığı varsayımını doğrulamaktadır. Bilimsel kaynaklarda ise embriyo üzerine eritropoietinin etkinliğini araştıran bir çalışmaya rastlanılmadı. Ancak yapılan diğer antioksidan çalışmalar ile karşılaştırıldığında daha düşük bir oran elde edilmediği de görüldü. [2].

In vitro kültür ortamında eritropoietinin serbest radikallerin zararlı etkilerinin azaltılmasına yönelik yapılan bu çalışmada oositlerin kültür ortamına aktarıldıktan sonra 48. saat bölünme oranları 0.25 ve

0.125 µL eritropoietin ilave edilmiş deneme gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç verdiği tespit edildi. Bununla birlikte toplam elde edilen embriyo sayıları bakımından 0.125 µL eritropoietin ilave edilen deneme grubunun diğer gruplara göre daha yüksek embriyo sayısı verdiği belirlendi. Mevcut çalışmada eritropoietinin *in vitro* embriyo kültür medyumlarında antioksidan etkinliğinin yapıldığı ilk çalışma olduğu için oksidatif stres parametrelerinin istatistiksel olarak anlamsız olmasının nedeninin ortaya konulabilmesi için farklı kültür medyumlarında da çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bunun yanı sıra embriyo kalite ve blastosiste erişme oranlarına etkili olan farklı etkenlerde bulunmaktadır. Özellikle oositlerin elde edildiği hayvanların kondisyonu, oosit kaliteleri ve farklı kültür ortamları da elde edilen sonuçları etkilemektedir. Bu nedenle çalışmaların başka kültür ortamlarında yapılacak farklı çalışmalar ile desteklenmesinin uygun olacağı kanaatine varıldı.

Teşekkür: Bu çalışma, TAGEM (TAGEM/HAYSUD/13/A-02/P-01/0) tarafından doktora projesi olarak desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Brackett BG, Zuelka KA (1993): Analysis of factor involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Therio*, 39: 43-64.
- Bucak MN, Satılmış M, Kızıl SH, Karaşahin T, Akyol N (2010): Sığır embriyolarının *in vitro* gelişiminde kültür medyumlarına katılan antioksidanların etkisi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 16 (1): 69-74.
- Calo LA, Stanic L, Davis PA, Pagnin E, Munaretto G, Fusaro M, Landini S (2003): Effect of epoetin on HO-1 mRNA level and plasma antioxidants in hemodialysis patients. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 41: 187-192.
- Del Corso A, Cappiello M, Mura U (1994): Thiol-dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *Int J Biochem*, 26: 745-750.
- Düzgüneş O, Kesici T, Gürbüz F (1983): İstatistik Metotları I. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 861: 229.
- Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, Zircarelli L (2000): Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. *Therio*, 54: 1537-1542.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2000): Free radicals in biology and medicine. 3th ed. Oxford: Oxford Science Publications, 617-24.
- Hamano S, Koikeda A, Kuwayama M, Nagai T (1992): Full-term development of *in vitro* matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Therio*, 38: 1085-1090.
- İnal M, Kanbak G, Şen S, Akyüz F, Sunal E (1999): Antioxidant status and lipid peroxidation in hemodialysis patients undergoing erythropoietin and erythropoietin- vitamin E combined therapy. *Free Radic Res*, 31: 211-216.
- Izquierdo D, Villamediana P, Paramio MT (1999): Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Therio*, 52: 847-61.
- Johnson MH, Nasr-Esfahani MH (1994): Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*. *Bioessays*, 16: 31-38.
- Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N (1995): Manuel of bovine embryo transfer national livestock breeding center. MAFF, JICA, Japan.
- Kehrer JP, Lund LG (1994): Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radical Biol Med*, 17: 65-75.
- Kratz SB (1991): Erythropoietin. *Blood*, 77: 419-434
- Maiese K, Li F, Chong ZZ (2005): New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA*, 293: 90-95.
- Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Iredale JP, Pugh CW, Johnson MH, Ratcliffe PJ (1997): Sites of erythropoietin production. *Kidney Int*, 51: 393-401.
- Mimic-Oka J, SIMIC T, DJUKANOVIC L (2002): Epoetin treatment improves red blood cell and plasma antioxidant capacity in hemodialysis patients. *Ren Fail*, 24: 77-87.
- Nasr-Esfahani MH, Johnson MH (1992): How does transferrin overcome the *in vitro* block to development of the mouse preimplantation embryo? *J Reprod Fertil*, 96(1): 41-48
- Sasaki, R, Masuda S, Nagao M (2000): Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64: 1775-1793.
- Schellender K, Fuhrer F, Brackett BG, Korb H, Schleger W (1990): *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplement with estrous cows serum. *Therio*, 33 (2): 477-485.
- Sung LY, Du F, Xu J, Chang W, Nedambale TL, Zhang J, Jiang S, Tian XC, Yang X (2004): The differential requirement of albumin and sodium citrate on the development of *in vitro* produced bovine embryos. *Reprod Nut Dev*, 44, 551-564.
- Takagi Y, Mori K, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J (1992): Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *J Anim Sci*, 70: 1923-1927.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T (1992): Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, 31: 28-33.
- Usberti M, Gerardi, GM, Micheli AM, Tira P, Bufano G, Gaggia P, Movilli E, Galli F (2002): Effects of erythropoietin and vitamin E modified membrane on plasma oxidative stress markers and anemia of hemodialyzed patients. *Am J Kidney Dis*, 40: 590-599.
- Wan PC, Hao Z.D, Zhou P, Wu Y, Yang L, Cui MS, Liu SR, Zeng SM (2008): Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. *Animal Reproduction Science*, in pres.
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004): Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, 35: 1732-1737.