بررسی اثر سیستئامین بر تکوین آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو

رحیم بهشتی[۱*]، جمشید قیاسی‌قلعه‌کندی[۲]، آمنه محمدی‌روشنده[۳]

چکیده

در این مطالعه تأثیر استفاده از سیستئامین بر تکوین آزمایشگاهی اووسیت گاو مورد آزمایش قرار گرفت. تخمدان‌های گاو از کشتارگاه صنعتی تبریز جمع‌آوری و در محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد حاوی ۱۰۰ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین G پتاسیم و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین سولفات در دمای ۳۰-۳۵ سانتی‌گراد ظرف ٤-۲ ساعت به آزمایشگاه کشت انتقال یافتند. مجموعه اووسیت-کومولوس‌ها در محیط کشت TCM-199 دارای ۱۰ درصد سرم جنینی گاو، ۰/۲۳ میلی مولار سدیم پیرووات، ۲۵میلی مول بیکربنات سدیم، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین-استرپتومایسین، ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر استرادیول ۱۷ بتا، ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون محرک فولیکول،۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر گونادوتروپین کوریونیک انسان و سطوح صفر (گروه شاهد)، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار سیستئامین به‌مدت ۲٤ ساعت کشت داده شدند. میزان بلوغ اووسیت‌ها در محیط دارای سطح ۰/۱ میلی‌مول آنتی‌اکسیدان سیستئامین بالاتر از گروه کنترل بود (به‌ترتیب ٤٦/٦٦ در مقابل ۳۳/۳۳ درصد). میزان بلوغ اووسیت‌ها در محیط دارای سطح ۰/۵ میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان (۵٦/۵۵٪) نسبت به گروه کنترل (۳۳/۳۳٪) بالاتر بود (P≤۰/۰۵). میزان اووسیت‌های تکوین نیافته در تیمار سیستئین ۱ میلی مولار در پائین‌ترین حد بود (P≤۰/۰۵). در کل نتایج این تحقیق حاکی از این بود که استفاده از آنتی‌اکسیدان در محیط کشت آزمایشگاهی، می‌تواند میزان بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو را بهبود دهد.

واژگان کلیدی: *اووسیت گاو، سیستئامین، تکوین آزمایشگاهی، آنتی‌اکسیدان*

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۳۰

مقدمه

در قرن ۲۱ انقلابی در استفاده از پروسه‌های بیوتکنولوژیک در حیوانات اهلی رخ داده است. امروزه تولید آزمایشگاهی رویان (*In vitro* embryo production) به‌عنوان ابزاری در جهت حل مشکلات ناباروری, افزایش سوددهی صنایع پرورش دام و جلوگیری از انقراض نسل جانداران در معرض خطر بکار می‌رود و به‌طور قطع استفاده موفقیت‌آمیز تکنولوژی تولیدمثل کمکی وابسته به تکنولوژی‌های تولیدمثلی پایه‌ای مانند بلوغ آزمایشگاهی اووسیت (*In vitro* maturation) IVM، لقاح آزمایشگاهی IVF (*In vitro* fertilization) می‌باشد (۱٤). در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای بهبود رشد آزمایشگاهی با تغییر دادن ترکیبات محیط و مواد افزودنی و با استفاده از کشت همزمان با سلول‌های سوماتیک شده است (۱۰). بر اساس مطالعات صورت گرفته شرایط بلوغ آزمایشگاهی، توانایی لقاح، تسهیم و رشد بعدی رویان را تعیین می‌نمایند؛ بعضی از این شرایط عبارتنداز: درجه حرارت، اسیدیته محیط، فشار اسمزی، مواد غذایی، فشار اکسیژن و مواد آنتی اکسیدان (۱۵).

به نظر می‌رسد که فشارهای اکسیداتیو مسئول بسیاری از صدمات وارده به اووسیت و رویان باشند. مولکول‌های فعال اکسیژن مثل O^{2-} قادرند که به غشاء سلول نفوذ کرده و بسیاری از ترکیبات سلولی مثل لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را تغییر دهند. مولکول‌های فعال اکسیژن پراکسیداسیون لیپیدها را القاء می‌کنند و روی تقسیم سلولی، انتقال متابولیت‌ها و فعالیت میتوکندری تاثیر می‌گذارند و با تخریب DNA می‌توانند سبب توقف رشد اووسیت یا رویان در محیط کشت شوند (۷). استراتژی جدید بر این نکته تاکید دارد که افزایش ناحیه‌ای آنتی اکسیدان‌ها که نقش پاک‌کنندگی مولکول‌های فعال اکسیژن را بر عهده دارند، موجب افزایش میزان تکوین تخمک‌ها وبالابردن کیفیت تخمک‌های به دست آمده می‌شود. در راستای این هدف مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان سلولی یعنی گلوتاتیون از اهمیت خاصی برخوردار است (۲). بر اساس شواهد گلوتاتیون در فعالیت اووسیت‌ها شامل استواری دوک تقسیم میوز نقش دارد و با ممانعت از صدمات اکسیداتیو به دوک تقسیم، سبب تشکیل زیگوت طبیعی می‌شود. همچنین این ماده نقش مهمی در تشکیل پرونوکلئوس نر به‌عهده دارد (۱۸).

۱*ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، گروه دامپزشکی، شبستر، ایران. Rahimbeheshti@yahoo.com

۲ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، گروه علوم دامی، شبستر، ایران.

۳- دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه علوم تشریحی، همدان، ایران.

سیستئامین از ترکیبات تیولی است که در صورت حضور درمحیط کشت موجب القاء تولید گلوتاتیون می‌شود. اما اثر این مواد بر رشد تخمک‌ها یا جنین‌ها بسته به نوع تخمک، نژاد، میزان دوز مصرفی و محیط کشت بکار برده شده متفاوت می‌باشد (٤). در سال ۲۰۰۳، گاسپارینی و همکاران از ۵۰ میکرومولار ویا ۰/۳ میلی مولار سیستئین و سیستئامین در محیط TCM استفاده نموده و مشاهده کردند که میزان گلوتاتیون داخل سیتوپلاسمی به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود. در تمام گروه‌های آزمایشی میزان تسهیم بالاتر از گروه شاهد بود (٦). در مطالعه‌ای کوباياشی و همکاران (۲۰۰٦) اثر ۱۰۰ میکرومولار سیستئامین و ۱۰۰ میکرومولار بتامرکاپتواتانل بر IVM و IVF اووسیت‌های خوکچه هندی تفاوت معنی‌دار در درصد تکوین و لقاح آزمایشگاهی اووسیت‌ها ما بین گروه‌ها وجود ندارد (۹). هدف از این مطالعه بررسی اثر حضور سیستئامین در محیط TCM-199 بر میزان تکوین آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو هولشتاین بود.

مواد و روش کار

- **جمع‌آوری تخمدان**

تخمدان‌های گاو از کشتارگاه صنعتی تبریز جمع آوری و در بافر فسفاته در دمای ۳۵-۳۰ سانتی‌گراد ظرف ۳ ساعت به آزمایشگاه کشت بافت انتقال یافتند. پس از حذف بافت‌های زائد، تخمدان‌ها چندین بار با سرم فیزیولوژی حاوی ۱۰۰۰۰۰ واحد در لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر استرپتومایسین شستشو داده شدند.

- **جمع‌آوری اووسیت‌ها**

کمپلکس اووسیت و سلول‌های کومولوسی (Cumulus oophorus complex) به‌وسیله سرنگ ۱۰ میلی لیتری متصل به سرسوزن گیج ۱۸ از فولیکول هایی به اندازه ۸-۲ میلی‌متر آسپیره شده و با استفاده از استریومیکروسکوپ بر اساس مورفولوژی کومولوس طبقه‌بندی شدند. تنها اووسیت‌هائی که حداقل سه لایه متراکم سلول‌های کومولوسی در اطراف آن‌ها بوده و اووپلاسم یکنواخت داشته باشند انتخاب گردیدند.

- **تکوین آزمایشگاهی اووسیت**

مجموعه اووسیت ـ کومولوس‌ها پنج بار بوسیله محیط TCM-199 هپس‌دار شسته شده، سپس به محیط کشت TCM-199 انتقال داده شدند. این محیط توسط ۱۰ درصد سرم جنینی گاو، ۰/۲۳ میلی مولار سدیم پیرووات، ۲۵میلی مول بیکربنات سدیم، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین ـ استرپتومایسین، ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر استرادیول ۱۷ بتا، ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون محرک فولیکول، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر گونادوتروپین کوریونیک انسان و سطوح ۰/۱، ۰/۵ و یک میلی مولار سیستئامین تکمیل شد. برای این منظور اووسیت‌ها در قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری (۲۰ اووسیت در هر قطره) از محیط مناسب پوشش داده شده با روغن معدنی در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر حاوی ۵٪ دی‌اکسید کربن و حداکثر رطوبت کشت داده شدند (۳).

- **ارزیابی اووسیت‌ها بعد از IVM**

قطرات کشت به منظور ثبت تعداد اووسیت‌هایی که به مرحله MII رسیده بودند (بر اساس مشاهده گویچه قطبی)، ۲٤-۱۷ ساعت بعد از کشت مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از استریومیکروسکوپ تعداد تخمک‌های MII شمارش شده و ثبت شدند.

- **تجزیه و تحلیل آماری**

میزان رشد رویانی در مراحل مختلف به درصد تعیین شده، برای بررسی تفاوت مابین درصدها از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه استفاده شد. پس از مشخص شدن آماره F توسط آزمون تجزیه واریانس، مقایسه میانگین در گروه‌های تجربی و شاهد با آزمون دانکن (Duncan)، در سطح معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) انجام گردید.

نتایج

میزان رشد اووسیت‌ها آسپیره شده در محیط TCM 199 بعلاوه سطوح متفاوت سیستئامین در جدول ۱-٤ خلاصه شده است. همان‌طور که در جدول زیر مشاهده می‌شود میزان بلوغ اووسیت‌ها در محیط دارای سطح ۰/۱ میلی‌مول آنتی‌اکسیدان سیستئامین بالاتر از گروه کنترل بوده، اما این تفاوت معنی‌دار نبود. از طرفی میزان اووسیت‌های تکوین نیافته در گروه کنترل بالاتر از گروه دارای ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان می‌باشد ($P\leq$ ۰/۰۵).

میزان بلوغ اووسیت‌ها در محیط دارای سطح ۰/۵ میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان (**۵۵/۵٦٪**) نسبت به گروه کنترل (۳۳/۳۳٪) بالاتر می‌باشد ($P\leq$ ۰/۰۵). همان‌طور که در جدول ۱-٤ قابل مشاهده است، تفاوت موجود در درصد اووسیت‌های تکوین نیافته مابین این دو گروه نیز معنی‌دار می‌باشد ($P\leq$ ۰/۰۵).

نتایج تکوین آزمایشگاهی اووسیت‌ها در محیط کشت TCM 199 بعنوان کنترل و این محیط به‌همراه سیستئامین ۱ میلی مولار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در میزان تکوین اووسیت‌ها و درصد اووسیت‌های بالغ نشده مابین این دو گروه می‌باشد ($P\leq$ ۰/۰۵).

جدول ۱-٤: درصد تکوین آزمایشگاهی اووسیت‌ها در محیط کشت TCM 199 بعلاوه سیستئامین

محیط کشت دارای	اووسیت تکوین یافته (٪)	اووسیت تکوین نیافته (٪)	اووسیت دژنره (٪)
سیستئامین ۰/۱ میلی مولار	۲۱(٪٤٦/٦٦) ^{bc}	۱۹(٪٤۲/۲۲)^{ab}	**۵(٪۱۱/11)**
سیستئامین ۰/۵ میلی مولار	**۲۵(٪۵۵/۵٦)** ^{ab}	۱٤(٪۳۱/۱۱) ^{bc}	٦(٪۱۳/۳۳)
سیستئامین ۱ میلی مولار	۳۱(٪٦۸/۸۹)^{a}	۱۲(٪۲٦/٦٦)^{c}	۲(٪٤/٤٤)
بدون سیستئامین (کنترل)	۱۵(٪۳۳/۳۳)^{c}	۲۳(٪۵۱/۱۱)^{a}	۷(٪۱۵/۵٦)

a-c تفاوت مابین ستون‌ها معنی‌دار می‌باشد ($P\leq$ ۰/۰۵).

درصد تکوین آزمایشگاهی در تیمار سیستئامین ۱ میلی‌مولار در بالاترین حد بوده و نسبت به تیمارهای کنترل و سیستئامین ۰/۱ میلی‌مولار تفاوت معنی‌دار وجود دارد ($P\leq$۰/۰۵). همچنین تفاوت مابین تیمار سیستئامین ۰/۵ میلی مولار و گروه کنترل معنی‌دار بوده ($P\leq$۰/۰۵)، اما تفاوت مابین این تیمار با تیمارهای سیستئین ۱ و ۰/۱ میلی مولار معنی‌دار نمی‌باشد. میزان اووسیت‌های تکوین نیافته نیز در تیمار کنترل در بالاترین حد و در تیمار سیستئین ۱ میلی‌مولار در پائین‌ترین حد می‌باشد ($P\leq$۰/۰۵).

بحث

از زمانی‌که موخری (۱۹۷۲) امکان بالغ شدن و لقاح آزمایشگاهی را در اووسیت‌های موش گزارش نمود، تلاش‌های زیادی بر روی اووسیت‌های گاو و خوک صورت گرفته است که در نهایت منجر به بدنیا آمدن گوساله زنده از اووسیت‌هایی که در آزمایشگاه بالغ و بارور شده بودند گردید (۸).

اکثر روش‌های مورد استفاده در تکنولوژی کمکی تولیدمثلی برای درمان ناباروری مستلزم کشت رویان‌های قبل لانه گزینی است (۱٦). این روش مخصوصاً برای بسیاری از زنانی که قادر به بالغ کردن اووسیت در داخل بدن خود نیستند (بیماران با تخمدان پلی کیستیک) و زنان سرطانی که در معرض دوزهای بالای اشعه یا شیمی درمانی برای درمان قرار می‌گیرند وقبل از درمان تخمدان خود را جراحی می‌کنند، مفید می‌باشد (۱۹).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سیستئامین به‌عنوان آنتی اکسیدان میزان تکوین اووسیت‌ها را به متافاز دو افزایش داد.

اثر این ماده وابسته به دوز بود و در مقادیر متخلف، نتایج متفاوتی کسب گردید. احتمالا سیستئامین در محیط کشت TCM-199 (محیط غنی از سیستین)، سیستین را به سیستئین احیا می‌کند.

همان‌طور که در بخش نتایج ذکر شده است درصد تکوین آزمایشگاهی در تیمار سیستئامین ۱ میلی‌مولار در بالاترین حد بوده و نسبت به تیمار کنترل تفاوت معنی‌دار وجود داشت (P≤۰/۰۵). سطوح دیگر شامل ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار نیز سبب افزایش درصد بلوغ آزمایشگاهی در اووسیت‌های گاوی شدند؛ به‌طوری‌که تفاوت مابین تیمارهای سیستئامین ۰/۵ میلی مولار و گروه کنترل معنی‌دار بوده (P≤۰/۰۵) و سبب بهبود درصد بلوغ شدند (P≤۰/۰۵). محیط کشت آزمایشگاهی یکی از عوامل بسیار مهم در تولید رویان‌هایی با توان رشد بهتر است که در تحقیقات کشاورزی-بیومدیکال و بیوتکنولوژی دامی بکار می‌رود. بیوتکنولوژی رویانی از ضروریات بهبود ژنتیکی گله‌ها و تکنولوژی‌هایی مانند انتقال هسته سلول‌های سوماتیک می‌باشد (۵).

عامل احیا کننده گلوتاتیون نقش‌های مهمی طی رشد اووسیت دارد و طی تکوین اووسیت میزان گلوتاتیون افزایش می‌یابد؛ میزان این افزایش در اووسیت‌های بالغ شده در بدن دام نسبت به شرایط آزمایشگاهی بالاتر می‌باشد. بر اساس گزارش هانگ و لی (۲۰۰۷) کاهش GSH در طی بلوغ آزمایشگاهی اووسیت گاوی منجر به متوقف شده کاهش تراکم پیش هسته نر در اووسیت می‌گردد (۱۳). از طرفی دیماتوس و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کرده‌اند که GSH یک نانوپروتئین سولفیدریلی مهم در سلول‌های پستانداران است نقش مهمی در حفاظت سلول از آسیب اکسیداتیو دارد (٤). بنابراین در عمل افزایش محتوای GSH اووسیت‌ها طی مرحله بلوغ یکی از آسان‌ترین راه‌ها برای افزایش شانس رشد رویان در پستانداران می‌باشد (۱۲).

لوسیانو و همکاران (۲۰۰٦) پس از استفاده از ۱۰۰ میکرومولار سیستئامین بر میزان گلوتاتیون ناحیه‌ای اووسیت‌های رشد یافته در داخل یا خارج بدن گونه اسب مشاهده کردند، میزان گلوتاتیون در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌دار نشان نداد، اما میزان گلوتاتیون و درصد بلوغ در اووسیت‌های رشد یافته در داخل نسبت به خارج بدن به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. همچنین میزان گلوتاتیون در اووسیت‌های حباب زاینده (Germinal-vesicle) به‌طور معنی‌دار بالاتر از اووسیت‌های مرحله متافاز II بود. این تفاوت در نتایج با نتایج تحقیق ما شاید بدلیل تفاوت در گونه دام باشد (۱۱).

یاموچی و ناگای (۱۹۹۹) گزارش نمودند که سیستئامین (یک ترکیب تیولی با خاصیت احیاکنندگی) میزان GSH و تشکیل پیش هسته نر را حتی در اووسیت‌های بدون سلول‌های کومولوسی افزایش می‌دهد (۱۸). نتایج تحقیقی که توسط چن و همکاران (۲۰۰۵) بر روی اثر ۱۰۰ میکرومولار سیستئامین بر میزان بلوغ اووسیت‌های موش انجام شد نشان داد که سیستئامین بطور معنی‌داری میزان بلوغ اووسیت‌ها را افزایش داده است (۱). در سال ۲۰۰٤ ویتاکر و همکاران ترکیبات گاما گلوتامیل مانند ال- سیستئین، ال- سیستئامین، ال- گلوتامات، ال-آلفا آمینو بوتیرات را در محیط کشت NCSU23 روی بقا جنین بررسی کردند. در این بررسی میزان پلی‌اسپرمی در گروه ال-آلفا آمینو بوتیرات و بتامرکاپتواتانل نسبت به گروه کنترل در کمترین میزان خود بود و میزان بلاستوسیست در این گروه‌ها بالاتر از بقیه گروه‌ها بود (۱۷).

در مطالعه‌ای مشاهده گردید که وجود ۱۰۰ میکرومولار سیستئامین در محیط کشت TCM-199 سبب افزایش غیر معنی‌دار اندازه دوک تقسیم نسبت به گروه کنترل گردید و در محیط دارای ۲۰۰ میکرومولار سیستئامین این افزایش معنی‌دار بود که نشانه اثر مثبت این آنتی‌اکسیدان بر روی تشکیل دوک‌های تقسیم می‌باشد(۱). در نهایت میتوان نتیجه گرفت استفاده از ترکیبات تیولی مانن سیستئامین در محیط تکوین آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو می‌تواند به بلوغ بهتر اووسیت‌ها کمک نماید.

فهرست منابع

۱. روشنده، آ.، ۱۳۸۵. بررسی اثر سیستئامین بر اسکلت سلولی و میزان تکوین جنین‌های دو سلولی حاصل از IVM تخمک موش در محیط‌های کشت مختلف. پایان نامه دکترای تخصصی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران.

2. Alvarez, J.G., Storey, B.T. (1998): Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids phospholipids of human spermatozoa. Mol. Reprod. 42: 334-346.
3. Balasubramanian, S., Rho, G.J. (2007): Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. Ani. Reprod. Sci. 98: 282–292.
4. De Matos, D.G., Gasparrini, B., Pasqualini, S.R., Thompson, J.G. (2002): Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. Theriogenology. 57: 1443-1451.
5. Faber, D.C., Ferrel, L.B., Metzger, J., Robl, J.M., Kasinathan, P. (2004): Agroeconomic impact of cattle cloning. Cloning Stem Cells. 6: 198–207.
6. Gaspmini, B., Sayoud, H., Neglia, G., de Matos, D.G., Donnay, I., Zicarelli, L. (2003): Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (Bubalus bubalis) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. Theriogenology. 60: 943–952.
7. Gaurin, P., Mouatassim, S., Menezo, Y. (2001): Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum. Reprod. Update. 7: 175-89.
8. Hanada, A., Shioya, Y., Suzuki, T. (1986): Birth of calves after non-surgical transfer of bovine IVM/IVF oocytes. Proc of 78th meeting of the Jap Sot Zootech Sci. p: 18.
9. Kubayashi, M., Lee, E.S., Fukui, Y. (2006): Cysteamine or ß-mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Theriogenolpgy. 65: 1191-9.
10. Lonergan, P., Flynn, M.O.K., Boland, P. (1998): Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in seythetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. Theriogenology. 51: 1565-1576.
11. Luciano, A.M., Goudet, G., Perazzoli, F., Lahuec, C., Gerard, N. (2006): Glutathione content and glutathione peroxidase expression in in vivo and in vitro matured equine oocytes. Mol. Reprod. Dev. 73: 658-666.
12. Nagai, T. (1996): In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. Anim. Reprod.. Sci. 42: 153-163.
13. Hong, J., Lee, E. (2007): Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. Theriogenology. 68: 728–735.
14. Telfer, E.E., Binnie, J.P., Mc Caffery, F.H., Campbell, B.K. (2000): *In vitro* development of oocytes from porcine and bovine primery follicles. Mol.Cell Endocrinol. 163: 117-23.
15. Van der Auwera, I., Pijnenborg, R., Konincke, P.R. (1999): The influence of *in vitro* culture versus stimulated and untreated oviductal environment on mouse embryo development and implantation**.** Hum. Reprod. 14(10): 2570-2574**.**
16. Walker, R.J., Hawk, H.W., Nel, N. (1992): Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale. J. Cell. Biochem. 49: 113–120.
17. Whitaker, B. D., and Knight, J. W. (2004): Exogenous γ-glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture and viability of porcine oocytes and embryos. Theriogenology 62: 311–322
18. Yamauchi, N., Nagai, T. (1999): Male pronucleus formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. Biol. Reprod. 61: 828-833.
19. Zofia, Luberda. (2005): The role of glutathione in mammalian gametes. Reprod. Biol. 5(1): 5-17.