

Sığırlarda *In Vitro* Kültürü Etkileyen Çevresel Faktörler

Ayşe SAPCI^{1,a}, Yunus Emre DENİZ^{1,b}, Fatma SATILMIŞ^{1,c,✉}

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE

ORCID: ^a0009-0009-6739-4466, ^b0009-0005-9847-3061, ^c0000-0002-9877-8405

✉ Sorumlu Yazar

Fatma SATILMIŞ
Selçuk Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji
Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE

fatmasatilmis@selcuk.edu.tr

Received
01.11.2024

Accepted
06.03.2025

Published
30.06.2025

DOI
10.47027/duvetfd.1577834

How to cite: Sapcı A, Deniz YE, Satılmış F (2025). Sığırlarda *In Vitro* Kültürü Etkileyen Çevresel Faktörler. *Dicle Univ Vet Fak Derg.*, 18(1):71-78.

This journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License ([CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).



Öz

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sığır embriyolarının *in vitro* üretimi önemli ölçüde geliştirilmiştir. Ancak, yapılan çalışmalar, *in vitro* üretimde embriyoların birçok mikro ortama uyum sağlaması gerektiği için sonuçların *in vivo* embriyo üretim başarısına göre daha düşük olduğunu göstermektedir. Ayrıca *in vitro* embriyo üretiminde bulunulan sıvıların taklit edilmesi ve ortamların stabilizasyonunda da ciddi problemler yaşanmaktadır. Bu nedenle embriyoların üretilmesi sırasında laboratuvar ortamının stabilizasyonunu sağlamak ve başarıyı artırmak için, *in vitro* kültür ortamını etkileyen çevresel faktörlerin (ısı, ışık, osmolarite, nem, inkübatör, uçucu organikler, gaz fazı, kültür ortamı, yağ kaplaması, tercih edilen plastik materyaller vb) etkisi unutulmamalıdır. Sunulan bu derlemede, *in vitro* embriyo üretiminin en önemli basamaklarından biri olan *in vitro* kültür aşamasını etkileyen çevresel faktörlerin öneminin açıklanması amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çevresel faktörler, embriyo, *in vitro* kültür, sığır

Environmental Factors Influencing *In Vitro* Culture in Cattle

Abstract

In vitro production of bovine embryos has improved significantly in recent years. However, studies show that *in vitro* embryo production is less successful than *in vivo* embryo production. However, studies have shown that *in vitro* production results are lower than *in vivo* embryo production success because embryos need to adapt to many microenvironments. Also, in *in vitro* embryo production, there are serious problems in mimicking the fluids and stabilizing the environments. Therefore, the influence of environmental factors affecting the *in vitro* culture environment (temperature, light, osmolarity, humidity, incubator, volatile organic compounds, gas phase, culture medium, oil coating, preferred plastic materials, etc.) should not be forgotten to stabilize the laboratory environment and increase the success of embryo production. In this review, it is aimed to explain the importance of environmental factors affecting the *in vitro* culture stage, which is one of the most important steps of *in vitro* embryo production.

Key Words: Cattle, embryo, environmental factors, *in vitro* culture

GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde, hayvansal kaynaklı ürünlere talep giderek artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde, tüketilen hayvansal protein miktarı, ülkemizde tüketilen miktarın yaklaşık iki katıdır. Türkiye, hayvansal kaynaklı protein ihtiyacını karşılamak için hayvancılık alanında yapılan biyoteknolojik çalışmalara ve ithalata açık hale gelmiştir. Ülkemizde ve tüm dünyada, artan talebi karşılamak ve hayvan ıslahı amacıyla yapılan biyoteknolojik uygulamalar arasında klonlama, senkronizasyon, suni tohumlama ve embriyo transferi (ET) gibi çalışmalar yer almaktadır (1,2). Hayvancılığın gelişmesi açısından 1970'li yıllarda başlayan ET çalışmaları, günümüzde yaygın olarak uygulanmaktadır. Hayvancılık ekonomisinin gelişmiş olduğu ülkelerde, ET uygulaması ile yıllık 1,5 milyon civarında embriyo üretimi yapılmaktadır (3). Türkiye'de ise 1980'li yıllarda başlanan ET uygulamalarında; gerekli alt yapı ve personelin bulunmaması, hayvan kayıtlarının sistemli olmaması, genetik değerlerin bilinmemesi, elde edilen gebelik oranlarının farklılığı ve maliyetin yüksek olması nedeniyle saha şartlarında önemli bir başarı elde edilememiştir (4-6).

Sığırlarda biyoteknolojik bir yöntem olan ET *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Özellikle son yıllarda sığırlarda *in vitro* embriyo üretimine (IVEP) karşı ilginin arttığı bilinmektedir (7). Ancak laboratuvarında yapılan birçok çalışmanın sonucunda IVEP oranının %20 ile %40 arasında olduğu bildirilmektedir. Dünya çapında IVEP, sığırlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Uluslararası Embriyo Teknolojileri Topluluğuna (IETS) göre 2019 yılında sığırlarda üretilen toplam embriyonun yaklaşık %70'inin *in vitro* yöntemle elde edildiği rapor edilmiştir (8). *In vitro* embriyo üretimi; ovaryumlardan oosit eldesi, *in vitro* matursayon (IVM), spermanın fertilizasyon için hazırlanması, *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve *in vitro* kültür (IVC) adımlarından oluşmaktadır (9,10).

In vitro kültür, fertilizasyonun ardından oluşan embriyoların morula-blastosist aşamasına kadar gelişmesinin sağlandığı ortamdır (11). Son yıllarda hazır ticari kültür medyumları ve yöntemleri daha çok tercih edilmesine rağmen, konvansiyonel embriyo kültür sistemleri ilk olarak John Biggers tarafından kullanılmıştır. Kültür ortamlarında ilk olarak somatik hücre kökenli Ringer ve Tyrode türevleri basit tuz çözeltileri ve Ham's F10 gibi medyumlar kullanılmıştır. Kullanılan bu kültür medyumlarının embriyo gelişim oranları ve hızları sınırlı kalmıştır (12). *In vitro* kültür, IVF sonrası embriyoların kalitesi ve blastosist gelişimlerinde önemli bir rol oynamaktadır (13,14). Günümüzde IVC'de blastosist aşamasına ulaşan muhtemel zigotların oranı %20 ile 40 arasında değişmektedir (8,15). Bu nedenle IVC'de kullanılan medyumların kimyasal yapısı ve içeriğindeki bileşenler (protein, serum, serum albumini, aminoasitler, büyüme faktörleri, somatik hücrelerden hazırlanmış kokültür katkı maddeleri, vitaminler, antibiyotikler ve antioksidanlar vs.), bazı kimyasal ve çevresel faktörler *in vivo* embriyo üretiminde optimum şartları sağlamak amacıyla oldukça önem arz etmektedir (16,17).

İN VİTRO KÜLTÜRÜ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

In vitro kültürde kullanılan katkı maddelerinin *in vitro* embriyo gelişiminde farklılıklar oluşturduğu bildirilmektedir. *In vitro* kültürde embriyonik gelişimi ve kalite artışını sağlamak amacıyla çevresel ve biyokimyasal parametreler optimum

seviyede tutulmalıdır (10). *In vitro* kültürü etkileyen biyokimyasal parametreler; serum kalitesi, protein ve makro moleküller, enerji kaynakları ve antioksidan maddelerdir. *In vitro* kültürü etkileyen çevresel parametrelerde ise; sıcaklık, pH, ışık, ozmolarite, nem, inkübatör, kullanılan petri kapları, uçucu organikler, personel ve gazlar yer almaktadır (18).

İN VİTRO KÜLTÜRÜ ETKİLEYEN BİYOKİMYASAL FAKTÖRLER

Kültürde, serumun kalitesine ve elde edilme zamanına göre; fetal buzağı serumu (FCS), yeni doğan buzağı serumu (NCS), östrustaki inek serumu (ECS) gibi farklı serumlar kullanılmaktadır. Serumun hangi yaştaki hayvandan elde edildiği önemlidir. Yeni doğan buzağı serumu ile yetişkin sığır serumları karşılaştırıldığında, NCS'nin IVC'de morula-blastosist elde etme oranının ECS'e göre daha üstün olduğu belirtilmektedir (19). Ayrıca yetişkin sığır serumunda protein oranı %85 iken immünoglobulin konsantrasyonu FCS'de daha fazladır (20). *In vitro* kültürde nadir olarak at ve domuz gibi hayvan türlerinden elde edilen serumlar da kullanılmaktadır. *In vitro* kültürde en yaygın kullan serum ise FCS'dir (21). *In vitro* kültürde maternal ve fetal serum bileşikleri protein ve makro molekül kaynağı olarak kullanılmaktadır. Kültür vasatına eklenen FCS morula ve blastosist aşamasında indükleyici etkiye sahiptir (22,23). Kültür vasatlarında protein ilavesi olarak FCS ve inek serum albumini (BSA) enerji kaynağı olarak da eklenmektedir. Yapılan çalışmalar; kültürün 7. gününde FCS, BSA ve insülin ilavesinin geç morula/erken blastosist oranını artırdığını bildirilmektedir (24,25). *In vitro* embriyo kültüründe makro moleküllerin varlığı, gamet ve embriyoların manipülasyonunu kolaylaştırmaktadır (26). Bununla birlikte, embriyonun preimplantasyon döneminde kan proteinlerinin kullanımı, kontaminasyon ve enfeksiyon risklerini artırdığı bildirilmektedir (27).

Embriyonik gelişimin düzenlenmesinde en önemli protein kaynağı aminoasitlerdir. Ovidukt sıvısında en çok bulunan protein IgG'dir (immünglobülin G). Erken embriyonik dönemde plasenta oluşumuna katılan trofoblast hücreleri, nonesansiyel aminoasitleri ve glutamini kullanır. Preimplantasyon dönemde (8 hücreli) esansiyel aminoasitlerin kullanılması fetal gelişim olasılığını artırmaktadır (28). Aminoasitler, IVF sonrası sığır embriyolarının gelişimini etkiler ve blastosist aşamasında toplam hücre sayısını artırır (29). *In vitro* kültürde protein kaynağı olarak kullanılan BSA'nın birçok faydası bulunmaktadır. İnek serum albumin, embriyoyu ağır metaller gibi toksik maddelerde karşı korumaktadır. Ayrıca BSA, büyüme faktörleri gibi bazı hormonları içerir. Bunun yanında BSA vasatın yüzey gerilimini azaltarak embriyoların pipet, tüp veya petriye yapışmasını engellemektedir. Embriyonik gelişim amacıyla sıklıkla kullanılan BSA'nın avantajları yanında önemli dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajlardan bazıları mitokondrial bozukluklar, fazla miktarda laktat üretimi, hücre içi kütlede istenmeyen oluşumlar, apoptotik hücrelerde artıştır. Ayrıca protein sentezinde, hücre bağlantı sayılarında, trofoblast hücreleri ve iç hücre kitlesi (ICM) oranında azalmalar görüldüğü belirtilmektedir (30). Somatik hücreler IVEP'de varyasyon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, IVC'de kullanılan somatik hücreler, inek viral diyaresi-mukozal hastalığı (BVD-MD) gibi viral kontaminasyona karşı da hassastır. Sığır Herpes Virüs-1 (BHV-1)

embriyonik hücrelerde viral replikasyon yapmasa bile embriyo gelişimini ve *in vitro* kültür ortamlarını etkileyebilmektedir (31,32).

In vitro embriyo kültüründe kullanılan enerji kaynakları genellikle laktat, piruvat ve glikozdur. Zigot, erken embriyonik dönemde birincil enerji kaynağı olarak piruvatı tercih ederken, sekiz hücreli aşamada glikoz kullanılmaktadır (33). Pentoz fosfat yolu (PPP) tarafından metabolize edilen glikoz, nükleik asit sentezi için gerekli olan riboz parçalarını üretir. Erken embriyonik dönemde glikoz kullanılmamasının nedeni fosfofruktokinaz (PFK-1) enzim aktivitesinin olmamasıdır. Ayrıca fetal serumdaki glikoz konsantrasyonunun erişkin bir sığırdan 6 kat fazla olduğu bilinmektedir. Koyun ve sığırların aksine, özellikle erken embriyonik dönemde (4. güne kadar) manda embriyolarının *in vitro* kültürü için glikoz varlığının gerekli olduğu ortaya konmuştur (34).

In vivo şartlarda embriyonun kendisinde ve uterusu bulunan antioksidan sistemler embriyoyu koruma altına alınmaktadır. Bu antioksidan sistemler, glutatyon, taurine, hipotaurin, askorbat, piruvat, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), E ve C vitaminleridir (35). Fakat *in vitro* şartlarda gelişen embriyolar kendi içerdiği antioksidan sistemleri dışında oksidatif strese karşı koruyucu başka bir mekanizmaya sahip olmadıkları için, *in vitro* embriyo üretiminde oksidatif stresin kontrol ve koruma altına alınması gerekmektedir. Bu amaçla IVEP aşamalarında (IVM, IVF) özellikle de *in vitro* kültür medyumlarına, antioksidan enzimler (SOD, CAT vb.), metal şelatörler (EDTA vb.), tiol bileşikler (glutatyon, sisteamin vb.), proteinler ve vitaminler eklenmektedir (36). Glutatyon (GSH) ve sistein hücre içi fonksiyonlarının (DNA, protein sentezi) korunmasında ve reaktif türlerin zararlı etkilerine karşı önemli etkinliğe sahiptir (37). Embriyo gelişiminin ilk fazında istenilen etkinin sağlanması için olgunlaşma ortamına antioksidan maddelerin eklenmesinin kritik bir nokta olduğu bilinmektedir (38). Sentetik ovidukt sıvısı (SOF) ilave edilen dithioerythritolün (DTE) (50 µM) bölünmüş embriyo oranına önemli katkı sağladığı bildirilmektedir (39). Glutatyon domuz, hamster, koyun, sığır ve fare dahil olmak üzere çeşitli türlerde oosit olgunlaşması sırasında sentezlenir. Glutatyon sentezi, sisteinin varlığına bağlıdır ve hücre içi sistein seviyeleri hız sınırlayıcı bir faktör olarak embriyo gelişimini etkileyebilir (40,41). Yapılan bazı çalışmalar mandaların oosit olgunlaşması sırasında ortama sisteamin eklenmesi ile sitoplazmik glutatyon içeriğinin ve bunu takiben embriyo gelişiminin arttırdığını bildirilmiştir (41). Fare embriyolarında yapılan IVC sırasında C ve E vitaminlerinin ortama eklenmesinin oksidatif hasarı azalttığı ve blastosist gelişim oranlarını iyileştirdiği bildirilmiştir (42). Antioksidan olarak C ve E vitaminlerinin kombinasyonu, lipid peroksidasyonunun önlenmesinde oldukça önemlidir. Bu nedenle farklı kültür medyumlarına katılan antioksidanlar ile ilgili başka çalışmaların yapılması gerektiği ve kültür ortamlarında etkili antioksidanların ve dozlarının saptanmasıyla kültür medyumlarının iyileştirilebileceği bildirilmektedir (30).

İN VİTRO KÜLTÜRÜ ETKİLEYEN ÇEVRESEL FAKTÖRLER

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sığır embriyolarının *in vitro* üretimi önemli ölçüde geliştirilmiştir. Ancak, yapılan çalışmalarda hala IVEP başarısı *in vivo* üretilen embriyolardan daha düşüktür. Çünkü *in vitro* üretimde embriyoların birçok mikro

ortama uyum sağlaması gerekir. Fakat *in vitro* embriyo üretiminde bulunan sıvıların taklit edilmesi ve ortamların stabilizasyonunda hala sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle, embriyoların üretilmesi sırasında ortam stabilizasyonu büyük önem arz etmektedir (43). Sığır embriyolarının üretiminde IVC en son adımı oluşturmaktadır. *In vitro* kültür muhtemel zigot oluşumunu takiben yaklaşık 6-9 günlük kültür süresini içermektedir. Sığır embriyolarında en yaygın kullanılan vasatları SOF'lar oluşturmaktadır. Sentetik ovidukt sıvıları IVEP sisteminin temel yapı taşlarını oluşturmaktadır. Kültür süresince embriyolar tek bir vasat sistemi veya vasat formülasyon kombinasyonlarının oluşturulması ve değiştirilmesi ile oluşturulan sıralı sistemlerde geliştirilebilmektedir. Oluşturulan sıralı sistemler embriyonun oviduktan uterusu doğru ilerlemesi sırasında bulunduğu fizyolojik ortamların taklit edilmesi ile oluşturmaktadır. Ancak, oluşturulan tüm vasatların başarısı bazı çevresel faktörler nedeniyle laboratuvar ortamından laboratuvara bile değişkenlik gösterebilmektedir (44,45). *In vitro* kültür koşulları son yıllarda, esas olarak ortam formülasyonlarının ayarlanmasıyla geliştirilmiştir. Bununla birlikte, çoğu kültür sisteminde %30'un üzerinde blastosist oluşumu sağlanabildiği, ancak her zaman aynı başarıya ulaşamadığı bildirilmektedir. Bu durumun en önemli nedenleri arasında; serum takviyesinin embriyo/fetal gelişim için zararlı olması, anormal derecede embriyonik ve fetal büyüme şekillenmesi ve değişmiş gen modelleri yer almaktadır. Bununla birlikte, farklı embriyo kültürü ortamlarının ve yöntemlerinin varlığı, embriyo kültür ortamının en uygun bileşenlerini tanımlamayı çok zor hale getirmektedir (46,47).

In vitro embriyo üretiminde başarıyı IVC'deki iyileştirmeler haricinde tüm IVEP sisteminin başarısı ayrı ayrı etkilenmektedir. Ayrıca, kültür ortamı birçok çevresel faktörden etkilenmektedir. Bu çevresel faktörler arasında; laboratuvar ortamı (ısı, ışık, osmolarite, nem), inkübasyon koşulları ve inkübatör etkenleri, uçucu organikler, gaz fazı, kültür ortamı, yağ kaplaması, tercih edilen plastik materyaller ve sterilizasyon şekilleri ve embriyo yoğunluğu yer almaktadır. Ayrıca, bunlara ek olarak IVEP adımlarının tüm sürecine dahil olan personelin becerisi de başarıyı etkileyebilmektedir (48-50).

Mineral Yağlar

In vitro kültür sistemlerinde yağ kaplaması, ortam osmolaritesinde ve sıcaklıkta dalgalanmalara neden olabilecek buharlaşmaları önlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, kullanılan mineral yağların lipofilik toksik maddelerin birikimini azalttığı da bildirilmektedir. Günümüzde genellikle tercih edilen nemlendirme sistemi mevcut olmayan tezgâh üstü inkübatörler için, mineral yağ kullanımı gereklidir. Ancak, nemlendirme sistemi mevcut ve yeterli hacimde kültür medyumunu kullanan sistemler var ise açık kültür veya yağ kaplaması olmayan kültür teknikleri kullanılabilir. *In vitro* kültür, *in vitro* embriyo üretiminin en uzun adımı olması nedeniyle bu süreçte kullanılan mineral yağlar büyük önem arz etmektedir (51). *In vitro* kültür sistemlerinde tercih edilen mineral yağların avantajlarına rağmen sığır, domuz, insan, koyun ve farede yapılan çalışmalarda, embriyo gelişiminde olumsuz etkilerinin de olabileceği bildirilmiştir. Mineral yağların en büyük olumsuzluğunun çözünabilir maddeleri emme potansiyellerinden kaynaklı olduğu bildirilmektedir. Özellikle mineral yağlar kültür ortamındaki steroid hormonları (östrojen

ve progesteron) absorbe ederek ortamdaki biyoyararlanımlarını azaltabilmektedir. *In vitro* kültürde tercih edilen yağın kimyasal özelliğine göre absorpsiyon yetenekleri farklılık gösterebilmektedir (52). Mineral yağların, reaktif çift bağlı karbonların oksidasyonu ile üretilen peroksitlerin, özellikle mikro damlacık kültüründe deoksiribonükleik asitin (DNA) parçalanmasına neden olduğu bilinmektedir. Bu durum, embriyo gelişiminde dejenerasyona neden olmaktadır. Ayrıca yağların yüksek oranda kültür vasatına temas yüzeyinin olması, oluşabilecek dejenerasyonun artmasına ve kültür ortamının kirlenmesine neden olur. Oluşan dejenerasyon kullanılan yağın türüne, konsantrasyonuna ve hücrelerin maruz kalma süresine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Sonuç olarak, bu durum elde edilen blastosist oranını düşürmektedir (52,53). Son zamanlarda mineral yağların zararlarını azaltmak için bazı teknikler kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri, mineral yağı yıkayarak hacmini küçültmek veya çok miktarda kültür vasatı kullanarak mineral yağın embriyo üzerindeki toksik etkisini azaltmaktır. Mineral yağları yıkamak için %0.9'luk fizyolojik tuzlu su veya sentetik insan tüp sıvısı (HTF) kullanılabilir (52). Mineral yağın olumsuz etkisini azaltmak için bir diğer seçenek de yağsız kültür sistemlerini kullanmaktır. Bu yöntemde ortam su ile çevrelenerek ozmolaritesi stabilize edilebilmektedir. İnek ve domuzlarda yapılan bazı çalışmalar mevcut olmasına rağmen, ineklerde yağsız kültür sistemlerinin kullanımı sonrası embriyo gelişiminde önemli oranda düşüşler meydana gelmiştir (54). Bununla birlikte, mineral yağlardan dolayı oluşabilecek embriyo toksisitesini önlemek için yağlar uygun koşullarda saklanmalıdır. Mümkün olduğunca mineral yağların depolama süresince ısı ve ultraviyole (UV) oksidasyonunu sınırlamak gereklidir. Bu nedenle serin (+4°C'de) ve karanlık bir ortamda muhafazası önerilir. Ayrıca, mineral yağların peroksidasyonunu önlemek için en uygun saklama materyalinin cam şişeler olduğu bildirilmektedir. Embriyo sayısı ve kalitesini artırmak için laboratuvarlarda mineral yağların kullanımı öncesi biyoanaliz testlerinin yapılması önerilmektedir (52).

İnkübatör

In vitro embriyo üretimi yapılan laboratuvarların en önemli ekipmanları inkübatörlerdir. İnkübatörlerin seçimi ve yönetimi, kültür sistemlerinin optimizasyonu için oldukça önemlidir. İnkübatörler, embriyo kültür ortamlarında gaz ve sıvıların seviyelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, inkübatörler ortam sıcaklığını doğrudan düzenler ve embriyoların maruz kaldığı pH'yı dengeler. Mevcut çalışmalarda periyodik olarak inkübatörler açılarak maturasyon, fertilizasyon ve embriyoların kültür aşamasındaki gelişimleri (morfolojisi, büyümesi, kalitesi) takip edilir. Bu işlemler sırasında inkübatörlerin kapaklarının açılarak inkübatör içi gaz ortamının değişimini sağlayarak, gaz ve sıcaklığın ayarlanmasına yardımcı olur. Klasik olarak *in vitro* fertilizasyon veya biyoteknoloji laboratuvarlarında geniş hacim skalasında (50-500 L) inkübatörler kullanılmaktadır. Ancak, *in vitro* fertilizasyon laboratuvarlarında 0.01-1 mL arasında olacak şekilde mikro droplar şeklinde çalışmalar yapıldığı bilinir. Bu durum inkübatörler hakkında bazı soruları akıllara getirmektedir. Örneğin; "inkübatör hacminin büyük olması gerekli mi?", "inkübatör hacminin gaz üzerine etkisi var mı?", "kapağın açılıp kapanması sonrası ısı ve gaz seviyelerinin geri dönüşüm süresini etkiler mi?", "gaz ve ısıнын geri dönüşüm süresi embriyo

gelişimini olumsuz etkiler mi?" Bu soruların cevabına istinaden özellikle insan IVF laboratuvarlarında minimalist kabin (benchtop, small box type) şeklinde inkübatörler kullanılmaktadır. Ancak, yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında inkübatörlerin embriyo gelişimi üzerinde etkilerinin farkı net olarak ortaya konulamamıştır (55). Bugüne kadar, üstün bir inkübatör tipi konusunda net bir fikir birliğine varılamamıştır. Çünkü etkinlik ve çevresel kararlılık büyük ölçüde inkübatör kullanımına ve yönetimine bağlıdır. Laboratuvarlarda inkübatör kapaklarının sürekli açılıp kapanmalarını önlemek için yeterli sayıda inkübatör olması önerilir. İnsan ve farelerde yapılan çalışmalarda inkübatör kapağının çok sık açılması önleildiğinde elde edilen blastosist oranlarının arttığı bildirilmektedir (56). Günümüzün optimal kültür sistemi, inkübatör içinde düşük oksijen kullanımını gerektirir. Çok sayıda hayvan çalışması, fare, kedi, koyun, domuz, inek ve sıçan dahil olmak üzere, atmosferik seviyelere kıyasla azaltılmış oksijen konsantrasyonları kullanmanın faydalı olduğunu göstermiştir (57).

Uçucu Organikler (Volatile Organics-VOCS)

İnkübatörlerin bulunduğu ortamın atmosfer kalitesinin de embriyo kültür sistemlerinde başarıyı etkilediği bildirilmektedir. *In vitro* fertilizasyon laboratuvarlarının havasında aldehitler, benzen, toluen veya etanol gibi uçucu organik bileşiklerin (volatile organic compounds-VOCS) varlığının, kültür ortamındaki embriyoları tehlikeye atabileceği bildirilmektedir. Uçucu organik bileşikler embriyo toksisitesine neden olabilir. Laboratuvarlarda kötü hava kalitesinin olumsuz etkilerinden kaçınmak gereklidir. Toksik maddelerin laboratuvara, inkübatöre ve kültür ortamına olan olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak veya minimize etmek gereklidir. Bu nedenle laboratuvarlar tasarlanırken VOC'ları azaltacak şekilde plan yapılmalıdır. Uçucu organik bileşiklerinin normal atmosferik koşullar altında buharlaşabilen temel olarak insan yapımı kimyasallar olduğu bilinir ve yaygın kaynakları inşaat malzemeleri, ahşap mobilyalar, boyalar, yapıştırıcılar, motorlu taşıt emisyonları ve temizlik ürünleridir. Özellikle laboratuvarlarda kokusuz özel boyaların kullanılması tavsiye edilirken dolgu macunları ile toksik yapıştırıcılardan da kaçınılması önerilmektedir. Ayrıca VOC'ların preimplantasyon öncesi embriyoların gelişimi üzerine de zararlı etkileri olduğu bilinir. Laboratuvarlarda pozitif basınçlı hava akışı ile hava temizleme sistemlerinin ve inkübatörler için uygun in-line filtrelerin kullanılması, hava kaynaklı kirlenmelerin seviyesini en aza indirmeye ve sonuçları iyileştirmeye yardımcı olacaktır (58,59). Uçucu organik bileşikler laboratuvar içindeki bazı sarf malzemeler gibi (ambalajlar dahil) çeşitli kaynaklardan yayılabilir. Bu amaçla laboratuvarlarda gaz çıkarma süresini belirlemek için bir VOC ölçeği kullanılmalıdır. Ayrıca, laboratuvar personeli de parfüm, deodorant ve sigara kullanımı gibi durumlarda VOC'lara neden olabilir (60).

Kültür Kapları (Petri)ler

Embriyo kültürü için yeni mikro veya nano hacimli kültür petripleri geliştirilmekte ve bunların mikro ortamı optimize etmek için kullanılması önerilmektedir. Ayrıca bu petri kapları bireysel embriyo geliştirilmesine, embriyonun metaboliklerinin takibine, genetik analizine ve embriyo izleme çalışmalarına olanak sağlar. Ayrıca, bu petripler bireysel embriyo

kültürünü geliştirebilir veya embriyonun hızlandırılmış görüntüleme veya genetik teşhis için izleme çalışmalarında kullanılabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, well-of-well (WOW) petri kullanılarak mikro volüm ortamları oluşturma yaklaşımının, daha büyük hacimli kültür petri kaplarına kıyasla embriyo gelişimi için daha iyi olabileceğini göstermektedir. Bu WOW petri kullanımında embriyoları tek tek barındırmak için mikro kuyucuklar kullanılabilen ve aynı zamanda tüm embriyolar ortak bir ortamı paylaşarak birbirine yakın bir yerde bulunmaktadır (61). Kültür sistemlerinin optimize edilebilmesi için kullanılan petrilerin non-toksik olması önerilir. Bu nedenle laboratuvarlarda kullanılan petrilerin kalite kontrollerinin yapılması gereklidir. Kalite değerlendirilmesi yapılan petrilerin steril olarak paketlenerek kullanımına kadar saklanması istenir. Genellikle malzemelerin kullanımı öncesi firmaların vermiş olduğu kodlar ile kalitesi kontrol edilebilmektedir. Firmalar petrileri genellikle "önceden test edilmiş" olarak satmaktadır. Ancak bu üreticilerin biyo-analizleri, her laboratuvarın bireysel duyarlılık kriterlerini karşılamayabilir. Ayrıca, uygun olmayan saklama koşulları petrilerin toksik hale gelmesine yardımcı olabilir. Bu nedenle kültür sistemleri için kullanılacak olan petrilerin muhafazasına dikkat edilmelidir (62).

pH

Bu parametre doğrudan laboratuvarlar tarafından kontrol edildiğinden ve laboratuvarlar arasında önemli ölçüde değiştiğinden, kültür ortamının pH'sı özel bir öneme sahiptir. Ortam pH'sı öncelikle ortamın kendisindeki bikarbonat (HCO_3) konsantrasyonu ve kültür inkübatörünün karbondioksit (CO_2) konsantrasyonu tarafından belirlenir. Ancak laboratuvarın bulunduğu yükseklik (konum olarak), protein takviyesi ve kullanılan farklı vasat türleri gibi faktörlerin tümü pH'yı etkiler. Ayrıca, tek inkübatör kullanımı CO_2 'nin tüm alanda kullanılmasını engelleyebilir. Bu nedenle, bu parametre her bir kullanıcı tarafından kendi laboratuvarının özel koşullarına göre ölçülmeli ve ayarlanmalıdır (63,64). Embriyolar farklı ortam pH'sında gelişebilse de iç pH değişimlerinin embriyo gelişimini, metabolizmasını ve hatta fetal büyümeyi etkileyebileceği bilinmektedir. Bununla birlikte pH'yı tek başına izole etmek zordur. Bikarbonat ve CO_2 değerlerindeki değişiklikler pH'yı çok hızlı etkilemektedir (55,64). Kültür ortamlarında pH değişimlerini izlemek için fenol kırmızısı sık kullanılan bir kimyasaldır. Ancak bazı çalışmalar fenol kırmızısından kaynaklı eseri miktar östrojenik etkinin ortamı değiştirebileceğini bildirmektedir. Ayrıca fenol kırmızısı kullanımının ışığa maruz kalması ardından reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açabileceği öne sürülmüştür. Ancak, ROS oluşumu modern insan embriyo kültür ortamı kullanılan koşullar altında görülmemiştir. Bu nedenle, fenol kırmızısının olumsuz bir etki yarattığı sonucuna net olarak varılamaz ve görsel bir pH indikatörünün belirli bir laboratuvar için yararlı olması durumunda, seçilen bir ticari preparatın laboratuvar ortamda kullanımı önerilebilir (55). En önemli kültür parametrelerinden biri kültür ortamının dış pH'sıdır (pHe). Çıplak oositler, iç pH'yı (pHi) 7.1'de tutma yeteneğine sahip değildir veya sınırlıdır. Bu nedenle, pHe'nin 7.2 ile 7.3 arasında bir pHi değerinde kalibre edilmesi gerekir. Morula ve blastosist aşamalarındaki embriyoların, erken bölünme aşamasındaki embriyo ve oositlere göre pHi'lerini stabilize etme olasılığı daha yüksektir. Bu aşamalarındaki embriyolarda protonların

hücrelerden dışarı atılmasıyla veya hücre zarında bulunan spesifik taşıma sistemleri aracılığıyla HCO_3 'ın alınması ile sitozollerinin tamponlanması sağlanabilir. Yağsız bir kültür petri kabı inkübatörden çıkarılır ve gazsız bir atmosfere maruz kalırsa, pH'nın kısa bir sürede yükseldiğini bildirilmektedir. Embriyoların inkübasyonu sırasında sıcaklık veya CO_2 konsantrasyonunda yaşanan değişiklikler, kültür ortamının pH'sını etkileyerek embriyo gelişimini olumsuz etkiler (65,66). Hücrelerde hem ROS hem de nitrik oksit (NO) üretiminin artması, mitokondrideki pH gradyanı üzerindeki değişikliklerle belirlenir. Bu nedenle, pH özellikle hücresel mitokondride solunumun başka bir işletim sistemi uyarıcısı olarak kabul edilmiştir. İnsanlarda oosit ve embriyo gelişim sırasında pH'da değişiklikler olduğu ve bu değerlerin oositlerde 6.98-7.03, embriyolarda ise 7.12 civarında olduğu bildirilmektedir. Bunun yanısıra kullanılan medyumlarındaki ortalama pH değeri olan 7.2-7.3'ün oosit ve embriyo gelişimi için uygunluğu hala tartışılmaktadır (66).

Ozmolarite

Ozmolarite, embriyo gelişimini önemli ölçüde etkileyebilen kültür ortamının bir bileşenidir. Yüksek ozmolaritenin embriyo gelişimini durdurabileceği bildirilmektedir. Kültür vasatlarındaki buharlaşmayı etkileyen faktörler, ortam ozmolaritesini de değiştirir. Ozmolaritenin embriyo gelişimi üzerindeki etkisi, temel amino asitler gibidir. Ozmolarite bileşenleri ozmolit görevi görebildiği ve hücrelerin hacim düzenlemesine yardımcı olduğu için, ortam bileşimine bağlıdır. Ozmolarite ticari vasat üreticileri tarafından belirlense de laboratuvarlardaki koşullar ozmolariteyi değiştirebilir ve dolayısıyla embriyo gelişimini etkileyebilir. Kültür vasatlarındaki buharlaşmayı etkileyen faktörler, ortam ozmolaritesinin de değişimine neden olabilir. Ozmolarite değişimlerine; zaman, kullanılan vasat miktarı, hava akışı, nem, mineral yağların kullanımı ve sıcaklık farklılıkları gibi faktörler neden olabilir. Bu nedenle kültür vasatları hazırlanırken titiz olunmalı ve inkübatör içerisindeki buharlaşmalar da göz önünde bulundurulmalıdır. *In vitro* kültür ortamlarında istenilen optimum ozmolaritenin 240-308 mOsm olduğu bildirilmektedir (55).

Nem

Inkübatörlerin nemlendirilmesi, IVEP başarısı için oldukça önemlidir ve embriyo kültürünün ozmolaritesini etkileyebilmektedir. Nem eksikliğinden dolayı oluşan hipertonic ortamda; ROS miktarı artmakta, hücre büyümeye gözlenmemekte, DNA veya mitokondriyal hasar oluşmakta, hücre döngüsü ve apoptozis durmaktadır. Tüm bu olaylar embriyo gelişimini olumsuz etkilemektedir. *In vitro* embriyo üretimi çalışmalarının sonuçlarında; nemli kültür koşulları (285-290 mOsm) ile kuru kültür (308 mOsm) koşulları karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçlarının nemli ortamda önemli oranda yüksek olduğunu belirlendi (67,68).

Işık

Işığın, kültür ortamının yağ peroksidasyonuna ve foto-oksidasyonuna neden olarak doğrudan veya dolaylı olarak embriyo gelişimine olumsuz etkileri olduğu kanıtlanmıştır. Hams-terlarda ve insanlarda yapılan çalışmalar, gözle görülebilir ışığın embriyolar üzerinde toksik etki oluşturduğu ve bu durumun artan ROS oluşumundan kaynaklandığını bildirmektedir.

dir. Aslında, belirli dalga boylarında elektron taşıma zincirlerinin enzimleri tarafından emildiği ve bunun da ROS üretimini artmasına neden olduğu bildirilmektedir. Bu etkinin, mavi spektrumdaki radyasyonu ekarte edebilen özel filtreler kullanılarak azaltılabileceği bildirilmektedir. Ortamlardaki ROS miktarı artmadan önce bir hücrenin ne kadar süre ışığa maruz kalması gerektiği bilinmemekle birlikte bu sürenin 5 dakikayı geçmemesi istenmektedir (68,69). Ayrıca, mikroskoplarda kullanılan ışık kaynaklarındaki kısa (320-400 nm) ve uzun (400-750 nm) dalga boylarının kromozomal hasar ve mutasyona neden olabileceği bildirilmektedir. *In vitro* kültür ortamlarında istenilen optimum ışık dalga boyu uzunluğu olarak 475-500 nm tavsiye edilmektedir (68).

Gaz Bileşenleri

In vitro embriyo üretiminde farklı memeli türlerinde ovidukt ve uteruslarındaki oksijen seviyeleri değerlendirildiğinde oksijen konsantrasyonunun %2-8 olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *in vitro* embriyo kültürü için fizyolojik oksijenin (%5) yüksek konsantrasyondaki oksijen (%20) seviyelerine göre daha başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Ayrıca hayvanlarda oksijen seviyeleri %5, %10, %15 ve %20 olarak yapılan çalışmalarda sıralı olarak blastosist elde etme oranlarının azaldığı ve oksijen artışı ile orantılı olarak embriyolarda bloklanma (8-16 hücre) gözlemlendiği bildirilmektedir. Buna ek olarak yüksek konsantrasyonlu O₂ varlığında embriyoların gelişiminin de geciktiği fark edilmiştir. Bunun sebebi olarak yüksek oksidatif stresi artırdığı ve bölünmeler sırasında kümülatif etki yaparak embriyo bölünmelerini blokladığı düşünülmektedir. Bu nedenle *in vitro* kültür sırasında %5O₂, %5CO₂ ve %90N₂ gaz karışımı standart olarak kabul edilmiştir (48).

Sıcaklık

In vitro fertilizasyon laboratuvarlarında, CO₂ inkübatörlerinin sıcaklığı *in vivo* koşulları taklit etmek için 37°C'ye ayarlanmaktadır. Bununla birlikte, inkübatörlerin dış ekranından her zaman sıcaklığın doğruluğu kontrol edilemeyebilir. Genellikle tezgâh üzerinde kullanımı tercih edilen inkübatörlerde yaklaşık $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 'lik iç sıcaklık değişimleri görülebilmektedir. Bu nedenle iç sıcaklığın doğrudan embriyo kültür ortamında ölçülmesi tavsiye edilir. Ayrıca yüksek sıcaklıklar embriyolarda ısı stresine neden olabilir ve ROS'u artırabilir. Bununla birlikte, olarak ani sıcaklık değişimleri mitokondriyal işlevde ve nükleoit yapılarında bozulmalara, hücre modifikasyonu ve kromatinlerde çökelmelere neden olabilmektedir. Ancak sığır embriyolarının diğer türlere göre sıcaklığa daha dayanıklı olduğu da bildirilmektedir. Buna rağmen taşıma sırasında sıcaklığı stabilize etmek için, manipülasyonların ve çevresel koşulların kültür ortamının ısı kaybını nasıl etkileyebileceğini dikkate almak önemlidir (66).

In vitro embriyo üretiminde tüm bu koşulların yanı sıra laboratuvar personelinin tecrübesi ve manipülasyonlarının da başarıyı etkilen faktörler arasında yer aldığı unutulmamalıdır (48).

SONUÇ

Sonuç olarak, IVEP'te başarıyı artırabilmek için IVF laboratuvarlarında ortamın optimize edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle IVEP'in en önemli basamaklarından biri olan *in vitro* kültür sürecinde, başarıyı etkileyebilecek çevresel faktörler (mineral yağlar, inkübatör, VOCs, petrilere, pH, ozmolarite, nem, ışık, gaz bileşenleri ve sıcaklık) göz ardı edilmemelidir.

FİNANSAL BEYAN

Derlemenin oluşturulmasında herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

YAZAR KATKILARI

FS; yazım, gözden geçirme ve düzenleme, **AS;** yazım ve taslak oluşturma, **YED;** yazım ve taslak oluşturma.

KAYNAKLAR

1. Seidel GE (2007). New technologies for reproduction in cattle. In: Proceedings, applied reproductive strategies in beef cattle, Billings, Montana.
2. Gadisa M, Furgasa W, Duguma M (2019). Review on embryo transfer and It's application in animal production. *AJMS*, 1(1):4-12.
3. Alkan H, Tekindal MA, Demirel MA et al. (2024). Effect of strategies to increase progesterone levels on fertility of bovine embryo transfer recipients-A meta-analysis. *Theriogenology*, 215:177-186.
4. Günlü A, İmİK H, Tekerli M (2001). Afyon ili süt sığırcılık işletmelerinin genel özellikleri ile karlılık ve verimlilik analizleri. *Lalahan Hay Araş Enst Derg.*, 41(1):1-12.
5. Madan ML (2005). Hayvan biyoteknolojisi: gelişmekte olan ülkelerdeki uygulamalar ve ekonomik çıkarımlar. *Rev Sci Tech Int Epiz.*, 24-1:127-139.
6. Bülbül B, Dursun Ş, Kırbaş M et al. (2010). Düvelerde embriyo transferi öncesi flunixin meglumin uygulamasının gebelik oranı üzerine etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 16(1):105-109.
7. Abdoon ASS (2005). Factors affecting In vitro production of bovine embryos. Erişim adresi: <http://esarf2.tripod.com/abdoon.html>. Erişim tarihi: 12.05.2023.
8. Viana J (2019). Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 36(4):17.
9. Saleh WM (2017). Assessment of different methods of bovine oocytes collection, maturation and Invitro fertilization of abattoir specimens. *Iraqi J Vet Sci.*, 31(1):55-65.
10. Satılmış F (2019). The effects of different antioxidants (pentoxifylline and boric acid) on embryo development and quality supplement in vitro bovine embryo culture mediums. Ph.D. Thesis, Selçuk University Health Sciences Institute, Konya.
11. Gordon I (2003). Laboratory production of cattle embryos, Vol. 27. Cabi.
12. Pool TB, Atiee SH, Martin JE (1998). Oocyte and embryo culture: basic concepts and recent advances. *Infertil Reprod Med Clin N Am.*, 9:181-204.
13. Feugang JM, Camargo-Rodríguez O, Memili E (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livest Sci.*, 121(2-3):141-149.
14. Blanco MR, Demyda S, Moreno Millán M et al. (2011). Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review. *Biotechnol Mol Biol Rev.*, 6(7):155-165.
15. Rizoş D, Ward F, Duffy PAT et al. (2002). Con sequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev.*, 61(2):234-248.
16. Krisher RL, Lane M, Bavister BD (1999). Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultures in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod.*, 60:1345-1352.

17. Lonergan P, Fair T, Corcoran D et al. (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 65:137-152.
18. Wrenzycki C (2018). In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? *Ani Reprod.*, 13(3):279-282.
19. Akyol N, Sulu N (2005). Östrustaki inek serumu ve fetal buzağı serumunun in vitro embriyo elde edilmesine etkisi. *Lalahan Hay Araş Enst Derg.*, 45(1):1-8.
20. Piletz JE, Drivon J, Eisenga J et al. (2018). Human cells grown with or without substitutes for fetal bovine serum. *Cell Medicine*, 10:1-11.
21. Verma A, Verma M, Singh A (2020). Animal tissue culture principles and applications. In: *Anim Biotechnol.*, 269–293.
22. Bavister BD (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update.*, 1:91-148.
23. Camargo LSA, Sá WF, Ferreira AM et al. (2002). Taurina no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro. *Arq Bras Med Vet Zoot.*, 54:396-404.
24. Chauhan MS, Palta P, Das SK et al. (1997). Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: Effects on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro. *Theriogenology*, 48:461-469.
25. Chauhan MS, Singla SK, Palta P (1998). In vitro maturation and fertilization, and subsequent development of buffalo (*Bubalus Bubalis*) embryos: effects of oocytes quality and type of serum. *Reprod Fertil Dev.*, 10:173-177.
26. Gardner DK (2008). Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod Fertil Dev.*, 20, 9-18.
27. Gruber I, Klein M (2011). Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist? *J Turkish German Gynecological Assoc.*, 12(2):110-117.
28. Lane M, Gardner DK (1994). Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *Reprod.*, 102(2):305-312.
29. Keskindepe L (1995). Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biol Reprod.*, 52(6):1410-1417.
30. Pujol M, López-Béjar M, Paramio MT (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61(4):735-744.
31. Vanroose G, Van Soom A, de Kruijff A (2001). From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. *Reprod Domest Anim.*, 36:25-28.
32. Waldrop JG, Stringfellow DA, Riddell KP et al. (2004). Different strains of noncytotoxic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vary in their affinity for in vivo-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 62(1-2):45-55.
33. Leese HJ, Baumann CG, Brison DR et al. (2008). Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod.*, 14:667–672.
34. Monaco E, De Rosa A, Attanasio I et al. (2006). In vitro culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in the presence or absence of glucose. *Reprod Dom Anim.*, 41(4):332.
35. Guerin P (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7(2):175-189.
36. Alkan KK, Satilmis F, Sonmez G et al. (2024). Putrescine Supplementation Improves the Developmental Competence of In Vitro Produced Bovine Embryos. *Theriogenology*, 231(1):133-143.
37. Bucak MN, Satilmis HK (2010). Sığır embriyolarının in vitro gelişiminde kültür medyumlarına katılan antioksidanların etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 16(1):69-74.
38. Raty M, Ketoja E, Pitkänen T et al. (2011). In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. *Cryobiology*, 63(3):245-255.
39. Satilmis F (2022). Bovine In Vitro Embryo Production (IVEP). In: Abbas RZ, Khan A, Liu P and Saleemi MK (eds). *Animal Health Perspectives*, Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan, Vol. I, 187-193.
40. Truong TT, Soh YM, Gardner DK (2016). Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. *Hum Reprod.*, 31(7):1445-1454.
41. Gasparri B, Neglia G, Di Palo R (2000). Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology*, 54(9):1537-1542.
42. Wang X, Falcone T, Attaran M et al. (2002). Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and Sterility*, 78(6):1272–1277.
43. Wrenzycki C, Herrmann D, Keskindepe L et al. (2001). Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod.*, 16:893-890.
44. Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A et al. (2005). Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev.*, 17(2):23-35.
45. Aguila L, Treulen F, Therrien J et al. (2020). Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals*, 10(12):2196.
46. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod.*, 3:15.
47. Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D et al. (2002). Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod.*, 67:767-775.
48. Wale PL, Gardner DK (2016). The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod.*, 22(1):2-22.
49. Baltz JM (2012). Media composition: salts and osmolality. *Methods Mol Biol.*, 912:61-80.
50. Leese HJ (2012). Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reprod.*, 143:417-427.
51. Hughes PM, Morbeck DE, Hudson SB et al. (2010). Peroxides in mineral oil used for in vitro fertilization: defining limits of standard quality control assays. *J Assist Reprod Gen.*, 27(2-3):87-92.
52. Ebrahimi M, Mara L, Parham A et al. (2022). Mineral Oil for in vitro Embryo Production: What We Should Know? *Arch Razi Inst.*, 77(4):1325-1330.
53. Blaschka C, Diers S, Aravina M et al. (2021). Evaluation of a small volume oil-free in vitro production system for bovine embryos. *Vet Med Sci.*, 7(3):868-875.
54. Van Soom A, Mahmoudzadeh AR, Christophe A et al. (2001). Silicone oil used in microdrop culture can affect bovine embryonic development and freezability. *Reprod Domest Anim.*, 36(3-4):169-176.
55. Swain JE (2015). Optimal human embryo culture. In *Seminars in reproductive medicine*, 33(2):103-117.
56. Zhang JQ, Li XL, Peng Y et al. (2010). Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod Biomed Online*, 20(4):510-515.
57. Thomas T (2012). Culture systems: air quality. *Methods Mol Biol.*, 912:313-324.

58. **Merton JS, Vermeulen ZL, Otter T et al. (2007).** Carbon-activated gas filtration during in vitro culture increased pregnancy rate following transfer of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 67(7):1233-1238.
59. **Khoudja RY, Xu Y, Li T et al. (2013).** Better IVF outcomes following improvements in laboratory air quality. *J Assist Reprod Gen.*, 30(1):69-76.
60. **Inamdar A, Moore J, Cohen R et al. (2012).** A model to evaluate the cytotoxicity of the fungal volatile organic compound 1-octen-3-ol in human embryonic stem cells. *Mycopathologia*, 173:13–20.
61. **Smith GD, Takayama S, Swain JE (2012).** Rethinking in vitro embryo culture: new developments in culture platforms and potential to improve assisted reproductive technologies. *Biol Reprod.*, 86(3):62-71.
62. **Wolff HS, Fredrickson JR, Walker DL et al. (2013).** Advances in quality control: mouse embryo morphokinetics are sensitive markers of in vitro stress. *Hum Reprod.*, 28(7):1776-1782.
63. **Lane M, Lyons EA, Bavister BD (2000).** Cryopreservation reduces the ability of hamster 2-cell embryos to regulate intracellular pH. *Hum Reprod.*, 15(2):389-394.
64. **Squirrell JM, Lane M, Bavister BD (2001).** Altering intracellular pH disrupts development and cellular organization in preimplantation hamster embryos. *Biol Reprod.*, 64(6):1845-1854.
65. **Group Cairo Consensus (2020).** There is only one thing that is truly important in an IVF laboratory: Everything' Cairo Consensus Guidelines on IVF Culture Conditions. *Reprod Biomed Online*, 40:33-60.
66. **Agarwal A, Maldonado Rosas I, Anagnostopoulou C et al. (2022).** Oxidative stress and assisted reproduction: a comprehensive review of its pathophysiological role and strategies for optimizing embryo culture environment. *Antioxidants*, 11(3):477.
67. **Armstrong S, Bhide P, Jordan V et al. (2019).** Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 5, Cd011320.
68. **Chi HJ, Park JS, Yoo CS et al. (2020).** Effect of evaporation-induced osmotic changes in culture media in a dry-type incubator on clinical outcomes in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Clin Exp Reprod Med.*, 47:284–292.
69. **Nakayama T, Noda Y, Goto Y et al. (1994).** Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology*, 41:499-510.