

N-acetyl-L-cystein, N-acetyl-L-cystein Amide, Glutathione 및 Cysteamine

항산화제가 소 체외수정란의 발생에 미치는 영향

김민수, 김찬란, 김남태, 전익수, 김성우[†]
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터

The Effects of Antioxidants, N-acetyl-L-cystein, N-acetyl-L-cystein Amide, Glutathione or Cysteamine on the Development of in vitro Fertilized bovine Oocytes

Min-Su Kim, Chan-Lan Kim, Namtea Kim, Ik Soo Jeon and Sung Woo Kim[†]

Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 55717, Korea

ABSTRACT

To increase the productivity of in vitro development, the antioxidants have been used for culture system of bovine oocytes and embryos. However, comparative studies on these molecules are rare and direct beneficial effects on blastocyst production cannot be discriminated for best results. The study was conducted to determine the influence of N-acetyl-L-cysteine (NAC), N-acetyl-L-cysteine amide (NACA), glutathione (GSH) and cysteamime (CYS) on maturation competence of COCs from GV to MII stage and productivity of blastocyst formation during in vitro fertilization and culture. There was no difference among maturation rates of oocytes to metaphase II with polar body with antioxidants for any of the treatment groups ($p>0.05$). However, the significant improvement on the rate of blastocysts ($32.3\pm 5.0\%$) was found in 0.1 mM CYS treatment than 0.3 mM NAC, 0.2 mM NACA or 0.5mM GSH ($p<0.05$). The addition of NAC ($18.8\pm 3.7\%$) or NACA ($21.2\pm 3.9\%$) did not improve development competence to morula and blastocysts than control ($24.4\pm 4.1\%$) and GSH ($26.5\pm 5.0\%$) ($p>0.05$). Our study showed that medium supplementation with CYS during IVM and IVC improved the rate of bovine embryo development but not with NAC, NACA and GSH addition.

(Key words: Antioxidants, Bovine embryo, In vitro development)

서 론

소에 있어서 체외에서 난자를 성숙시켜 수정란을 생산하는 기법은 많은 연구자들의 연구로 확립된 기술이나 아직까지 체외발생능력은 생체 내 수정란의 발생 성적을 따라가지 못하고 있다. 그 원인은 체외에서 수정란을 관찰하기 위하여 사용되는 현미경의 광원, 수정란을 조작하기 위한 미세관에서 발생하는 물리적인 압력, 배양액의 교환에 의한 삼투압 변화 및 온도변화에 따른 충격 등으로 살펴볼수 있다. 이러한 영향은 수정란의 대사과정에서 발생하는 활성화 산소(reactive oxygen species; ROS)에 의하여 지질, 단백질 및 유전자의 변형을 야기한다고 믿어진다.

난자는 glutathione peroxidase(GPx), superoxide dismutase

(SOD) 및 catalase와 같은 여러 가지 항산화 효소를 이용하여 효율적으로 ROS를 제거하고 있다고 판단되며 체외 발생 과정에서는 다양한 원인에 의하여 이러한 기능이 방해 받아 세포 내 손상이 나타나는 것으로 보고되었다 (Goud 등, 2008). 그러므로, 소 난자를 활용하여 수정란의 체외 발생을 위한 연구는 그 효율성을 증가시키기 위하여 배양액에 항산화제나 관련 효소를 처리하여 발생율을 증진시키는 연구가 많이 수행되었다(Liu 등 1995; Iwato 등, 1998; Livingstone 등, 2004; Merton 등, 2013). 특히, 소의 수정란은 체외배양체계에서 비교적 장기간 배양되기 때문에 대사과정에서 항산화 효소의 기능이 떨어질 수 있으므로 대사물질로 이용되는 항산화 물질은 체외 수정란 생산에 있어서 중요하다고 판단된다.

소 수정란 생산에 있어서 체외 배양된 수정란은 형태적으

[†] Correspondence: Sung Woo Kim, Ph.D.
Phone: +82-63-620-3542; Fax: +82-63-620-3591
E-mail: sungwoo@korea.kr

로나 질적으로 체내 수정란과 차이를 보이며 수정란을 대리 모에 이식한 후 수태율과 산자생산율이 체내수정란에 비하여 낮다고 보고되었다(Liu 등, 1995; Iwata 등, 1998; Dieleman 등 2002; Sun 등, 2015). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 소 난자의 성숙배양과 수정란의 발생과정 생산되는 ROS를 효율적으로 조절하기 위하여 항산화물질을 활용할 수 있다. 여기에 주로 사용되는 재료는 황합유기인 thiol기(-SH)를 가진 항산화제를 활용하는데 이러한 물질은 보통 cystein에 포함된 황이 주로 이용된다. 여기에는 아미노산인 cystein을 화학적으로 변화시킨 합성물질로서 NAC, NACA, GSH 및 cysteamine(CYS)이 주를 이루고 있다.

Thiol기를 가진 가장 간단한 물질인 β -mercaptoethanol 또한 이러한 목적으로 사용되고 있으며, 동물세포배양 및 수정란에서 이용되고 있다(Ali 등, 2003). 가장 잘 알려진 생화학 물질은 glutathione(GSH)로 알려져 있으며, 살아 있는 세포는 GPx효소에 의하여 ROS를 환원시키는 과정에 이용되어 환원형(GS-SG)으로 변환된다(de Matos 등, 1997; Boquest 등, 1999; Ufer와 Wang, 2011; Goldstein, 2013; Sun 등, 2015). GSH는 세포 내의 환원력을 저장하는 기능을 가지고 있으나 세포막을 자유롭게 이동하지 못하는 특성을 가지고 있으므로 세포 내의 생합성과 평형 상태를 유지하는 것이 매우 중요하다고 알려져 있다. NAC는 이러한 GSH 생합성과 세포 내 cystein의 농도를 조절할 수 있다고 알려져 있으며 이들은 상호 화학적인 작용을 직접하고 있는 것으로 밝혀졌다(de Matos 등, 1995; Biladeau 등, 2001; Cocco 등, 2005). 화학적으로 볼 때, NAC는 cystein의 합성 전구물질로 GSH생합성에 필요한 물질을 공급할 수 있으며 직접적으로 GS-SG를 산화형 GSH로 변환시키는 생물학적 기전을 가지고 있다(Sun 2010). 특히, NAC는 생쥐의 난자에 있어 노화를 방지하는 것으로 보고되었으며(Liu 등, 2012), 세포 내 ROS신호를 억제하는 방법으로 흔히 이용되고 있는데 최근 proteasome의 ROS를 효율적으로 억제할 수 있음이 보고되어 있다(Curtin 등, 2002; Sun, 2010; Halasi 등, 2013). NACA는 NAC의 amide유도체로서 세포 내 침투성을 높여 보다 낮은 농도에서도 NAC와 동일한 기능을 수행하며 효능이 뛰어난 물질로 알려져 있다(Goldstein, 2013). NACA는 약품으로서 주목을 받고 있으며 NAC보다 적혈구에 대한 독성이 없어 외상성 뇌 손상과 척추신경 치료에도 효과가 있음이 보고되었고, 세포의 ROS신호 전달의 차단 연구에 이용되고 있는 물질이다. CYS는 소에 있어서 체외 발생 과정에서 생성되는 ROS의 세포손상을 억제하는데 있어서 중요하다고 알려져 있으며 황을 함유한 저분자 물질로서 GSH의 농도조절과 산화환원의 균형조절에 있어서 중요하다고 보고되었다(Takahashi 등, 1993; de Matos 등, 1995; de Matos 등, 1997; Takahashi 등, 2002; Merton 2013).

Cysteamine의 구조는 앞서 소개한 물질보다 더 간단한 황합유 저분자 물질로서 세포 내 cystein의 대사를 촉진하는 것으로 알려져 있고, 소의 미성숙 난자에서 GSH 수준을 증가시켜 산화적 세포손상을 억제하는 효과가 있다고 밝혀졌다. CYS는 세포 내 여러가지 기능을 수행하는데 세포 활성화와 관련된 효소의 대사를 조절하며 유전자 발현을 바꾸는 기능이 보고된 바 있다(Zmuda와 Friedenson, 1983; Wilmer 등, 2011; Besouw 등, 2013).

본 연구에서는 상술된 항산화제에서 가장 흔히 이용되고 있는 황합유 물질로서 NAC, NACA, GSH 및 CYS를 선정하여 소 난자의 체외 성숙과 체외 수정란의 체외 발생에 미치는 영향을 분석하였다. 도축 난소의 효율적인 사용과 체내 난자의 활용도 증진을 위하여 항산화제를 난자와 수정란 배양액에 첨가하고 체외 수정란의 발생율을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 일회용품

본 연구에 사용된 TCM 199, Hepes, sodium bicarbonate, sodium pyruvate, glutamine, fatty acid free bovine serum albumin(FAF-BSA), antibiotics antimycotic solution, MEM-essential amino acids, BME-essential amino-acid, theophylline, GSH, NAC, NACA, CYS, FSH 및 estradiol은 Sigma-Aldrich 제품을 사용하였고 FBS는 Gibco사에서 구매하여 실험을 실시하였다. 특별히 언급되지 않은 세포배양 관련 일회용품은 BD Falcon제품을 사용하였으며 4 well dish는 Nunc제품을 사용하였다.

2. 난자의 채취와 체외성숙

도축장에서 난소를 채취하고 0.85% 생리식염수로 세척하였으며 100U/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin을 첨가하여 오염을 방지하였다. 23~28 $^{\circ}$ C로 조정된 보온병에 동일한 용액에 침지하여 실험실로 이송하였으며 6~8시간 안에 난자-난구세포 복합체(COCs)를 2~4mm 크기의 난포에서 18G 주사침으로 흡입하여 회수하였다. 시험에 공시된 난자는 세포질이 균일하고 난구세포가 온전한 난자(grade A and B)와 난구세포가 일부 떨어졌으나 세포질이 균일한 난자(grade C)를 선별하여 체외 성숙 배양을 실시하였다(Stojkovic 등 2001). COCs의 세정 및 선별은 25 mM Hepes와 5% FBS를 함유한 TCM199에서 실시하였으며, 성숙 배양액은 TCM199에 12.5 mM Hepes, 26 mM sodium bicarbonate (NaHCO₃)를 첨가하였으며 항생제로 50U/ml penicillin과 50 μ g/ml streptomycin을 이용하였다. 성숙배양액에 FBS 5%를 혼합하고 FSH 0.1U/ml

을 첨가하여 5% CO₂로 조정된 배양기에서 4 well dish에 각 500~700 µl 배양액을 18시간 전배양하였다. 소의 난소에서 채취한 COCs 25~35개를 각 well에 넣었으며 22~23시간 동안 성숙시켰다. 난자의 성숙율을 조사하기 위하여 난구세포의 확장이 일어난 COCs는 hyaluronidase 1 mg/ml 과 0.4% (w/v) BAS를 함유한 PBS에서 약 15초간 진탕하고 hoechst 33342 5µg/ml 농도의 TCM199에서 핵을 염색하여 난자성숙율을 조사하였다.

3. 체외 수정

성숙된 난자는 한우 후보 씨수소(KPN 999) 동결정액을 이용하여 수정을 실시하였으며 기본 배양액으로 BO배지를 직접 제조하여 준비하였고(Brackett과 Oliphant, 1975), 37도에서 45초간 용해된 동결정액을 calcium과 magnesium이 없는 PBS 6 ml로 800 g에서 7분간 원심 분리하여 세정하였다. 정자 활성도를 증가하기 위하여 theophyllin 0.45 µg/ml이 첨가된 BO 배양액으로 4~6×10⁶개/ml 농도로 희석하였다. 체외 성숙된 난자 당 3~8×10³개가 함유되도록 정자 부유액을 조정하여 최종 부피가 25~50 µl 소적이 되도록 첨가하였다. 체외 수정시간은 8~16시간으로 조정하였으며 수정된 난자를 체외 배양하기 위하여 COCs를 난자와 동일한 크기의 미세 유리관으로 흡입 및 배출을 반복하여 난구세포를 제거하였다.

4. 수정란의 체외 발생

체외 발생에 사용된 배양액은 mSOFai를 사용하였으며 Holm 등(1999)이 사용한 방법을 변형하여 사용하였다. 1% BME amino acid, 2% MEM non-essential amino acids, 10% FBS, 10 µg/ml insulin이 첨가된 mSOFai 50 µl 소적에서 난구세포가 제거된 난자를 13~17개로 나누어 배양하였다. 배양기 (Astec, AMP-30D, Japan)는 5% CO₂, 5% O₂ 와 90% N₂로 조정하였으며(Holm 등, 1999; Takahashi와 First 1992), 배양 3일, 6일 및 8일에 발생 중인 수정란에서 2세포기, 8~16세포기 및 배반포를 관찰하였다.

5. 항산화제의 처리

항산화 물질로서 NAC, NACA, GSH 및 CYS를 선별하였으며 각각 0.3mM, 0.2mM, 0.5mM, 0.1mM을 난자의 성숙과정과 발생과정에 필요한 배양액에 첨가하였으며 수정과정에서는 첨가하지 않았다.

6. 통계 자료 분석

각 실험은 3~5회 반복 실시하였으며, 정자의 생존율에 대한 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 실시하였다. *p* 값이 0.05보다 낮은 실험군은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 항산화제가 COCs의 체외성숙에 미치는 영향

도축장 유래 난소에서의 COCs를 무작위로 배치하고 22시간 동안 성숙하면서 NAC, NACA, GSH 및 CYS를 각각 0.3, 0.2, 0.5 및 0.1mM 농도로 처리하여 난자의 성숙율을 조사하였다. Fig. 1에서 살펴보는 바와 같이, 대조군으로 항산화제가 첨가되지 않은 배양액에서 73.4±7.7%의 난자가 MII기로 성숙한 반면, NAC는 67.8±5.0%, NACA는 74.6±11.5%, GSH는 72.3±7.6%, CYS는 79.3±8.2%로 관찰되었다. 대조군과 실험군간에 있어 유의적 차이는 관찰되지 않았으며(*p* > 0.05), 실험은 3반복으로 대조군은 64개, NAC는 59개, NACA는 71개, GSH는 65개의 COCs를 사용하였다.

2. 항산화제가 수정란의 체외배양에 미치는 영향

Fig. 2에서 살펴보는 바와 같이, 성숙된 난자를 체외수정 후 mSOFai배양액에서 체외 발생을 유도하고 배양 2~3일차 난할율을 조사하면 대조군에서 66.3±5.2%, 실험군으로 NAC는 62.5±7.8%, NACA는 57.6±4.3%, GSH는 60.2±8.7%, CYS는 74.0±4.3%로 관찰되어 NACA와 CYS 처리군의 난할율이 유의적으로 높게 관찰되었다(*p* < 0.05). Fig. 3에서 관찰되는 바와 같이 8~16세포기 발생율은 대조군에서 37.2±5.9%, 실험군으로 NAC는 32.3±4.6%, NACA는 32.9±7.9%, GSH는 44.9±6.6%, CYS는 52.1±8.1%로 관찰되어 CYS처리군의 발생율이 유의적으로 높게 관찰되었다(*p* < 0.05). 배반포의 경우, 대조군에서 24.4±4.1%, 실험군으로 NAC는 18.8±3.7%, NACA는 21.2±3.9%, GSH는 26.5±5.0%, CYS는 32.3±5.0%로, NAC 처리군은 유의적으로 낮게 관찰되었고(*p* > 0.05), CYS는 유의적으로 높게 발생하는 것으로 관찰되었다(*p* < 0.05). 수정란의 발생 분석을 위하여 실험은 5번 반복하였으며 대조군은 86개, NAC는 96개, NACA는 85개, GSH는 60개, CYS는 96개의 수정란을 사용하였다.

고 찰

소 수정란의 성숙 및 발생과정에서 항산화제의 영향을 평가하는 연구는 비교적 초기에 실시되었으며 다양한 효능이 검증되었다. 본 연구에서는 소 체외 수정란에 있어 난자의 성숙과정과 발생과정에 있어 항산화제가 수정란의 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. ROS를 억제하기 위하여 항산화물질을 처리하는 방법은 세포내의 활성도를 얼마나 잘 유지하는가가 가장 중요한 문제가 될 수 있으며 난자 생리적 특성에 따라 ROS가 세포신호물질로 작용하는 것이 잘 알려져 있

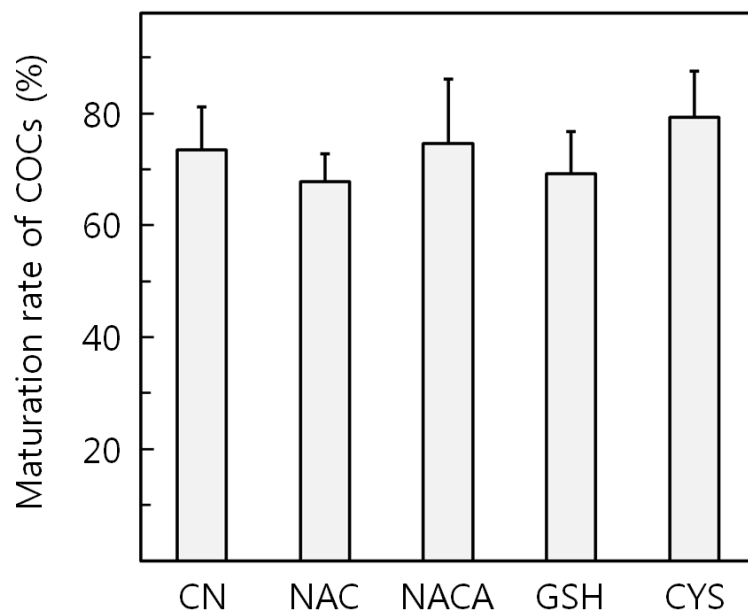


Figure 1. Effects of antioxidants on *in vitro* maturation of bovine COCs.

The matured oocytes in cultured COCs was washed and denuded by hyaluronidase enzyme treatment. The percentage of metaphase II with polar body was examined in each group. The antioxidants treatments did not showed significant differences compared to control (CN) ($p > 0.05$). Each treatment was replicated three times. The abbreviated antioxidant mean as like as N-acetyl-L-cysteine (NAC), N-acetyl-L-cysteine amide (NACA), glutathione (GSH) and cysteamime (CYS). Each treatment was replicated 3 times.

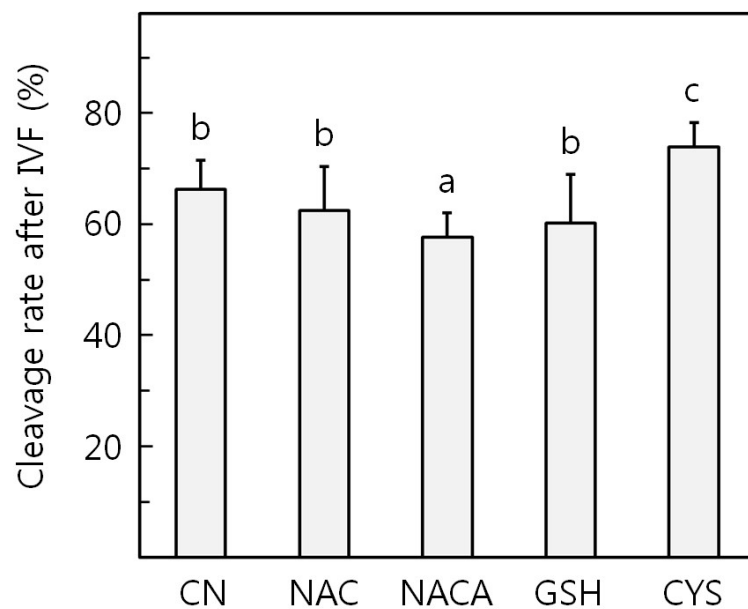


Figure 2. Effects of antioxidants on the cleavage of fertilized bovine COCs.

The matured COCs was used for *in vitro* fertilization in BO medium for 8~16 h and removed cumulus cells with pipettings. After culturing the fertilized oocytes in mSOFai, the percentage of cleaved oocyte was examined in each group at 3 day of culture. Different small letters mean significant differences ($p < 0.05$). Each treatment was replicated 5 times.

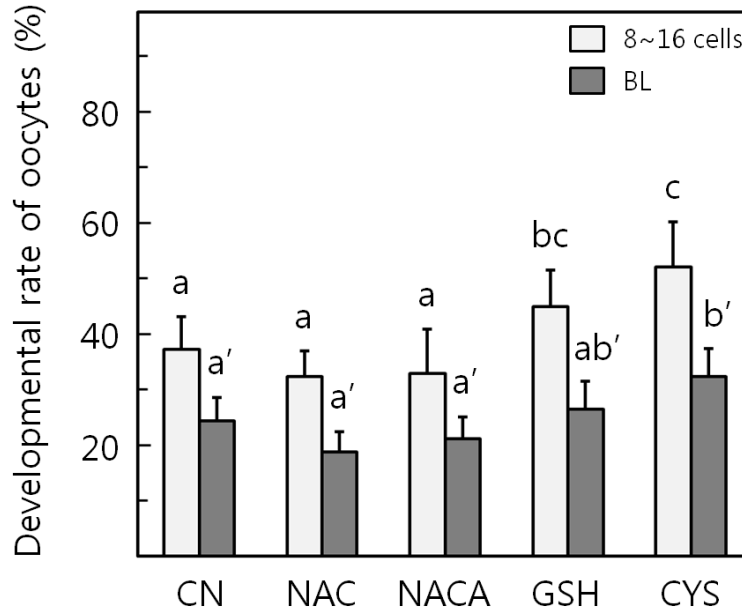


Figure 3. Effects of antioxidants on in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes. The percentages of 8~16 cells and blastocysts (BL) of developmental stage were examined in each group after culturing the fertilized oocytes in mSOFai at 6 and 8 day of culture. Different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Each treatment was replicated 5 times.

므로 합리적인 농도를 추정하는 것은 어렵다고 판단된다. 세포에 있어 GSH는 매우 잘 알려진 항산화 물질이지만, 배양액에 첨가할 경우 세포막을 쉽게 통과하기가 쉽지 않다고 알려져 있다. GSH는 3가지의 아미노산인 glutamate, cystein 및 glycine으로 구성되어 있으며 주요 기능은 cystein의 thiol기 (-SH)에 의하여 유지되고 있는데, 작은 펩타이드로 glutamate와 cystein의 결합은 이형펩타이드결합(isopeptide bond, gamma peptide linkage)로서 구성되어 있다. 그러므로 cystein의 공급은 포유류의 난자의 성숙에 도움이 되는 것으로 알려져 있으나, 아미노산으로 cystein의 SH기는 스스로 산화하여 산화형으로 바뀌어져 체외 배양에 필요한 배양액은 보존에 문제점이 있는 것으로 판단된다. 체외에서 공급되는 cystein의 유도체는 cystic fibrosis 유전질환의 처방약으로도 이용되고 있는데 세포침투성을 더욱 높여준 화학물질인 NAC은 세포흡수가 더 빠른 것으로 알려져 있다. 또한 cysteamine(CYS)은 cystein의 분해산물로서 carboxyl 기가 제거된 형태로 매우 간단한 분자로 구성되어 있는 것이 특징이다.

본 연구에서는 다양한 thiol기를 가진 황 함유물질로서 상술된 물질을 이용하여 소 난자의 체외 성숙과 발생과정에서 미치는 영향을 조사하였다. NAC는 1 mM 농도에서 GSH의 상승효과가 높으나, 수정란의 체외 배양이 생산에 체외 성숙

과정까지 포함하면 9~11일까지 배양되는 것을 감안할 때 독성이 나타나지 않는 기준을 설정하기 위하여 0.3 mM 농도를 설정하였으며 이는 CHO세포의 독성실험에서 0.5 mM 에도 24시간 배양 시 독성이 나타남이 보고된 바 있다(Wu 등, 2008).

NACA의 농도 설정은 이보다 낮은 농도에도 그 효능이 우수하다고 보고된 근거에 따라 0.2mM 로 처리하였고(Wu 등, 2008), GSH 또한 1 mM 보다 0.5 mM농도가 수정란의 장기배양에 안정적인 것으로 판단되어 낮은 농도를 처리하였다. 또한, NACA는 고가의 시약으로 NAC보다 독성이 낮고 세포 내 침투성이 우수하다고 보고되었다(Goldstein, 2013). CYS의 처리는 Takahashi 등 (1993)에 의하여 보고된 내용을 근거로 비교적 낮은 농도인 0.1 mM로 처리하여 실험을 실시하였다. COCs의 성숙배양에서 호르몬의 영향을 최소화 하기 위하여 FSH만 처리하였으며, 발생과정에서 10%의 FBS를 mSOFai 배양액에 첨가하여 수정란을 발생시켰고, 이때 난자의 성숙과정과 동일한 농도의 항산화제를 사용하였다.

본 연구 결과는 소 수정란의 발생에 있어서 NAC는 GSH와 마찬가지로 배아의 체외발생에 도움을 주지 못한다는 연구초기 결과(Ali 등, 2003)와 동일한 결과로 판단된다. 그러나, Sun 등(2015)에 의하면 3~5 mM의 수준의 GSH를 배양액에 첨가

하면 45.8~51.4%의 높은 비율로 배반포가 생산된다는 보고가 있으며 체외에서 발생초기 배양액에서 고농도의 GSH처리가 효과가 있음을 보여주고 있다. 한편, thiol기를 가진 물질을 높은 농도로 처리하면 산도의 변화를 야기하는 문제가 존재하는데 본 연구에 사용되는 CYS의 경우, TCM199 배양액을 이용하여 1000배 stock solution을 제조하면 3~4일 만에 pH의 급격한 상승이 빈번하게 나타나며 -20도 에서 냉동 보존 시에도 동일한 변화가 7~10일에 야기되는 것을 쉽게 알 수 있었다. 그러므로 낮은 농도의 처리 방법이 소 수정란의 장기 체외배양에 필수적이라는 것을 고려할 수 있다. 또한, 배양액의 종류에 따라 그 기능과 영향이 다를 수 있으며, 황함유 항산화제로서 간단한 분자적 변화에도 다양한 변화를 야기할 수 있다는 것을 유추할 수 있다. 고농도의 GSH를 처리하면, 배양액의 pH 안정성에 문제가 될 수 있다고 판단되며 낮은 농도의 thiol기를 가진 물질 중에서 CYS의 효과가 높아지는 현상은 생리적 관점에서 특이하다고 판단되며 더 많은 분자생물학적 접근이 필요하다고 판단된다.

적 요

소 난자의 체외 성숙 및 발달과정에서 항산화제의 첨가는 발생과정에 생성될 수 있는 ROS를 조절하여 체외발생에 도움을 주는 것으로 알려져 있으나 이에 대한 연구는 아직 미흡하다고 판단된다. 본 연구에서는 소 수정란의 성숙과정과 발생과정에서 ROS에 대한 방어 기작에 필요한 물질로 -SH기 (thiol group)을 함유하고 있는 NAC, NACA, GSH 및 CYS를 첨가하여 COCs의 난자 성숙율과 체외 수정 후 수정란의 발생율을 조사하였다. 도축장 유래 난소의 성숙율은 항산화제 처리군과 대조군에서 차이를 보여주지 않았으나($p>0.05$), 배반포 형성율은 0.1 mM CYS를 처리한 실험군에서 $32.3\pm 5.0\%$ 로 유의적으로 높게 관찰되었다($p<0.05$). 항산화제 0.3 mM NAC, 0.2 mM NACA 또는 0.5 mM GSH를 처리하는 실험군에서 배반포 형성율은 각각 $18.8\pm 3.7\%$, $21.2\pm 3.9\%$ 및 $26.5\pm 5.0\%$ 로 조사되었다. 그러므로, 항산화 물질인 NAC, NACA, GSH 및 CYS를 난자의 성숙 및 수정란 배양과정에 첨가하면 난자의 성숙에 영향이 없으나, CYS처리군이 배반포 형성율에 효과가 있음을 밝혔다($p<0.05$).

ACKNOWLEDGMENTS

본 연구는 2017년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 축소의 번식학적 특성분석 과제번호: PJ010293042017)과 2017

년도 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원 연수과정지원사업에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

- Ali AA, Bilodeau JF and Sirard MA. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59:939-949.
- Besouw M, Masereeuw R, van den Heuvel L and Levchenko E. 2013. Cysteamine: an old drug with new potential. *Drug Disc. Today* 18:785-792
- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C and Sirard MA. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56:275-286.
- Boquest AC, Abeydeera LR, Wang WH and Day BN. 1999. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. *Theriogenology* 51:1311-1319.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12:260-274.
- Cocco T, Sgobbo P, Clemente M, Lopriore B, Grattagliano I, Di Paola M, and Willani G. 2005. Tissue-specific changes of mitochondrial functions in aged rats: effect of a long-term dietary treatment with N-acetyl cysteine. *Free Radic. Biol. Med.* 38:796-805.
- Curtin JF, Donovan M and Cotter TG. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods.* 265:49-72.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF and Baldassarre H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 42:432-436.
- de Matos DG, Furnus CC and Moses DF. 1997. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells *Biol. Reprod.* 57:1420-1425.
- Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM and Vos PL. 2002. Effects of in vivo pre-maturation and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 57:5-20.

- Goldstein GA. 2013. N-acetylcystein amide (NAC amide) for the treatment of disease and conditions associated with oxidative stress. US patent, US 8354449 B2.
- Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Gonik B and Abu-Soud HM. 2008. Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 44:1295-304.
- Halasi M, Wang M, Chavan TS, Gaponenko V, Hay N and Gartel AL. 2013. ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. *Biochem. J.* 454:201-208.
- Iwata H, Akamatsu S, Minami N and Yamada M. 1998. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology* 50:365-375.
- Liu Z, Foote RH and Yang X. 1995. Development of early bovine embryos in co-culture with KSOM and taurine, superoxide dismutase or insulin. *Theriogenology* 44:741-750.
- Liu J, Liu M, Ye X, Liu K, Huang J, Wang L, Ji G, Liu N, Tang X, Baltz JM, Keefe DL and Liu L. 2012. Delay in oocyte aging in mice by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine. *Hum. Reprod.* 27:1411-1420.
- Livingston T, Eberhardt D, Edwards JL and Godkin J. 2004. Retinol improves bovine embryonic development in vitro. *Reprod. Biol. Endoc.* 2:83
- Luberda Z. 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod. Biol.* 5:5-17.
- Merton JS, Knijn HM, Flapper H, Dotinga F, Roelen BA, Vos PL and Mullaart E. 2013. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. *Theriogenology* 80:365-371.
- Paryka A, Nizanski W, Bajzert J, Lukaszewicz E and Ochota M. 2013. The effect of cystein and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. *Cryobiology* 67:132-136.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçaves PB and Wolf E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol. Reprod.* 2001 64:904-909.
- Sun SY. 2010. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer Biol. Ther.* 9:109-110.
- Sun WJ, Pang YW, Liu Y, Hao HS, Zhao XM, Qin T, Zhu HB and Du WH. 2015. Exogenous glutathione supplementation in culture medium improves the bovine embryo development after in vitro fertilization. *Theriogenology* 84:716-723.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N and Okano A. 1993. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 49:228-232.
- Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H and Okano A. 2002. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 66:562-567.
- Ufer C and Wang CC. 2011. The roles of glutathione peroxidases during embryo development. *Front. Mol. Neurosci.* 4:12.
- Wilmer MJ, Kluijtmans LAJ, van der Veldena TJ, Willems PH, Schefferd PG, Masereeuw R, Monnensf LA, van den Heuvela LP and Levtchenko EN. 2011. Cysteamine restores glutathione redox status in cultured cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1812:643-651.
- Wu W, Abraham L, Ogony J, Matthews R, Goldstein G and Ercal N. 2008. Effects of N-acetylcystein amide (NACA), a thiol antioxidant on radiation-induced cytotoxicity in chinese hamster ovary cells. *Life Sci.* 82:1122-1130.
- Zmuda J and Friedenson B. 1983. Changes in intracellular glutathione levels in stimulated and unstimulated lymphocytes in the presence of 2-mercaptoethanol or cysteine. *J. Immunol.* 130:362-364.