

## Washing Culture Oil이 돼지 수정란의 체외 발육에 미치는 영향

이연주<sup>1</sup> · 김유진<sup>1</sup> · 이상희<sup>1</sup> · 정희태<sup>2</sup> · 양부근<sup>1</sup> · 박춘근<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 동물생명과학대학, <sup>2</sup>강원대학교 수의과대학

### Effect of Washing Culture Oil on *In Vitro* Development in Porcine Embryos

Yeon-Ju Lee<sup>1</sup>, Yu-Jin Kim<sup>1</sup>, Sang-Hee Lee<sup>1</sup>, Hee-Tae Cheong<sup>2</sup>,

Boo-Keun Yang<sup>1</sup> and Choon-Keun Park<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

#### ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the changes of oxidative stress and antioxidant enzyme during *in vitro* development with washing culture oil in porcine embryos. During the culture, the four types of culture oil such as paraffin oil with or without washing and mineral oil with or without washing were examined. The oil was washed with PZM-3 during 7 days and collected oil only. The embryos were stained with CellTracker™ Red, DC-FDA and Hoechst 33342 to confirm the effects of the oil. As a results, Cleavage rates and total cell number were no difference among the four oil groups. However,  $\geq 16$  cell embryos were significantly different in fore type oil treatment and blastocyst rate was significantly higher washing paraffin treatment than in other group ( $p < 0.05$ ). Also, the expression of free radical were lower in washing paraffin oil than in other groups ( $p < 0.05$ ). On the other hand, the expression of glutathione were not significant different among paraffin oil with or without washing and mineral oil with or without washing, however washing paraffin oil and washing mineral groups were higher than other treatment groups. In conclusion, the washing oil was expected with positive effects on *in vitro* development in porcine embryos.

(Key words : Porcine embryo, *In vitro* culture, Washing culture oil, Peroxidation)

#### 서 론

가축 및 사람의 생식 세포를 수정시키는 방법으로 체외수정과 Intracytoplasmic sperm infection (ICSI)가 이용되고 있다(Van Voorhis, 2007; Devroey와 Van Steirteghem, 2004). 그 중 체외수정은 가축 생산을 위한 기본적인 수정 방법으로 국내뿐 아니라, 국외에서도 많이 이용되며, 인간에서는 불임 치료(Pagidas 등, 1996), 가축에서는 우수 개체를 이용한 종 개량 및 복원, 인간의 질병 치료를 위한 연구에 이용되고 있다.

많은 가축 혹은 실험용 동물에서 돼지는 실험 재료 회수에 있어서 보다 쉽게 채취할 수 있을 뿐만 아니라, 현재까지 난자의 성숙(Li 등, 2014), 수정(Daigneault 등, 2014)

및 배양(Lee 등, 2014) 과정에 관하여 많은 연구가 이루어져 왔다. 그러나 돼지는 체외수정 과정 동안 다른 동물에 비해 온도에 민감하며(Leibo 등, 1996), 음성 전핵 형성 저하 및 다정자 침입이 높게 발생하고(Funahashi, 2003), 체외에서 생산된 배반포와 이를 이용한 자손 생산성이 낮은 문제점(Funahashi와 Day, 1996)을 가지고 있다. 또한, 여러 세포독성 물질을 함유하게 되는 체외생산 과정에서 가장 많은 시간이 소요되는 체외 배양은 독성의 노출에 의해 세포가 손상될 수 있다(Krisher, 2013).

체외 수정란의 생산과정에서 난자 혹은 수정란의 발달을 저해시키는 외부 자극으로부터 보호하기 위해 cell culture oil을 사용하는 방법이 보고되었다(Morbeck 등, 2010). Cell culture oil은 주로 liquid paraffin(Sherrer 등, 2004)과 mineral oil(Shimada 등, 2002)이 사용되며, 이는 온도

\* 본 연구는 농림수산식품기술평가원(과제번호 312060-05-1-CG000)의 지원에 의해 수행되었습니다.

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8627, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

의 변화, 습기, pH 및 삼투압의 변화를 억제시킴으로써 세포에 미치는 자극적인 영향을 감소시켜준다(Otsuki 등, 2007). 그러나 체외수정에 사용되는 cell culture oil은 식유의 부산물로 세포 배양에 적합하지 않은 아연, 과산화물질과 같은 독성물질과 함께 알려지지 않은 성분들이 함유되어 있다(Morbeck 등, 2010). 따라서 세포에 영향을 미치는 독성 물질을 제거하기 위한 방법 중에 washing culture oil이 이용되고 있다(Erbach 등, 1995). Washing oil이란 증류수나 배양액과 함께 oil을 섞어 이물질을 제거하는 방법으로(Lee 등, 2004) 일반 oil과 비교하였을 때, 성숙율과 배반포율에서 washing culture oil의 효과가 더 높게 나타났다(Morbeck 등, 2010). 또한, oil의 washing 과정에서 oil 내의 일부 독성 물질이 감소되고, 난모 세포의 질을 저하시키는 과산화 현상을 완화할 수 있다는 결과도 확인되었다(Morbeck 등, 2010).

따라서 본 연구는 liquid paraffin과 mineral oil을 이용하여 washing culture oil을 만든 후, washing culture oil이 수정란에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 첫번째 목적으로는 liquid paraffin, washing paraffin, mineral oil 그리고 washing mineral oil에서 배양한 체외수정란의 성숙율과 배반포율을 확인하는 것이고, 두번째 목적으로는 각각의 oil에서 배양된 체외수정란의 항산화 능력을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

본 연구의 동물실험은 유럽 실험동물 취급 면허교제(Baumans 등, 1997)에서 제시된 윤리적이고 과학적인 절차에 따라서 수행하였으며, 강원대학교 동물실험윤리위원회의 승인(No: KIACUC-09-0139)을 얻었다.

### Culture Oil의 준비

본 연구에서 체외 성숙 및 수정에 이용된 culture oil으로는 paraffin oil (83640-0380, JUNSEI, Japan)을 사용하였다. 체외 배양에서는 세척하지 않은 paraffin과 mineral oil (M5310, Sigma, USA), 세척과정을 거친 paraffin과 mineral oil을 사용하여 총 4 종류의 culture oil이 배양에 이용되었다. 실험에 사용된 washing culture oil은 paraffin과 mineral oil을 이용하여 Porcine Zygote Medium-3 (PZM-3)와 함께 교반하여 7일간 세척한 후, 배양액과 섞인 oil을 실온에 정치하여 순수한 oil만 회수하여 실험에 이용하였다.

### 난자의 준비

도축 후 회수한 돼지 난소는 32~36°C의 생리 식염수(0.9% NaCl)에 침지하여 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난소는 생리식염수(0.85% NaCl)로 세척 후, 직경 2~6 mm 난포에서 18-gauge의 주사침이 부착된 10 mL 주사기를 사용하여 난포액을 채취하였다. 채취된 난포액은 실온에서 정치 후, PBS-PVA로 세척 및 회석하여 실제 현미경하에서 미성숙 난자를 회수하였다.

### 난자의 체외성숙

난자의 체외성숙은 TCM-199을 기본배양액으로 사용하였다. 난자는 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 TCM-199에 10% porcine follicular fluid (pFF), 10 µL/mLhCG, 1 µL/mL LH, FSH 및 EGF를 첨가한 배양액으로 회수된 미성숙 난자를 3회 세척 후, 22시간 동안 성숙배양하였다. 그 후, pFF와 EGF 이외의 호르몬을 제거한 TCM-199 배양액에서 3회 세척하여 22시간을 추가적으로 배양하였다.

### 정자의 준비

체외 수정에 이용되는 정액은 강원대학교 목장에서 사육되고 있는 F<sub>1</sub> pig (Potbellied x PWG)를 이용하였으며, 음경 수압법으로 정액을 채취하였다. 채취된 정액은 Modena B로 정자수가 1×10<sup>7</sup> spermatozoa/mL로 되도록 희석하여 18°C로 유지하여 실험실로 운반하여, 실험 전까지 18°C에서 냉장 보관하였다.

### 체외 수정 및 체외 배양

체외성숙 후 0.1% hyaluronidase (H-3506, SIGMA, USA)를 처리하여 난구세포를 제거한 난자는 modified Tris buffer Medium (mTBM)에 2 mg/mL Bovine Serum Albumin (BSA; A4503, SIGMA, USA)이 포함된 수정용 배양액 50 µL 소적에 주입 후, 정자를 첨가할 때까지 38.5°C에서 평형시켰다. 수정에 사용된 원정액은 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 정자는 modena B 1 mL를 이용하여 2회 세척하였으며, 6×10<sup>5</sup> spermatozoa/mL의 농도로 0.4 mg/mL caffeine과 4 mg/mL BSA (A6003, SIGMA, USA)가 첨가된 수정용 배양액에 희석하였다. 희석된 정액은 난자가 포함된 소적 내에 50 µL씩 주입하여 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 6시간 체외수정을 실시하였다. 체외수정 6시간 후 난자에 부착된 난구세포와 정자를 제거한 후 3 mg/mL BSA (A-6003, SIGMA, USA)가 첨가된 Porcine Zygote Medium-3 (PZM-3) 100 µL 소적이 있는 35 mm dish에서 48시간 배양하였다. 수정란의 배양 48시간 후, 수정란은 PZM-3가 650 µL가 함유된 4-well dish에서 168시간까지 배양하여 초기배의 발육상태를 확인하였다.

### Reactive Oxygen Species (ROS) 및 Antioxidant Ability 측정

수정란 내의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 측정하여 ROS 생성 수준을 확인하기 위하여 168시간 배양된 수정란을 회수하여 DCFDA (C-369, Invitrogen, USA)로 염색하였다. 회수된 수정란은 세포의 발달을 억제하기 위해 4% paraformaldehyde로 15분 고정 후, PBS(-)로 세척하였다. 고정된 수정란은 암실에서 38°C를 유지하여 20 µm의 carboxy-DCFDA로 30분간 염색하였다. 염색된 수정란은 PBS-PVA로 세척하여 Nikon ECLIOSE TE 300으로 이미지화하였다.

수정란의 항산화 능력을 확인하기 위해서 세포 내 glutathione (GSH)의 농도를 CellTracker™ Red (C34552, invitrogen, USA)로 염색하였다. Glutathione 염색은 168시간 배양된 수정란을 이용하였으며, 세포의 발달을 억제하기 위해 4% paraformaldehyde로 15분 고정 후, PBS(-)로

세척하였다. 고정된 수정란은 암실에서 38°C를 유지하여 5  $\mu\text{m}$ 의 CellTracker™ Red로 30분간 염색하였다. 염색된 수정란은 PBS-PVA로 세척하여 Nikon ECLIOSE TE 300으로 이미지화하였다.

### 배반포 염색

배양 7일차에 회수한 팽창된 배반포는 배반포 내의 총 세포수를 확인하기 위하여 Hoechst 33342 (B2261, SIGMA, USA)로 염색하였다. 회수된 배반포는 0.2% PBS-PVA-BSA에 5분간 정치시킨 후, 4% paraformaldehyde에 5분간 고정시켰다. 고정된 배반포는 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  Hoechst 33342에 30분간 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 염색된 배반포는 Nikon ECLIOSE TE 300으로 이미지화하여 세포수를 비교하였다.

### 실험 계획

**실험 1:** 세척된 오일이 체외배양 과정 동안 수정란에 미치는 영향을 확인하기 위해서 paraffin, washing paraffin, mineral, washing mineral oil을 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 168시간 동안 처리하여 분할율과 배반포율 및 배반포의 세포수를 확인하였다.

**실험 2:** paraffin, washing paraffin, mineral 및 washing mineral oil에서 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 168시간 동안 배양된 배아를 Cell Tracker Red와 DCFDA를 염색하여 oil 처리에 따라 나타나는 수정란의 항산화 능력을 확인하였다.

### 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.1을 사용하여 Duncan 다중검정으로 유의차를 검정하였다. 형광의 발현량 분석으로는 Multi Gauge V3.0을 이용하여 비교, 분석하였다.

## 결 과

Table 1에서 나타낸 바와 같이 paraffin, washing paraffin, mineral 및 washing mineral oil에서 총 분할율과 2~8세포기 발달율에서는 paraffin(79.8 $\pm$ 5.4%, 26.7 $\pm$ 4.0%), washing paraffin (81.9 $\pm$ 3.7%, 29.9 $\pm$ 8.5%), mineral (77.7 $\pm$ 0.2%, 24.7 $\pm$ 4.3%) 및 washing mineral oil(75.4 $\pm$ 4.5%, 37.6 $\pm$ 4.9%)에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 하지만 16세포기 이상 수정란에서는 mineral oil(47.9 $\pm$ 4.4%)이 유의적으로 가장 높게 나타났으며, washing mineral(26.1 $\pm$ 9.3%)이 가장 낮게 나타났다( $p<0.05$ ). 또한, 배반포율에서는 paraffin(8.9 $\pm$ 0.7%), washing paraffin(14.1 $\pm$ 1.7%), mineral(5.1 $\pm$ 0.1%), washing mineral oil(11.8 $\pm$ 1.5%)을 비교하였을 때, washing paraffin oil에서 유의적으로 가장 높게 나타난 것을 확인하였다( $p<0.05$ ). Fig. 1은 각 처리군에서 생성된 배반포의 total cell을 확인하기 위해 Hoechst 33342로 염색한 배반포의 이미지와 각 처리군에서 생성된 배반포 및 total cell을 수치화한 그래프이다. Fig. 1의 (a)는 처리오일의 세척 유무에 따른 배반포율을 비교한 그래프로, paraffin과 mineral oil에서 세척한 oil을 처리하였을 때, 세척하지 않은 oil들을 사용하였을 때보다 유의적으로 높게 나타났다( $p<0.05$ ). (b) 그래프는 배반포의 total cell을 나타낸 그래프로 paraffin oil에서는 세척한 oil(62.3 $\pm$ 7.6개)이 세척하지 않은 oil(50.0 $\pm$ 4.2개)보다 높게 나타났으며, mineral oil에서는 세척한 oil(52.0 $\pm$ 5.5개)이 세척하지 않은 oil(64.0 $\pm$ 4.2개)보다 낮게 나타났다.

Fig. 2와 3은 처리군 별 수정란의 GSH와 ROS 수준을 나타낸 사진과 발현량을 수치화한 그래프이다. Fig. 3의 (A)는 세포 내 ROS 수준을 나타낸 것으로 washing paraffin oil(0.84 $\pm$ 0.11 pixels/embryo)이 유의적으로 가장 낮게 나타났으며, paraffin(1.00 $\pm$ 0.06 pixels/embryo)과 washing mineral oil(1.02 $\pm$ 0.12 pixels/embryo)이 비교적 높게 나타났다( $p<0.05$ ). 그리고 mineral oil(1.50 $\pm$ 0.23 pixels/embryo)은 유의적으로 가장 높게 나타났다( $p<0.05$ ). (B)는 GSH의 수준을 나타낸 그래프로 처리군에서 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, washing paraffin(1.04 $\pm$ 0.07 pixels/embryo)과 washing mineral(1.08 $\pm$ 0.04 pixels/embryo)이 세척하지 않은 paraffin(1.00 $\pm$ 0.07 pixels/embryo) 및 mineral oil(0.99 $\pm$ 0.04 pixels/embryo) 처리군보다 높게 나타났다.

Table 1. *In vitro* development of porcine embryos in culture medium overlaid with paraffin, washing paraffin, mineral and washing mineral oils

Oil treatment	Washing treatment	No. of oocyte	Cleavage (%)	No. of embryo development to (%)			Deg. (%) <sup>*</sup>
				2-8 cell <sup>*</sup>	$\geq 16$ cells <sup>*</sup>	Blastocyst <sup>*</sup>	
Paraffin	-	124	100 (79.8 $\pm$ 5.4)	34 (26.7 $\pm$ 4.0)	55 (44.2 $\pm$ 2.9) <sup>ab</sup>	11 (8.9 $\pm$ 0.7) <sup>bc</sup>	24 (20.2 $\pm$ 5.4)
	+	145	119 (81.9 $\pm$ 3.7)	47 (29.9 $\pm$ 8.5)	52 (37.9 $\pm$ 6.3) <sup>ab</sup>	20 (14.1 $\pm$ 1.7) <sup>a</sup>	26 (18.1 $\pm$ 3.7)
Mineral	-	174	135 (77.7 $\pm$ 0.2)	47 (24.7 $\pm$ 4.3)	79 (47.9 $\pm$ 4.4) <sup>a</sup>	9 (5.1 $\pm$ 0.1) <sup>c</sup>	39 (22.3 $\pm$ 0.2)
	+	155	115 (75.4 $\pm$ 4.5)	59 (37.6 $\pm$ 4.9)	37 (26.1 $\pm$ 9.3) <sup>b</sup>	19 (11.8 $\pm$ 1.5) <sup>ab</sup>	40 (24.6 $\pm$ 4.5)

<sup>a-c</sup> Values in the same column with different superscripts are significantly different ( $p<0.05$ ). <sup>\*</sup>Percentage of total number of oocytes used for IVF. n=3.

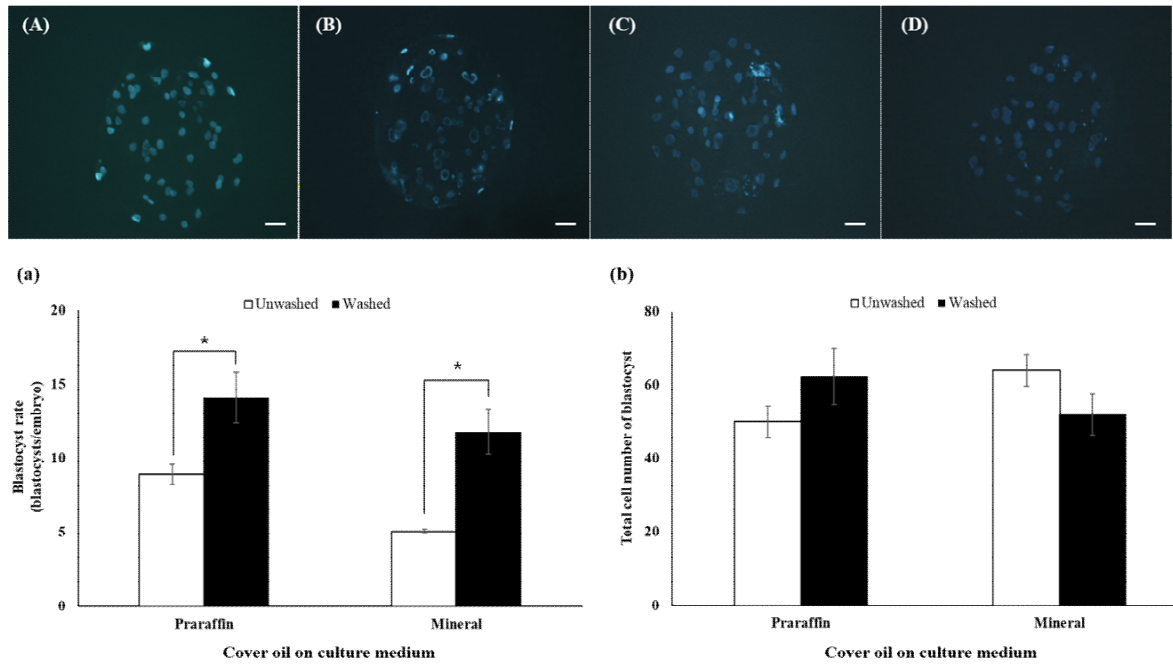


Fig. 1. Fluorescence microscopic images in blastocyst, blastocyst rate to comparison with or without washing oil (a) and total cell of blastocyst (b) produced by culture medium overlaid with paraffin, washing paraffin, mineral and washing mineral oils. (A: paraffin, B: washing paraffin, C: mineral, D: washing mineral oil), Scale bar: 50  $\mu$ m. \* Values in the same column with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

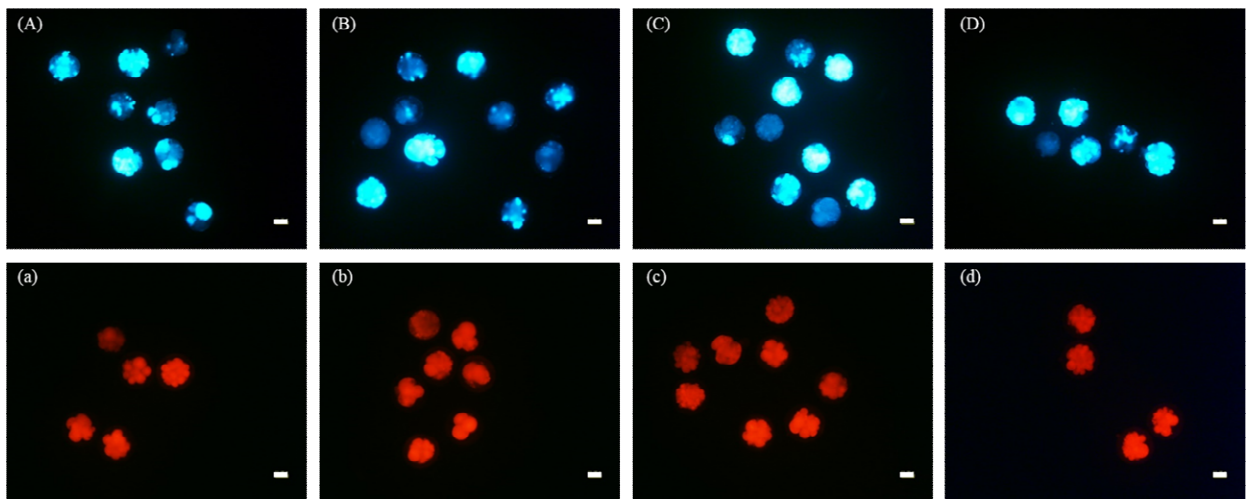


Fig. 2. Fluorescence microscopic of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (blue) and GSH (red) in embryo produced by culture medium overlaid with paraffin, washing paraffin, mineral and washing mineral oils. (A, a: paraffin oil; B, b: washing paraffin oil; C, c: mineral oil; D, d: washing mineral oil), Scale bar: 50  $\mu$ m.

### 고찰

본 연구는 세척된 oil이 체외 배양 과정 동안 수정란에 미치는 영향을 확인하기 위해서 체외 수정과 항산화 능

력을 측정하였다. Washing culture oil은 체외생산과정에서 필수적인 물질인 oil이 함유하고 있는 독성을 줄일 수 있는 방법(Morbeck 등, 2010)으로 몇몇 연구에서 이용되고 있다. 세척되지 않은 oil은 여러 가지 물질을 포함하고 있으며, 그 중에는 peroxides, aldehydes, alkenal을 포함

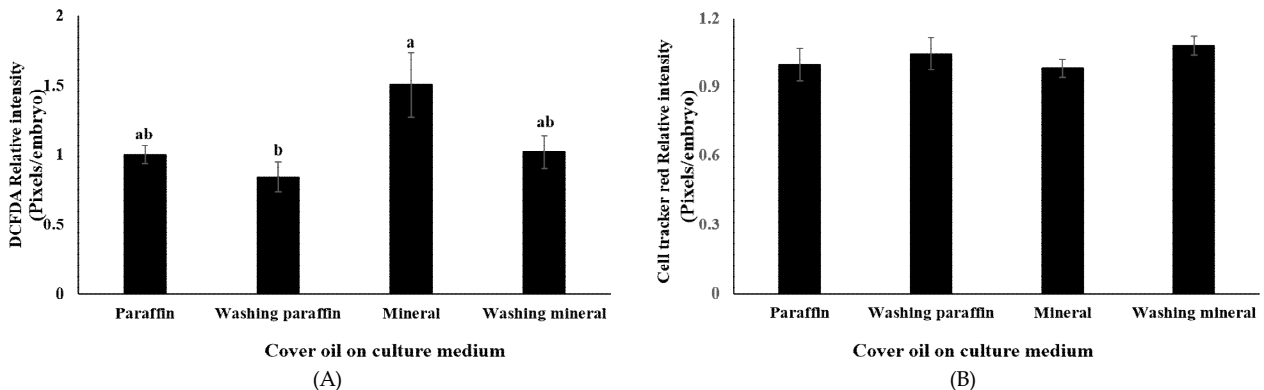


Fig. 3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) and GSH (B) expression level in embryo produced by culture medium overlaid with paraffin, washing paraffin, mineral and washing mineral oils. <sup>ab</sup> Values in the same column with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

한 화학물질이 존재한다(Morbeck 등, 2010). 특히, peroxide의 경우는 oil의 사용 기간과 장소에 영향을 받으며, 이에 따라 배양하는 난자 혹은 수정란에 부정적인 영향을 미친다(Otsuki 등, 2007). Oil 내의 peroxide는 세포가 성장하는 배양액에 직접적인 영향을 미칠 수 있으며, 배양액 내의 높은 peroxide는 성숙율과 배반포율, total cell number를 저하시키고, apoptosis를 높이는 역할을 한다(Hughes 등, 2010). 이런 단점을 보완하기 위해 무기 고분자로 만들어진 silicone oil을 사용하기도 했지만, 성숙율 및 배반포율이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Van Soom 등, 2001). 따라서, 세포 배양에 이용되는 paraffin이나 mineral oil을 세척하여 이용한 결과, 오일 내의 함유되어 있는 Triton X-100이 현저히 감소하였다(Morbeck 등, 2010). 또한, oil의 세척 과정에서 일반 증류수보다 배양액을 사용하여 세척하였을 때, 수정란의 분할율과 배반포율에서 더 높은 결과를 확인하였다(Lee 등, 2004).

본 연구에서 체외생산 과정 동안 사용된 오일은 총 4가지로 paraffin과 mineral oil 그리고 각각을 세척한 washing paraffin과 washing mineral oil을 이용하여 체외수정을 실시하였을 때, 총 분할율과 total cell number에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 하지만 16세포기 이상의 수정란과 배반포율은 유의적으로 차이가 나타났으며, 특히 배반포율에서 세척하지 않은 oil과 세척한 oil을 사용하였을 때, 세척한 oil에서 유의적으로 높은 수치를 나타냈다( $p < 0.054$ ). 이는 세척과정을 통한 oil내의 수정란에 해로운 영향을 미치는 요소들이 감소했다고 추측한다.

또한, 항산화 능력 검증을 위한 ROS와 GSH 수치에서는 세척한 oil의 결과가 비교적 긍정적으로 나타났다. ROS는 활성산소로 세포 내의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함되며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 세포신호와 항상성에 있어 중요한 역할을 하는 필수적인 요소이다. 그러나, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양이 많아지게 되면 세포를 자극 및 손상시켜 산화 스트레스가 발생해 세포의 apoptosis까지 유발시킨다(Simon 등, 2000). 수정란의 ROS 수치는 washing paraffin oil에서 유의적으로 가장 낮게 나타났으며, washing mineral oil은 mineral oil에 비해 낮

게 나타난 것( $p < 0.05$ )을 보아, 세척된 오일이 세척되지 않은 oil에 비해 낮은 peroxide를 함유했다고 할 수 있다. 또한, GSH는 활성 산소와 그에 의한 손상을 방지하는 산화 방지제로써 세포 내에 존재하는 물질이다. 각 처리군에서 나타난 GSH 수치에 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, 세척된 washing paraffin, washing mineral oil에서 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 세척된 oil에서 낮은 발현을 나타낸 ROS에도 영향을 미칠 수 있으며, 세척된 oil이 세포에 미치는 부정적인 영향을 감소시켰다고 볼 수 있다.

결론적으로 세척된 oil을 사용하였을 때, 세척되지 않은 oil을 사용하였을 때보다 세포 내의 자극을 감소시키고, 항산화 능력을 증가시킬 수 있다고 판단된다. 본 연구를 바탕으로 보다 고효율의 세척방법을 적용한다면, 세포 배양에 있어서 높은 배반포율과 total cell뿐만 아니라, 향상된 항산화 능력을 확인할 수 있다고 기대된다.

## 인용문헌

- Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick MC (1997): Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. Lab-Anim-UK 31:1-32.
- Daigneault BW, McNamara KA, Purdy PH, Krisher RL, Knox RV, Miller DJ (2014): Novel and traditional traits of frozen-thawed porcine sperm related to *in vitro* fertilization success. Theriogenology 82: 2:266-273.
- Devroey P, Van Steirteghem A (2004): A review of ten years experience of ICSI. Human Reproduction Update 10:19-28.
- Erbach GT, Bhatnagar P, Baltz JM, Biggers JD (1995): Zinc is a possible toxic contaminant of silicone oil in microdrop cultures of preimplantation mouse em-

- bryos. Hum Reprod 10:3248-3254.
5. Funahashi H (2003): Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. Reprod Fertil Dev 15:167-177.
  6. Funahashi H, Day B (1996): Advances in *in vitro* production of pig embryos. J Reprod Fertil Suppl 52: 271-283.
  7. Hughes PM, Morbeck DE, Hudson SB, Fredrickson JR, Walker DL, Coddington CC (2010): Peroxides in mineral oil used for *in vitro* fertilization: defining limits of standard quality control assays. J Assist Reprod Gen 27:87-92.
  8. Krisher RL (2013): *In vivo* and *in vitro* environmental effects on mammalian oocyte quality. Annu Rev Anim Biosci 1:393-417.
  9. Lee E, Min SH, Song BS, Yeon JY, Kim JW, Bae JH, Park SY, Lee YH, Kim SU, Lee DS (2014): Exogenous  $\gamma$ -tocotrienol promotes preimplantation development and improves the quality of porcine embryos. Reprod Fertil Dev BD13167
  10. Lee S, Cho M, Kim E, Kim T, Lee C, Han J, Lim J (2004): Renovation of a drop embryo cultures system by using refined mineral oil and the effect of glucose and/or hemoglobin added to a serum-free medium. J Vet Med Sci 66:63-66.
  11. Leibo S, Martino A, Kobayashi S, Pollard J (1996): Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. Anim Reprod Sci 42:45-53.
  12. Li XX, Lee KB, Lee JH, Kim KJ, Kim EY, Han KW, Park KS, Yu J, Kim MK (2014): Glutathione and cysteine enhance porcine preimplantation embryo development *in vitro* after intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology 81:309-314.
  13. Morbeck DE, Khan Z, Barnidge DR, Walker DL (2010): Washing mineral oil reduces contaminants and embryotoxicity. Fertil Steril 94:2747-2752.
  14. Otsuki J, Nagai Y, Chiba K (2007): Peroxidation of mineral oil used in droplet culture is detrimental to fertilization and embryo development. Fertil Steril 88:741-743.
  15. Pagidas K, Falcone T, Hemmings R, Miron P (1996): Comparison of reoperation for moderate (stage III) and severe (stage IV) endometriosis-related infertility with *in vitro* fertilization-embryo transfer. Fertil Steril 65:791-795.
  16. Sherrer E, Rathbun T, Davis D (2004): Fertilization and blastocyst development in oocytes obtained from prepubertal and adult pigs. Can J Anim Sci 82: 102-108.
  17. Shimada M, Kawano N, Terada T (2002): Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of *in vitro* maturation media. Reproduction 124:557-564.
  18. Simon HU, Haj Yehia A, Levi Schaffer F (2000): Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 5:415-418.
  19. Van Soom A, Mahmoudzadeh A, Christophe A, Ysebaert M, De Kruif A (2001): Silicone oil used in microdrop culture can affect bovine embryonic development and freezability. Reprod Domest Anim 36:169-176.
  20. Van Voorhis BJ (2007): *In vitro* fertilization. N Engl J Med 356:379-386.

(Received: 21 August 2014/ Accepted: September 15 2014)