

Suplementasi Antioksidan pada Maturasi *In Vitro* Menurunkan Kadar ROS: A Literature Review

Amalia Ratna Kusumaningrum

Ilmu Kesehatan Reproduksi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga; amaliaratnak@gmail.com
(koresponden)

ABSTRACT

One of the reproductive health problems is infertility. In vitro maturation (IVM) is emerging as a popular technology at the forefront of fertility treatment. IVM conditions inducing a series of events related to reactive oxygen species (ROS), which have been implicated as one of the major causes for reduced embryonic development. Therefore, the supplementation of IVM media with antioxidants could improve the survival and development of the oocytes. The method of searching conducted online database such as Science Direct, Sage, Pubmed, Springer, and Oxford. The keywords that used were "antioxidant", "reactive oxygen species", "in vitro maturation", "infertility" and "assisted reproductive technology". The literatures restricted in 2008 year until 2019 in English. The results of the study show that there were 3 main themes, types, dosages, antioxidant benefits for reduced ROS levels during IVM. The drawback that might arise in this study is that there are still possibilities of not getting some related articles. The literature review is expected to be a basis for research assisted reproductive technology.

Keywords: antioxidant; in vitro maturation; infertility; Reactive oxygen species (ROS)

ABSTRAK

Salah satu masalah kesehatan reproduksi adalah infertilitas. Maturasi *in vitro* (MIV) muncul sebagai teknologi populer perawatan infertilitas. Kondisi MIV menginduksi serangkaian peristiwa yang berkaitan dengan spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species* / ROS), yang telah terlibat sebagai salah satu penyebab utama berkurangnya perkembangan embrionik. Oleh karena itu, suplementasi media MIV dengan antioksidan dapat meningkatkan kelangsungan hidup dan perkembangan oosit. Metode pencarian sumber pustaka dilakukan secara daring dengan menggunakan basis data seperti Science Direct, Sage, Pubmed, Springer, dan Oxford. Kata kunci yang digunakan adalah "antioxidant", "reactive oxygen species", "in vitro maturation", "infertility" dan "assisted reproductive technology". Penelusuran literatur dibatasi dalam tahun 2008 hingga 2019 dalam bahasa Inggris. Hasil studi menunjukkan bahwa ada 3 tema yang terkait yaitu jenis, dosis, dan manfaat antioksidan untuk menurunkan kadar ROS selama maturasi *in vitro*. Kekurangan yang mungkin muncul dalam studi ini adalah masih adanya kemungkinan tidak terjaringnya beberapa artikel terkait. *Literatur review* ini diharapkan menjadi dasar untuk penelitian teknologi reproduksi berbantu.

Kata kunci: antioksidan; maturasi *in vitro*; infertilitas; spesies oksigen reaktif

PENDAHULUAN

Kesehatan sebagaimana didefinisikan oleh *World Health Organization* (WHO) adalah keadaan fisik, mental, dan kesejahteraan sosial yang lengkap. WHO dan *World Bank* mengakui infertilitas sebagai kecacatan dan penurunan fungsi yang signifikan. Laporan tersebut menilai infertilitas sebagai kecacatan serius kelima dalam daftar disabilitas sedang dan parah di negara berpenghasilan rendah dan negara berpenghasilan menengah untuk kelompok usia antara 0 dan 59 tahun.⁽¹⁾ Infertilitas umumnya didefinisikan sebagai kondisi sistem reproduksi di mana terdapat kegagalan untuk mencapai kehamilan klinis setelah 12 bulan hubungan seksual teratur, tanpa kondom. Infertilitas dapat dikategorikan sebagai infertilitas primer dan sekunder, dapat dilihat apakah seorang wanita pernah memiliki kehamilan sebelumnya atau tidak.^(2,3)

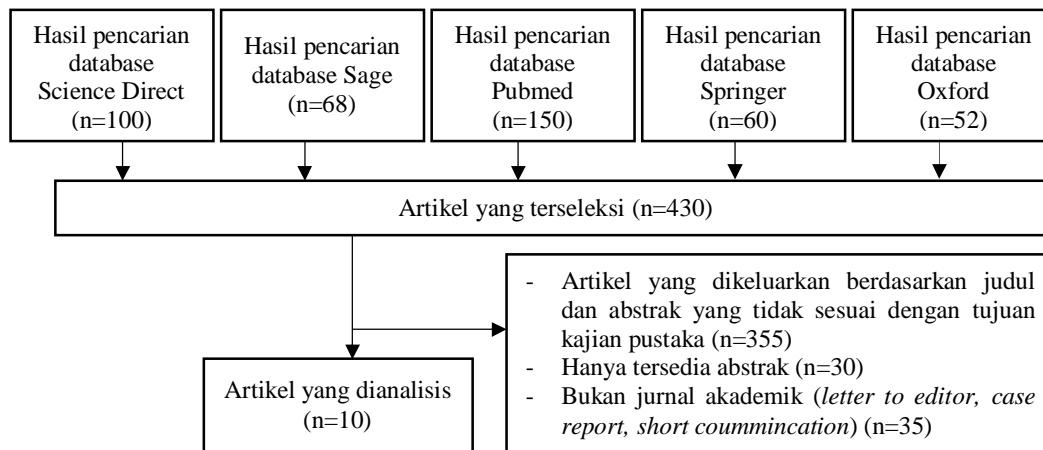
Prevalensi infertilitas sangat berbeda dari satu negara ke negara lain. Diperkirakan lebih dari 70 juta (15%) pasangan di seluruh dunia menderita infertilitas, dan mayoritas dari mereka tinggal di negara berkembang (>30%).^(4,5) Di Indonesia, infertilitas mempengaruhi hingga 21% pasangan. Berdasarkan struktur usia saat ini dari populasi ada sekitar 39,8 juta wanita Indonesia yang memiliki usia subur. Bahkan ketika menerapkan perkiraan konservatif dari tingkat infertilitas 10%, ini berarti sub-populasi sekitar empat juta wanita yang mengalami infertilitas⁽⁵⁾, dengan sekitar 56% mencari pengobatan infertilitas.⁽²⁾

Teknologi reproduksi berbantu (*assisted reproductive technology* / ART) seperti fertilisasi *in vitro* (FIV). semakin banyak digunakan untuk membantu pasangan infertil memiliki anak. Menurut *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) di Eropa dan *the Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) di Amerika, tingkat keberhasilan FIV menunjukkan berbagai variasi sekitar 10-40%.⁽⁶⁾ Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa keberhasilan FIV tergantung pada kualitas oosit. Teknik FIV dimulai dengan teknik maturasi *in vitro* (MIV). Teknik MIV adalah periode sangat penting untuk mendapatkan oosit matang berkualitas tinggi sehingga dapat meningkatkan keberhasilan produksi embrio *in vitro*.⁽⁷⁾

Selama proses MIV, faktor lingkungan, misalnya komposisi dan formulasi medium kultur, suplementasi protein, pH, suhu, dapat menyebabkan stress oksidatif pada oosit, yang dapat mempengaruhi pematangan inti, pembelahan, dan pembentukan blastokista.^(8,9) Spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species* / ROS) diproduksi secara endogen oleh oosit selama *in vitro* dan *in vivo*. Paparan stres lingkungan selama MIV tersebut secara dramatis meningkatkan kadar ROS.⁽¹⁰⁾ ROS adalah molekul berumur pendek yang sangat reaktif, bereaksi dengan mengubah fungsi fisiologis biomolekul seluler, seperti lipid, protein, dan DNA, dan dengan demikian mengurangi kualitas embrio.⁽¹¹⁾ Salah satu metode yang dapat membantu mengatasi masalah ini adalah suplementasi medium MIV dengan senyawa antioksidan. Penambahan antioksidan ke media IVM telah dilaporkan menurunkan kadar ROS dan meningkatkan keberhasilan produksi embrio *in vitro*.⁽¹²⁾

METODE

Penelitian ini merupakan kajian pustaka dari berbagai penelitian orisinal (*original research*) melalui beberapa basis data elektronik. Pencarian literature dilakukan secara daring dengan menggunakan basis data seperti Science Direct, Sage, Pubmed, Springer, Oxford. Kata kunci yang digunakan adalah “*antioxidant*”, “*reactive oxygen species*”, “*in vitro maturation*”, “*infertility*” dan “*assisted reproductive technology*”. Penelusuran literatur dibatasi dalam tahun 2008 hingga 2019 dalam Bahasa Inggris. Alur pemilihan artikel dalam skema 1.



Gambar 1. Skema studi literatur

HASIL

Artikel penelitian yang terpilih sesuai dengan tujuan *literature review* ini 10 artikel. Artikel ini merupakan artikel dengan penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental - posttest only control group design*). Tema yang dianalisis berdasarkan hasil *literature review* yaitu jenis antioksidan, dosis antioksidan, dan manfaat antioksidan untuk menurunkan kadar ROS selama maturasi *in vitro*.

Tabel 1. Ringkasan artikel

No	Judul, penulis	Jenis antioksidan	Hasil
1	Quercetin improves the <i>in vitro</i> development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels (Kang et al., 2013) ⁽¹⁰⁾	quercetin	Pada dosis 1 dan 10 µg/mL secara signifikan menurunkan kadar ROS dibandingkan kelompok kontrol dan dosis 50 µg/mL.
2	Supplementation with spermine during <i>in vitro</i> maturation of porcine oocytes improves early embryonic development after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer (Jin et al., 2016) ⁽¹³⁾	Spermine	Pada dosis 10, dan 50 µM dapat menurunkan kadar ROS dibanding kontrol
3	Resveratrol compares with melatonin in improving <i>in vitro</i> porcine oocyte maturation under heat stress (Li et al., 2016) ⁽¹⁴⁾	Resveratrol	Pada dosis 2.0 µmol/L meningkatkan pematangan inti, dan blastosis, dan dapat menurunkan kadar ROS
4	Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression (Mukherjee et al., 2014) ⁽¹⁵⁾	Resveratrol	Pada dosis 0.25, 0.5 µM menurunkan kadar ROS dan menaikkan jumlah blastosis. Sedangkan pada dosis 5.0 µM maturasi oosit signifikan menurun

No	Judul, penulis	Jenis antioksidan	Hasil
5	Effect of zeaxanthin on porcine embryonic development during in vitro maturation. (Seo-Jin, 2017) ⁽¹⁶⁾	Zeaxanthin	Pada dosis 0.5 mmol/L secara signifikan menunjukkan hasil peningkatan maturasi <i>in vitro</i> . Dosis tersebut juga dapat menurunkan kadar ROS
6	Effect of Holothuria leucospilota extracted saponin on maturation of mice oocyte and granulosa cells (Moghadam et al., 2016) ⁽¹⁷⁾	Saponin	Pada dosis 1 µg/ml dapat meningkatkan hasil maturasi. Dan pada dosis 1, 2 µg/ml dapat menurunkan kadar ROS
7	A polyphenol-rich extract from an oenological oak-derived tannin influences in vitro maturation of porcine oocytes (Spinaci et al., 2019) ⁽¹⁸⁾	Tannin	Pada dosis 5, 10, 20 µg/ml dapat menurunkan kadar ROS dan meningkatkan kadar GSH
8	Supplementation with nanomolar concentrations of verbascoside during in vitro maturation improves embryo development by protecting the oocyte against oxidative stress: a large animal model study (Martino et al., 2016) ⁽¹⁹⁾	Verbascoside (VB)	Pada dosis 1 nM VB secara signifikan meningkatkan rata-rata blastosis, dan mengurangi kadar ROS
9	Melatonin Modifies Histone Acetylation during In Vitro Maturation of Mouse Oocytes (Keshavarzi et al., 2018) ⁽⁹⁾	Melatonin	Pada konsentrasi 10^{-6} M dapat meningkatkan maturasi inti dan menurunkan kadar ROS
10	Effect of melatonin supplementation during in vitro maturation on intracellular ROS levels in porcine oocytes. (Cruz et al., 2014) ⁽²⁰⁾	Melatonin	Pada konsentrasi 10^{-6} dan 10^{-9} M dapat menurunkan kadar ROS.

PEMBAHASAN

Maturasi *in vitro* (MIV) adalah metode di mana oosit yang belum matang dalam folikel antral akan diekstraksi dan matang dalam kondisi laboratorium. MIV pertama kali diusulkan pada tahun 1935 dan selanjutnya pada tahun 1969, sedangkan kelahiran pertama terjadi pada tahun 1991. Hampir 1.200 bayi MIV telah dilahirkan secara internasional dengan menggunakan teknik ini.⁽²¹⁾ Maturasi oosit dapat dilihat dalam dua bagian oosit, yaitu pematangan inti divisualisasikan oleh ekstrusi dari polar body I dan pematangan sitoplasma. Namun, potensi perkembangan embrio yang dihasilkan *in vitro* masih rendah dibandingkan dengan *in vivo*. Dua faktor utama yang mempengaruhi produksi dan pengembangan embrio adalah kualitas oosit imatur dan komposisi media MIV. Pemilihan kualitas oosit yang berkualitas dengan menseleksi beberapa kriteria morfologis yang digunakan, termasuk jumlah lapisan sel kumulus, homogenitas sitoplasma, ukuran oosit dan folikel yang belum matang.⁽²²⁾

Proses pematangan oosit membutuhkan pasokan energi dalam bentuk adenosin trifosfat. Generasi ATP oleh rantai transpor elektron mitokondria selama proses pematangan menghasilkan produksi ROS. Oosit *in vivo* dilindungi dari efek berbahaya ROS oleh enzim anti-oksidan yang ada dalam cairan folikel. Namun, selama pematangan *in vitro*, selain produksi ROS endogen dan kurangnya mekanisme pertahanan fisiologis hadir dalam cairan folikuler, beberapa faktor eksogen dapat bertindak sebagai sumber potensial ROS, yaitu komposisi dan lingkungan media MIV seperti paparan cahaya tampak, pH dan suhu, konsentrasi oksigen.⁽¹⁸⁾ Akumulasi dari beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ROS dapat menurunkan kualitas oosit. Gangguan ROS tersebut menyebabkan efek toksik melalui produksi peroksida dan radikal bebas yang merusak semua komponen sel, termasuk protein, lipid, dan DNA. Efek stress oksidatif yang berlebihan dapat menyebabkan disfungsi mitokondria, kelainan spindle, kematian sel oosit melalui nekrosis dan memicu apoptosis.⁽²³⁾

Glutathione (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine; GSH) adalah pertahanan non-enzim utama sel terhadap stres oksidatif. Oleh karena itu peningkatan stres oksidatif dan kandungan GSH oosit yang lebih rendah terkait dengan kondisi kultur *in vitro* dapat mempengaruhi morfologi spindle dan integritas struktural dari oosit matur *in vitro*.⁽²⁴⁾ Beberapa penelitian telah mengungkapkan bahwa penambahan antioksidan dapat berpotensi dalam hasil pematangan *in vitro*. Oleh karena itu, pencarian senyawa bioaktif alami baru dengan aktivitas antioksidan sangat penting.⁽¹⁷⁾ Suplementasi antioksidan ke media kultur efektif dalam mendukung pengembangan embrio secara *in vitro* sebagai pertahanan antioksidan terhadap ROS. Antioksidan adalah molekul yang menghambat pembentukan radikal bebas atau melindungi terhadap efek berbahaya, mengurangi apoptosis atau kematian sel seperti dengan menghambat peroksidasi lipid dan lipoprotein, mencegah fragmentasi DNA, dan berkontribusi pada pertahanan terhadap kerusakan oksidatif pada embrio.⁽²⁵⁾

Sel memiliki beberapa mekanisme untuk menangkal stres oksidatif dengan memproduksi antioksidan, baik yang dihasilkan secara alami *in situ* (antioksidan endogen) yang dapat diklasifikasikan menjadi antioksidan enzimatis dan non enzimatis. Antioksidan enzimatis yang terdiri dari superoksida dismutase (SOD), askorbat peroksidase (APX), guaiacol peroksidase (GPX), glutathione -S-transferase (GST) dan katalase (CAT), dan senyawa molekul rendah non-enzimatis seperti asam askorbat (AA), reduksi glutathione (GSH). Antioksidan juga dapat diberikan secara eksternal melalui makanan (antioksidan eksogen), diklasifikasikan menjadi dua yaitu antioksidan metabolik dan nutrisi. Antioksidan metabolik yang termasuk antioksidan endogen, diproduksi

oleh metabolisme dalam tubuh, seperti asam lipoid, glutathione, L-arginine, koenzim Q10, melatonin, asam urat, bilirubin, protein pengkelat logam, transferrin, dll. Sementara antioksidan nutrisi yang termasuk antioksidan eksogen, adalah senyawa yang tidak dapat diproduksi dalam tubuh dan harus disediakan melalui makanan atau suplemen, seperti vitamin E, vitamin C, karotenoid, trace metal (selenium, mangan, seng), flavonoid dan non-flavonoid. Kelompok flavonoid terdiri dari flavonols (quercetin, kaempferol, myricetin, dll.), flavones (lucetin, apigenin, wogonin, dll.), flavanones (naringenin, pinocembrin, hesperetin, dll.), flavonols (catechin, epogallocatechin, dll.), anthocyanidins (delphinidin, cyanidin, dll.), isoflavones (genistein, daidzein, dll.), sedangkan pada kelompok non-flavonoid terdiri dari phenolic alcohol, phenolic acid, stilbenes, lignan, coumarin, chalcones, curcumin, mangiferin.^(26,27)

Senyawa antioksidan yang dilengkapi dengan media kultur MIV, berperan sebagai pemulung radikal bebas, yang mampu menyumbangkan satu atom hidrogen (H⁺) atau satu elektron tunggal ke ROS, menstabilkan spesies reaktif, mengurangi dan mencegah kadar ROS dengan menghambat ekspresi subunitnya.^(25,27) Memahami mekanisme toksisitas yang diinduksi obat dan bahan kimia adalah minat utama banyak peneliti di seluruh dunia untuk mengembangkan strategi pencegahan dan terapeutik yang ditingkatkan. Baru-baru ini, para peneliti memahami bahwa toksisitas adalah proses rumit yang dipengaruhi oleh banyak faktor, termasuk paparan perkembangan, kecenderungan genetik, dan dosis.⁽²⁸⁾ Oleh karena itu, antioksidan pada dosis tinggi dapat, meskipun bertindak sebagai prooksidan, juga mengganggu keseimbangan redoks setelah potensi mereka untuk berinteraksi dengan ROS hadir pada konsentrasi fisiologis yang diperlukan untuk fungsi seluler yang optimal, yang mengarah ke disfungsi seluler.⁽²⁹⁾

KESIMPULAN

Infertilitas adalah masalah kesehatan reproduksi global yang angka keberhasilannya masih rendah. Pada proses maturasi *in vitro* (MIV) keadaan di *in vitro* berbeda dengan *in vivo*, yang mana dapat menyebabkan peningkatan generasi spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species* / ROS). ROS adalah molekul berumur pendek yang sangat reaktif, dan dapat menyerang seperti lipid, protein, dan DNA, sehingga kualitas dan keberhasilan embrio menurun. satu metode yang dapat membantu mengatasi masalah ini adalah suplementasi medium MIV dengan senyawa antioksidan. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa penambahan antioksidan ke media IVM telah dilaporkan menurunkan kadar ROS dan meningkatkan keberhasilan produksi embrio *in vitro*. Masih sedikitnya penelitian yang berfokus pada MIV menjadi tantangan bagi profesional dan akademisi untuk meningkatkan keberhasilan produksi embrio *in vitro*. Jenis antioksidan, dosis antioksidan, dan manfaat antioksidan untuk menurunkan kadar ROS selama MIV perlu penelitian lebih lanjut, agar mendapatkan dosis dan konsentrasi yang tepat sebagai tambahan medium MIV. *Literatur review* ini diharapkan dapat membantu penelitian-penelitian di bidang kesehatan pada umumnya terkait topik kesehatan reproduksi teknologi reproduksi berbantu, sehingga dapat membantu pasangan infertil memiliki anak. Kekurangan yang mungkin muncul dalam *literatur review* ini adalah masih adanya kemungkinan tidak terjangkanya beberapa artikel jurnal terkait. Selain itu keberagaman jenis, dan dosis yang diberikan selama MIV menyebabkan sulitnya didapatkan penemuan yang sebanding maupun bertolak belakang dengan penemuan lain..

DAFTAR PUSTAKA

1. Serour GI, Serour AG. Ethical issues in infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2017;43:21-31.
2. Place JM, Litwack I, Vann S. Is infertility as visible as it needs to be given its importance to women's health? Results from a review of women's health journals. *Sexual & Reproductive Healthcare*. 2018;16:80-81.
3. Al-Turki HA. Prevalence of primary and secondary infertility from tertiary center in eastern Saudi Arabia. *Middle East Fertility Society Journal*. 2015;20(4):237-240.
4. Al-Asadi JN, Hussein ZB. Depression among infertile women in Basrah, Iraq: Prevalence and risk factors. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2015;78(11):673-677.
5. Bennet LR. Infertility, Adoption, and Family Formation in Indonesia. *Journal Medical Anthropology Cross-Cultural Studies in Health and Illness*. 2017;37:2.
6. Sadhegi MR. The 40th Anniversary of IVF: Has ART's Success Reached Its Peak?. *J Reprod Infertil*. 2018; 19(2):67-68.
7. Halim B, Lubis HP, Novia D, Thaharuddin M. Does oval oocyte have an impact on embryo development in *in vitro* fertilization?. *JBRA Assist Reprod*. 2017;21(1):15-18.
8. Rahiminia T, Faramarzi A, Khoradmehr A, Khalili MA. Cumulus Co-Culture System Does Not Improve the In-Vitro Maturation (IVM) of Oocytes in Mice. *Middle East Fertility Society Journal*. 2016; 21(2):109-113.
9. Keshavarzi S, Salehi M, Farifteh-Nobijari F, Hosseini T, Hosseini S, Ghazifard A, Novin MG, Fallah-Omrani V, Nourozian M, Hosseini A. Melatonin Modifies Histone Acetylation during In Vitro Maturation of Mouse Oocytes. *Cell J*. 2018;20(2):244-249.

10. Kang JT, Kwon DK, Park SJ, Kim SJ, Moon JH, Koo OJ, Jang G, Lee BC. Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. *J Vet Sci.* 2013;14(1):15–20.
11. Zullo G, Alberio G, Neglia G, De Canditiis C, Bifulco G, Campanile G, Gasparrini B. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. *Theriogenology.* 2016;85(4):688–69.
12. Remião MH, Lucas CG, Domingues WB, Silveira T, Barther NN, Komninou ER, Basso AC, Jornada DS, Beck RC, Pohlmann AR, Junior AS, Seixas FK, Campos VF, Guterres SS, Collares T. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reproductive Toxicology.* 2016;63:70–81.
13. Jin JX, Lee S, Khoirinaya C, Oh A, Kim GA, Lee BC. Supplementation with spermine during in vitro maturation of porcine oocytes improves early embryonic development after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. *Journal of Animal Science.* 2016;94(3):963–970.
14. Li Y, Wang J, Zhang Z, Yi J, He C, Wang F, Tian X, Yan M, Song Y, He P, Liu G. Resveratrol compares with melatonin in improving in vitro porcine oocyte maturation under heat stress. *Journal of Animal Science and Biotechnology.* 2016;7:33.
15. Mukherjee A, Malik H, Saha AP, Dubey A, Singhal DK, Boateng S, Saugandhika S, Kumar S, De S, Guha SK, Malakar D. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2014;31(2):229–239.
16. Seo-Jin P, So K, Hyun S. Effect of zeaxanthin on porcine embryonic development during in vitro maturation. *J Biomed Res.* 2017;31(2):154–161.
17. Moghadam FD, Baharara J, Balanezhad SZ, Jalali M, Amini E. Effect of *Holothuria leucospilota* extracted saponin on maturation of mice oocyte and granulosa cells. *Res Pharm Sci.* 2016;11(2):130–137.
18. Spinaci M, Bucci D, Muccilli V, Cardullo N, Nerozzi C, Galeati G. A polyphenol-rich extract from an oenological oak-derived tannin influences in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology.* 2019;129:82–89.
19. Martino NA, Ariu F, Bebbere D, Uranio MF, Chirico A, Marzano G, Sardanelli AM, Cardinali A, Minervini F, Bogliolo L, Aquila MED. Supplementation with nanomolar concentrations of verbascoside during in vitro maturation improves embryo development by protecting the oocyte against oxidative stress: a large animal model study. *Reproductive Toxicology.* 2016;65:204–211.
20. Cruz MHC, Cruz JF, Reiter RJ, Schwarz KL, Castro FC, Cunha MCRV, Leal CLV. Effect of melatonin supplementation during in vitro maturation on intracellular ROS levels in porcine oocytes. *Reproduction Abstracts.* 2014;1:P192.
21. Farsi MM, Kamali N, Pourghasem M. Embryological Aspects of Oocyte In Vitro Maturation. *Int J Mol Cell Med.* 2013;2(3):99–109.
22. Salimi M, Salehi M, Farahani RM, Dehghani M, Abadi M, Novin MG, Nourozian M, Hosseini A. The Effect of Melatonin on Maturation, Glutathione Level and Expression of H MGB1 Gene in Brilliant Cresyl Blue (BCB) Stained Immature Oocyte. *Cell J.* 2014;15(4):294–301.
23. Asgari Z, Ghasemian F, Ramezani M, Bahadori MH. The Effect of Melatonin on The Developmental Potential and Implantation Rate of Mouse Embryos. *Cell J.* 2012;14(3):203–208.
24. Curnow EC, Ryan JP, Saunders DM, Hayes ESS. In vitro developmental potential of macaque oocytes, derived from unstimulated ovaries, following maturation in the presence of glutathione ethyl ester. *Human Reproduction.* 2010;25(10):2465–2474.
25. Chowdury MMR, Choi BH, Khan I, Lee KL, Mesalam A, Song SH, Xu L, Joo MD, Afrin F, Kong I. Supplementation of lycopene in maturation media improves bovine embryo quality in vitro. *Theriogenology.* 2017;103:173–184.
26. Das K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2014.
27. Sandoval-Acuña C, Ferreira J, Speisky H. Polyphenols and Mitochondria: An Update on Their Increasingly Emerging ROS-Scavenging Independent Actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2014;559:75–90.
28. Abdel-Daim MM, Abo-EL-Sooud K, Aleya L, Bungău SG, Najda A, Saluja R. Alleviation of Drugs and Chemicals Toxicity: Biomedical Value of Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2018;2.
29. Bouayed J, Bohn T. Exogenous Antioxidants—Double-Edged words in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses Versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(4):228–237.