

Effect of L- carnitine on Developmental Competence of Mouse Oocytes Selected by Brilliant Cresyl Blue Staining after Parthenogenesis

Zohreh Zare¹,
Reza Masteri Farahani²,
Moslem Mohammadi³

¹ Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received June 8, 2014 Accepted November 2, 2015)

Abstract

Background and purpose: Embryos produced from in vitro assisted reproductive technologies (ART) manipulations, such as parthenogenesis, are less developmentally competent than in vivo-derived embryos. This study was designed to evaluate the effect of L-carnitine treatment during IVM on maturation of immature oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining, and their subsequent developmental competence after parthenogenesis.

Materials and methods: Immature oocytes collected from NMRI mice ovaries were stained with BCB for 90 min. BCB+ oocytes (with blue color cytoplasm) were then cultured in tissue culture medium (TCM) 199 with 0.0, 0.3 and 0.6 mg/ml L-carnitine at 37 °C and 5% CO₂ under maximum humidity. After 24 hours, nuclear maturation (using Hoechst staining) and cytoplasmic maturation (by measuring the intracellular glutathione (GSH) concentration with monochlorobimane) were recorded in metaphase II oocytes. Cleavage rate, blastocyst development rates (BDR) and total cell number of blastocyst were also determined after parthenogenesis.

Results: Both L-carnitine concentrations significantly increased GSH ($P<0.01$), nuclear maturation ($P<0.01$) and BDR ($P<0.05$) compared with those in the control group. L-carnitine had no significant effect on cleavage rate and total blastocyst cell numbers.

Conclusion: These results demonstrated that L-carnitine supplementation during IVM of immature BCB+ oocytes could increase developmental competence of oocytes after parthenogenesis, possibly by improvement of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes.

Keywords: Brilliant Cresyl Blue, staining, L- carnitine, mice, oocyte, parthenogenesis

اثر ال-کارنیتین بر صلاحیت تکوینی جنین های حاصل از تخمک های brilliant cresyl blue آمیزی شده با رنگ بعد از پارتنوژنز

زهرة زارع^۱
رضا ماستری فراهانی^۲
مسلم محمدی^۳

چکیده

سابقه و هدف: جنین های آزمایشگاهی حاصل از تکنیک های کمک باروری (ART) مانند پارتنوژنز صلاحیت تکوینی پایین تری نسبت به جنین های تولید شده در محیط *in vivo* دارند. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر تیمار با ال-کارنیتین طی IVM بر بلوغ تخمک های نابالغ انتخاب شده توسط رنگ آمیزی brilliant cresyl blue (BCB) و شایستگی تکوینی بعدی آن ها بعد از پارتنوژنز طراحی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، تخمک های نارس از تخمدان موش های سوری نژاد NMRI جمع آوری و با رنگ BCB به مدت ۹۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. سپس تخمک های نارس BCB+ (با سیتوپلاسم آبی رنگ) به محیط کشت بافت TCM1۹۹ حاوی غلظت های مختلف ال-کارنیتین (۰، ۰/۳، ۰/۶ mg/ml) منتقل و در انکوباتور ۳۷ °C و ۵٪ CO₂ درصد قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، میزان بلوغ هسته ای (با استفاده از رنگ آمیزی هوخست) و بلوغ سیتوپلاسمی (با استفاده از اندازه گیری میزان گلوکوتایون از طریق رنگ آمیزی مونوکلروبیامین) در تخمک های متافاز II بررسی گردید. هم چنین میزان کلیواژ، میزان تکوین بلاستوسیست (BDR) و تعداد کل سلول های بلاستوسیست بعد از پارتنوژنز محاسبه شد.

یافته ها: تیمار با هر دو غلظت ال-کارنیتین باعث افزایش میزان گلوکوتایون ($p < 0/01$)، بلوغ تخمک ها ($p < 0/01$) و BDR ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل شد. با این وجود تیمار با ال-کارنیتین بر میزان کلیواژ و تعداد کل سلول های بلاستوسیست تاثیر آماری معنی داری نداشت.

استنتاج: یافته های مطالعه حاضر نشان داد که تیمار تخمک های نابالغ BCB+ موش سوری با ال-کارنیتین طی IVM، احتمالاً با بهبود بلوغ هسته ای و سیتوپلاسمی تخمک ها باعث افزایش صلاحیت تکوینی جنین های حاصل از پارتنوژنز می شود.

واژه های کلیدی: رنگ آمیزی، BCB، ال-کارنیتین، تخمک، موش سوری، پارتنوژنز

مقدمه

پیشرفت های اخیر در تکنیک های کمک باروری (Assisted reproductive technique-ART) مانند (transfer-SCNT) و پارتنوژنز (parthenogenesis)، انتقال هسته سلول سوماتیک (Somatic cell nuclear

E-mail: Mohammadimo@yahoo.com

مؤلف مسئول: مسلم محمدی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشیار، گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۳/۱۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۱۱

امکان ایجاد حیوانات در گونه‌های مختلف و هم‌چنین ایجاد حیوانات ترانسژنیک که حامل ژن‌های خاصی هستند را فراهم آورده است (۳-۱). پارتوژنز (بکرزایی) به فرآیندی اطلاق می‌شود که در آن تخمک بالغ بدون لقاح با اسپرم تا مرحله بلاستوسیست تکوین می‌یابد (۴). بلاستوسیست‌های حاصله منبع بالقوه‌ای برای تولید سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells-ESCs) محسوب می‌شوند و کارآیی این ESCها در بیمارانی که نیاز به جایگزینی بافت آسیب دیده دارند، بسیار با ارزش است (۵). به علاوه، این منبع جایگزینی ESCها، فاقد ملاحظات اخلاقی، مذهبی، حقوقی و سیاسی است که در مورد سلول‌های بنیادی جنینی انسان مطرح است (۴). جنین‌های حاصل از پارتوژنز ابزار مفیدی برای بررسی در زمینه شرایط محیط کشت، تیمار با مواد شیمیایی مختلف و بسیاری از متغیرهای معمول آزمایشگاهی نیز به حساب می‌آیند (۶). با این حال، این جنین‌ها صلاحیت تکوینی پایین‌تری نسبت به جنین‌های تولید شده در محیط *In vivo* دارند و تعداد کمی از این جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست می‌رسند (۳). به منظور بهبود بازده تکنیک‌های کمک باروری باید همه مراحل از جمله کیفیت تخمک و شرایط محیط کشت بهبود یابد (۷،۸). کیفیت خود تخمک یکی از فاکتورهای مهم در بقا و تکوین جنین‌های حاصل از ART می‌باشد. یک روش مناسب برای انتخاب تخمک‌ها، استفاده از رنگ حیاتی BCB (Brilliant cresyl blue) است. این رنگ فعالیت آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز (G6PDH) را مشخص می‌کند. آنزیم G6PDH در زمان رشد تخمک موش سوری تولید می‌شود و فعالیتش تا پایان فاز رشد تخمک خاتمه می‌یابد. این آنزیم قادر به تجزیه رنگ BCB است (۹،۱۰) و رنگ BCB وابسته به فعالیت این آنزیم، سیتوپلاسم سلول را آبی (BCB+) یا بی‌رنگ (BCB-) می‌کند. مطالعات قبلی نشان داده است که تخمک‌های BCB+ ظرفیت بلوغ و تکوینی بیش‌تری نسبت به تخمک‌های BCB- دارند (۱۱-۱۳). تخمک یا

جنین در محیط کشت به‌طور اجتناب‌ناپذیری در معرض استرس‌های اکسیداتیو قرار می‌گیرد. استرس‌های اکسیداتیو یکی از فاکتورهای بالقوه برای کاهش کیفیت جنین‌ها طی سیکل ART به‌شمار می‌روند (۱۴)؛ در مقابل، آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در حفاظت از جنین‌ها دارند (۱۵). ال-کارنیتین آزاد (β -هیدروکسیل-N- γ -تری‌متیل بوتیریک اسید) ماده‌ای با قطبیت بالا و محلول در آب است (۱۶) که دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی است و از غشای سلول، غشای میتوکنندری و DNA در برابر اثرات گونه‌های اکسیژن واکنشی (Reactive oxygen species -ROS) محافظت می‌نماید (۱۷). ال-کارنیتین با فراهم کردن یک سیستم انتقالی برای اسیدهای چرب آزاد و مشتقات اسیل-کوآنزیم A به میتوکنندری، نقش کلیدی در بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره بلند دارد و در نتیجه می‌تواند انرژی مورد نیاز برای تکوین جنین‌ها را فراهم کند (۱۸). در مطالعه‌ای که توسط Giorgi و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد، مشخص گردید که تیمار تخمک‌های نابالغ گاو با مایع فولیکولی زنان مبتلا به اندومتروز در محیط بلوغ تخمک (*In vitro* maturation -IVM) باعث تخریب ساختار کروماتین و دوک تقسیم در تخمک‌های بالغ می‌شود. با این وجود تیمار همزمان تخمک‌ها با ال-کارنیتین و مایع فولیکولی زنان مبتلا به اندومتروز طی IVM باعث بهبود این آسیب‌ها می‌شود (۱۹). بنابراین ال-کارنیتین ممکن است در ART باعث بهبود نتیجه بارداری در بیمارانی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و اندومتروز شود (۲۰). به علاوه ال-کارنیتین در محیط کشت تخمک‌های خوک با کاهش آپوپتوز در سلول‌های کومولوس و بهبود فعالیت میتوکنندری‌های تخمک باعث افزایش صلاحیت میوزی تخمک‌ها شده است (۲۱).

با توجه به مطالب ذکر شده، می‌توان احتمال داد که تیمار تخمک‌های نابالغ انتخاب شده با رنگ آمیزی BCB توسط ال-کارنیتین در طی IVM بر تکوین جنین‌ها مؤثر باشد. بنابراین در این تحقیق اثر تیمار تخمک‌های

رنگ آمیزی BCB

بلافاصله بعد از جمع آوری و شستشوی COC ها در قطره‌های FHM (Flushing-holding medium)، آن‌ها به قطره های ۳۰ میکرولیتری از محیط KSOM (K⁺-modified simplex optimized medium) حاوی ۴ درصد BSA (Bovine serum albumin) و ۲۶ میکرومولار رنگ BCB منتقل و به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷°C قرار داده شدند. بعد از شستشو در محیط FHM با استفاده از یک استریومیکروسکوپ، تخمک‌های نارس با هر درجه رنگ گرفتگی سیتوپلاسم به عنوان تخمک های BCB+ انتخاب شده و به محیط IVM منتقل شدند.

بلوغ تخمک نارس

تخمک‌های نارس BCB+ در محیط TCM 199 حاوی FBS (۱۰ درصد)، ۱۷-بتا استرادیول (۱ μg/ml)، سدیم پیرووات (۲۴/۲ mg/l)، LH (۱۰ μg/ml) و FSH (۱۰ μg/ml) شستشو داده شده و سپس تخمک‌ها به طور تصادفی به قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط IVM با غلظت های مختلف ال-کارنیتین (۰/۶ و ۰/۳) و فاقد ال-کارنیتین (گروه کنترل) منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷°C با فشار ۵ درصد CO₂ قرار داده شدند. غلظت های مورد استفاده بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شدند (۱۵).

بررسی بلوغ سیتوپلاسمی تخمک‌ها

در این تحقیق برای بررسی میزان بلوغ سیتوپلاسمی، میزان گلو تاتیون (GSH) درون تخمک‌ها با استفاده از رنگ MCB (Monochlorobimane) اندازه گیری شد. MCB ماده‌ای غیر فلورسنت است که وقتی با GSH واکنش می‌دهد یک محصول فلورسنت تولید می‌کند (۲۲). بعد از ۲۴ ساعت، COC ها به مدت یک دقیقه به قطرات هیالورونیداز (۱ mg/ml) منتقل و با پیتینگ مکرر، سلول های کومولوس از تخمک‌ها جدا شدند. سپس، تخمک‌ها به محیط KSOM حاوی ۵۰

نابالغ BCB+ با ال-کارنیتین طی IVM را بر بلوغ تخمک و صلاحیت تکوینی جنین های حاصل از پارتوژنز تا مرحله قبل از لانه گزینی مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش ها

بسه جـز محیط 199 TCM (Tissue culture medium 199) که از شرکت GIBCO تهیه شد، بقیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA) خریداری شدند.

حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه از نوع تجربی بوده و از ۴۰ سر موش سوری ماده ۶ تا ۸ هفته ای نژاد NMRI استفاده شد. موش‌ها پس از ورود به حیوان خانه حداقل به مدت یک هفته نگهداری شدند تا با شرایط موجود سازش پیدا کنند. حیوانات تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۲-۲۰°C نگهداری می‌شدند و آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند.

تهیه تخمک نارس

موش‌ها ۱۰ واحد هورمون PMSG (Pregnant mare's serum gonadotropin) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و پس از ۴۸ ساعت به روش قطع نخاع گردنی کشته شدند. در ادامه در شرایط استریل تخمدان موش‌ها از کالبد موش خارج و به داخل محیط HTCM (Hepese tissue culture medium 199) شامل ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) انتقال داده شد. در این محیط چربی اضافی اطراف تخمدان حذف گردید. در مرحله بعد با استفاده از سرنگ‌های سایز ۲۸، تخمک های نارس دارای ژرمینال وزیکول به همراه سلول‌های گرانولوزای اطرافشان از آنترال فولیکول‌های موجود در بافت تخمدان خارج و COC ها (Cumulus-oocyte complexes) با کیفیت مورفولوژیکی خوب برای مراحل بعدی انتخاب شدند.

گردید. تعداد کل سلول‌ها در بلاستوسیست‌ها در هر گروه با استفاده از رنگ آمیزی هوخست و میکروسکوپ فلورسنت مشخص شد.

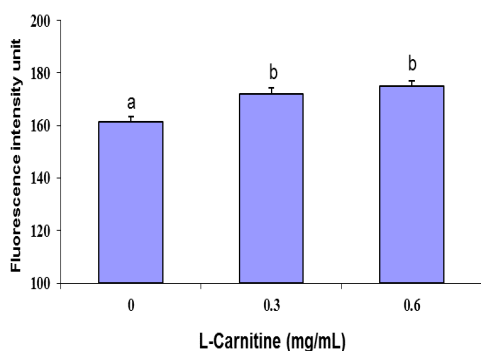
آنالیز آماری

در این تحقیق، تمامی آزمایشات دوبار تکرار شدند. برای آنالیز آماری داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و در صورت وجود اختلاف آماری از پس آزمون Tukey جهت تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها استفاده شد. $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر ال-کارنیتین بر میزان GSH داخل سلولی

گلو تاتیون داخل سلولی تخمک‌ها، بعد از IVM با استفاده از رنگ آمیزی MCB و نرم افزار Image J اندازه گیری شد. همان‌طور که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است، تیمار با ال-کارنیتین طی IVM باعث افزایش معنی‌دار ($p < 0.01$) میزان GSH در تخمک‌های بالغ BCB+ ($172/08 \pm 1/9$) و $174/96 \pm 2/1$ به ترتیب برای گروه‌های ۰/۳ و ۰/۶ ال-کارنیتین) در مقایسه با گروه کنترل ($161/53 \pm 1/9$) شد.



تصویر شماره ۱: اثر ال-کارنیتین بر میزان GSH در تخمک‌های بالغ موش سوری BCB+ طی IVM. داده‌ها به صورت mean \pm S.E.M. ارائه شده‌اند. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ($p < 0.01$) می‌باشد.

میکرولیتر MCB منتقل و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۵ درصد CO_2 و دمای 37°C قرار داده شدند. با استفاده از یک میکروسکوپ فلورسنت معکوس با فیلتر تحریکی ۳۹۰ نانومتر و نرم افزار Image J، شدت فلورسنت مربوط به میزان گلو تاتیون تخمک‌های بالغ اندازه گیری شد.

بررسی بلوغ هسته ای تخمک‌ها

تخمک‌ها با استفاده از هیالورونیداز (1 mg/ml) و پیپتینگ مکرر از سلول‌های کومولوس اطرافشان جدا شدند. سپس برای بررسی بلوغ هسته‌ای تخمک‌ها از رنگ هوخست ۳۳۴۲ (Hoechst 33342) ($10 \mu\text{g/ml}$) استفاده شد. با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت معکوس در هر گروه تعداد تخمک‌های متافاز I (با یک صفحه متافازی اما بدون جسم قطبی) و متافاز II (با یک صفحه متافازی و یک جسم قطبی) شمارش و درصد آن‌ها محاسبه شد.

انجام پارتنوژنز و کشت جنین‌ها

حدود ۲۰۰ تخمک بالغ در هر گروه به قطرات ۳۰ میکرولیتری محیط کشت KSOM حاوی سایتوکالازین B ($5 \mu\text{g/ml}$) و استرانشیوم کلراید (10 mM) انتقال داده شدند. سپس دیش حاصل به مدت ۶ ساعت در انکوباتور ۵ درصد CO_2 و رطوبت مناسب انکوبه شد. در ادامه تخمک‌های فعال شده در گروه‌های ۲۰-۱۵ عددی به قطرات ۳۰ میکرولیتری محیط کشت KSOM حاوی ۴ درصد BSA (که حدود یک ساعت قبل داخل انکوباتور گرم شده بود) منتقل شدند و به مدت ۵ روز داخل انکوباتور 37°C با فشار ۵ درصد CO_2 باقی ماندند. روز فعال‌سازی تخمک‌ها به عنوان روز صفر در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت بعد از آن جنین‌های حاصل به مرحله دو سلولی خواهند رسید. در این زمان تعداد جنین‌های دو سلولی برای به دست آوردن میزان کلیواژ در هر گروه شمارش شدند. در روز ۵ تعداد بلاستوسیست‌های حاصل در هر گروه شمارش و میزان تکوین بلاستوسیست (Blastocyst development rate -BDR) محاسبه

اثر ال-کارنیتین بر تکوین جنین‌ها بعد از پارتوژنز
 نتایج مربوط به تکوین جنین‌ها بعد از پارتوژنز تخمک‌های BCB+ در جدول شماره ۲ آورده شده است. ۲۴ ساعت بعد از فعال‌سازی تخمک، تعداد جنین‌های دو سلولی شمارش شده و میزان کلیواژ محاسبه شد. میزان کلیواژ جنین‌ها در گروه‌های تیمار شده با ال-کارنیتین $71/60 \pm 1/1$ درصد و $73/22 \pm 2/1$ درصد به ترتیب برای گروه‌های $0/6$ ال-کارنیتین) نسبت به گروه کنترل ($69/30 \pm 2/1$ درصد) افزایش داشت، ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود.

جدول شماره ۲: اثر تیمار با ال-کارنیتین طی IVM تخمک‌های BCB+ موش سوری بر تکوین جنین‌ها بعد از پارتوژنز

گروه	تعداد جنین‌های کشت شده	تکوین جنین	
		میزان کلیواژ (درصد)	تعداد کل سلول‌های بلاستوسیست (درصد)
کنترل	۲۰۱	$69/30 \pm 2/1$	$56/62 \pm 2/2$
۰.۳ mg/ml LC	۲۰۴	$71/60 \pm 1/1$	$58/37 \pm 2/0.1$
۰.۶ mg/ml LC	۱۹۹	$73/22 \pm 2/1$	$58/55 \pm 1/7.6$

داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده‌اند.

* $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل

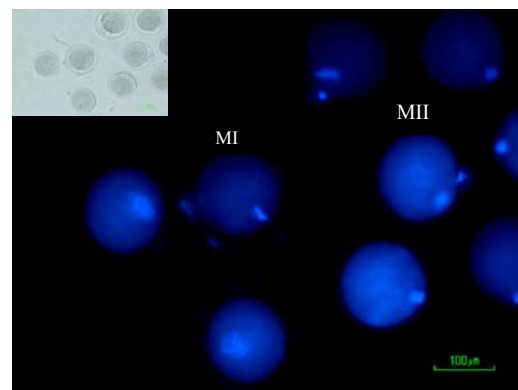
LC: ال-کارنیتین

در روز پنجم بعد از فعال‌سازی تخمک‌ها، تعداد بلاستوسیست‌ها شمارش شده و میزان BDR محاسبه شد. تیمار با ال-کارنیتین طی IVM باعث افزایش معنی‌دار BDR ($71/60 \pm 1/1$ درصد و $73/22 \pm 2/1$ درصد به ترتیب برای گروه‌های $0/6$ ال-کارنیتین) در مقایسه با گروه کنترل ($69/30 \pm 2/1$ درصد) شد ($p < 0/05$).

اثر ال-کارنیتین بر تعداد بلاستوسیست

بلاستوسیست‌های حاصل از پارتوژنز در هر سه گروه با استفاده از رنگ هوخست رنگ شده و سپس تعداد کل آن‌ها (با هسته‌های آبی) با استفاده از میکروسکوپ معکوس فلورسنت شمارش شد. همان‌طور که در جدول شماره ۲ آورده شده است، تیمار تخمک‌ها با ال-کارنیتین طی IVM بر تعداد کل

اثر ال-کارنیتین بر بلوغ هسته‌ای تخمک‌های نارس BCB+
 برای بررسی بلوغ هسته‌ای تخمک‌های نارس از رنگ آمیزی هوخست ۳۳۳۴۲ استفاده کردیم (تصویر شماره ۲). نتایج مربوط به میزان بلوغ تخمک‌های نابالغ موش سوری بعد از IVM در جدول شماره ۱ آورده شده است. درصد تخمک‌هایی که به مرحله MII رسیدند، در هر دو گروه تیمار شده با ال-کارنیتین ($74/15 \pm 2/9$ و $76/06 \pm 1/7$ به ترتیب برای گروه $0/3$ و $0/6$ ال-کارنیتین) به طور معنی‌داری بالاتر ($p < 0/01$) از گروه کنترل ($61/38 \pm 2/9$) بود. اختلاف آماری معنی‌داری در درصد تخمک‌های MI بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد.



تصویر شماره ۲: تخمک‌های رنگ آمیزی شده با رنگ فلورسنت هوخست ۳۳۳۴۲. MI: تخمک متافاز یک با یک صفحه متافازی بدون جسم قطبی، MII: تخمک متافاز دو با یک صفحه متافازی و یک جسم قطبی

جدول شماره ۱: اثر تیمار با ال-کارنیتین طی IVM بر بلوغ هسته‌ای تخمک‌های BCB+

گروه	تعداد COC	MI n (%)	MI n (%)
کنترل	۲۰۲	$45(22/01 \pm 2/5)$	$125(61/38 \pm 2/9)$
۰.۳ mg/ml LC	۱۹۴	$41(20/43 \pm 1/9)$	$138(74/15 \pm 2/4)^*$
۰.۶ mg/ml LC	۱۹۹	$40(20/01 \pm 1/2)$	$150(76/06 \pm 1/7)^*$

داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده‌اند.

* $p < 0/01$ در مقایسه با گروه کنترل

LC: ال-کارنیتین

COC: کمپلکس تخمک-کومولوس

MI: تخمک متافاز یک با یک صفحه متافازی بدون جسم قطبی

MI: تخمک متافاز دو با یک صفحه متافازی و یک جسم قطبی

بلاستوسیست ها ($58/37 \pm 2/01$ و $59/5 \pm 1/76$ به ترتیب برای گروه های ۰/۳ و ۰/۶ ال-کارنیتین) نسبت به گروه کنترل ($56/62 \pm 2/2$) اثر آماری معنی دار نداشت.

بحث

براساس نتایج مطالعه حاضر، تیمار با هر دو غلظت ال-کارنیتین باعث افزایش میزان GSH، بلوغ تخمک ها و BDR در مقایسه با گروه کنترل شد. با این وجود ال-کارنیتین بر میزان کلیواژ و تعداد کل سلول های بلاستوسیست تاثیر آماری معنی داری نداشت. اولین گزارش ها مربوط به تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی در سال های ۱۹۵۰ تا ۱۹۶۰ منتشر شد. از آن زمان تاکنون پیشرفت های قابل ملاحظه ای در زمینه ART رخ داده است (۲۳). با این وجود، ظرفیت تکوینی تخمک های بالغ شده در شرایط *In vitro* نسبت به تخمک های بالغ شده در شرایط *In vivo* پایین تر است (۲۴). یک روش مناسب برای انتخاب تخمک های با کیفیت، استفاده از رنگ حیاتی BCB است (۱۰). در تحقیقی مشخص شد که میزان نسخه ها (Transcripts) از ژن های درگیر در بیوژن میتوکندری در تخمک های BCB+ به طور قابل توجهی بالاتر از تخمک های BCB- است که این ممکن است یکی از علت های شایستگی تکوینی بالاتر تخمک های BCB+ باشد (۲۵). اضافه کردن آنتی اکسیدان ها به محیط کشت تخمک روش مناسبی برای کاهش اثرات سوء رادیکال های آزاد اکسیژن و در نهایت بهبود نتیجه ART است (۸). ال-کارنیتین یک متابولیت ضروری برای تولید انرژی و متابولیسم گلوکز است که دارای خواص آنتی اکسیدانی نیز می باشد (۲۶). تیمار با ال-کارنیتین از طریق بهبود در مسیر β -اکسیداسیون می تواند باعث بهبود نقایص سیتوپلاسمی تخمک شود (۲۱). میزان GSH در تخمک مرحله MII بالاتر از تخمک مرحله ژرمینال و زیکول (GV - Germinal vesicle) است، اما بعد از لقاح غلظت آن به میزان قابل توجهی کاهش می یابد. بنابراین میزان GSH در تخمک یک

شاخص مناسب برای بررسی بلوغ سیتوپلاسمی تخمک است (۲۸، ۲۷). افزایش میزان GSH در تخمک باعث تحریک تشکیل پیش هسته نر (Male pronuclear) و هم چنین بهبود صلاحیت تکوینی تخمک و جنین به دلیل محافظت از آن ها در برابر رادیکال های آزاد می شود (۲۹، ۳۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اضافه کردن هر دو غلظت ال-کارنیتین به محیط بلوغ تخمک ها باعث افزایش میزان گلوکوتایون داخل سلولی شد، این نتیجه در توافق با یافته های مطالعه ای است که در سال ۲۰۱۱ انجام شد و در آن تیمار تخمک های خوک با $0/5 \text{ mg/ml}$ ال-کارنیتین طی IVM باعث افزایش میزان گلوکوتایون و بهبود صلاحیت تکوینی جنین های حاصل از پارتوژنر شد (۳۱).

ال-کارنیتین با فراهم کردن یک سیستم عبوری برای انتقال اسیدهای چرب آزاد از سیتوزول به میتوکندری نقش کلیدی در بتا-اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره بلند و در نهایت تولید ATP دارد (۱۸). از طرفی مهار بتا-اکسیداسیون منجر به اختلال در بلوغ تخمک و تکوین جنین می شود. متابولیسم اسیدهای چرب در COC ها توسط فاکتورهای فیزیولوژیکی مادری و شرایط کشت *In vitro* تنظیم می شود و برای صلاحیت تکوینی تخمک اهمیت دارد (۳۲، ۳۳). تیمار تخمک های نابالغ خوک با ال-کارنیتین طی IVM از طریق بهبود فعالیت میتوکندریایی تخمک و جلوگیری از آپوپتوز سلول های کومولوس باعث بهبود بلوغ هسته ای تخمک می شود (۳۴). در تحقیق حاضر، تیمار با هر دو غلظت ال-کارنیتین باعث بهبود میزان بلوغ هسته ای تخمک ها شد. در توافق با یافته های ما Wu و همکاران بیان کردند که اضافه کردن ال-کارنیتین به محیط بلوغ تخمک خوک باعث بهبود بلوغ هسته ای تخمک و افزایش تکوین جنین ها تا مرحله بلاستوسیست به دنبال IVF می شود (۳۵). می توان گفت ال-کارنیتین از طریق افزایش میزان گلوکوتایون باعث بهبود بلوغ سیتوپلاسمی و از طریق بهبود صلاحیت میوزی باعث بهبود بلوغ هسته ای

دارند (۴۳،۴۲). بلاستوسیسست‌های BCB+ دارای تعداد کل سلول‌های بیش‌تر و تعداد سلول‌های آپوتوتیک کم‌تری نسبت به بلاستوسیسست‌های BCB- هستند (۴۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار تخمک‌ها با هر دو غلظت ال-کارنیتین طی IVM بر تعداد کل سلول‌ها در بلاستوسیسست تأثیری نداشت. در توافق با این نتایج، در تحقیقی مشخص شد تیمار تخمک‌های خوک با غلظت‌های مختلف ال-کارنیتین (۱ mg/ml و ۰/۵، ۰/۲۵) طی IVM بر تعداد سلول‌های بلاستوسیسست‌های حاصل از پارتوژنز اثری نداشت (۳۵). به علاوه نتایج مطالعه Chankitisakul و همکاران در سال ۲۰۱۳ حکایت از افزایش میزان BDR تخمک‌های گاو تیمار شده با ال-کارنیتین (۰/۶ mg/ml) طی IVM داشت. با این وجود اختلافی در تعداد سلول‌های تروفواکتودرم و توده سلولی داخلی بلاستوسیسست‌ها بین گروه‌ها مشاهده نشد (۴۵). هرچند مکانیسم‌های مولکولی درگیر که منجر به این اثرات ال-کارنیتین می‌شود، دقیقاً مشخص نیست و نیاز به مطالعات بیش‌تری دارد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که براساس نتایج مطالعه حاضر، تیمار تخمک‌های انتخاب شده با رنگ‌آمیزی BCB با ال-کارنیتین طی IVM از طریق بهبود بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک اثرات مثبتی بر تکوین جنین‌های حاصله داشت. ممکن است استفاده از ال-کارنیتین در کلینیک‌های ناباروری برای بهبود بازده باروری در زوج‌های نابارور مفید باشد.

References

1. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 407(6800): 86-90.
2. Staunstrup NH, Madsen J, Primo MN, Li J, Liu Y, Kragh PM, et al. Development of transgenic cloned pig models of skin

تخمک‌ها می‌شود. مراحل بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای تخمک نقش مهمی در صلاحیت تکوینی تخمک و در نهایت کیفیت جنین دارند (۳۶). نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که در تخمک‌های BCB+، میزان فاکتور پیش‌برنده بلوغ تخمک (Maturation-promoting factor) و فعالیت میتوکندریایی بالاتر است. به علاوه این تخمک‌ها صلاحیت تکوینی بیش‌تری برای رسیدن به مرحله بلاستوسیسست دارند (۳۷-۳۹). براساس یافته‌های ما، میزان کلیواژ در تخمک‌های BCB+ تیمار شده با ال-کارنیتین نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی را نشان نداد. تیمار تخمک‌ها با هر دو غلظت ال-کارنیتین باعث افزایش معنی‌دار میزان BDR شد. در توافق با یافته‌های ما، You و همکاران بیان کردند که تیمار تخمک‌های خوک با ۱۰ میلی‌مولار ال-کارنیتین طی IVM باعث افزایش میزان BDR در جنین‌های حاصل از پارتوژنز و SCNT شد، ولی بر میزان کلیواژ و تعداد سلول‌های بلاستوسیسست اثری نداشت (۴۰). در تحقیقی دیگر که در سال ۲۰۱۳ توسط Phongnimitr و همکاران انجام شد، مشخص گردید که تیمار تخمک‌های گاو با غلظت‌های ۰/۳ mg/ml و ۰/۶ mg/ml ال-کارنیتین طی IVM باعث بهبود میزان بلوغ تخمک‌ها می‌شود. هم‌چنین افزایش میزان BDR در اثر تیمار با غلظت ۰/۶ mg/ml ال-کارنیتین طی IVM مشاهده شد (۴۱).

تعداد بلاستوسیسست‌ها یکی از پارامترهای مهم در بررسی کیفیت آن‌ها به حساب می‌آید و بلاستوسیسست‌های با تعداد سلول بیش‌تر احتمال بالاتری برای لانه‌گزینی

inflammation by DNA transposon-directed ectopic expression of human beta1 and alpha2 integrin. *PLoS One* 2012; 7(5): e36658.

3. Zhou C, Dobrinsky J, Tsoi S, Foxcroft GR, Dixon WT, Stothard P, et al. Characterization of the altered gene expression profile in early porcine embryos generated from

- parthenogenesis and somatic cell chromatin transfer. *PLoS One* 2014; 9(3): e91728.
4. Koh CJ, Delo DM, Lee JW, Siddiqui MM, Lanza RP, Soker S, et al. Parthenogenesis-derived multipotent stem cells adapted for tissue engineering applications. *Methods* 2009; 47(2): 90-97.
 5. Espejel S, Eckardt S, Harbell J, Roll GR, McLaughlin KJ, Willenbring H. Brief report: Parthenogenetic embryonic stem cells are an effective cell source for therapeutic liver repopulation. *Stem Cells* 2014; 32(7): 1983-1988.
 6. Paffoni A, Brevini TA, Gandolfi F, Ragni G. Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. *Placenta* 2008; 29(SupB): 121-125.
 7. Whitworth KM, Li R, Spate LD, Wax DM, Rieke A, Whyte JJ, et al. Method of oocyte activation affects cloning efficiency in pigs. *Mol Reprod Dev* 2009; 76(5): 490-500.
 8. Mizutani E, Ohta H, Kishigami S, Van Thuan N, Hikichi T, Wakayama S, et al. Developmental ability of cloned embryos from neural stem cells. *Reproduction* 2006; 132(6): 849-857.
 9. Roca J, Martinez E, Vazquez JM, Lucas X. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10(6): 479-485.
 10. Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Izquierdo D, Paramio MT. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod Nutr Dev* 2003; 43(2): 179-187.
 11. Alm H, Torner H, Lohrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 2005; 63(8): 2194-2205
 12. Manjunatha BM, Gupta PS, Devaraj M, Ravindra JP, Nandi S. Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology* 2007; 68(9): 1299-1304.
 13. Wu YG, Liu Y, Zhou P, Lan GC, Han D, Miao DQ, et al. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Res* 2007; 17(8): 722-731.
 14. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7(2): 175-189.
 15. Abdelrazik H, Sharma R, Mahfouz R, Agarwal A. L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil Steril*. 2009; 91(2): 589-596.
 16. Cavallini G, Ferraretti AP, Gianaroli L, Biagiotti G, Vitali G. Cinnocicam and L-carnitine/acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. *J Androl* 2004; 25(5): 761-770.
 17. Gülcin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci* 2006; 78(8): 803-811.
 18. Bressler R, Katz RI. The effect of carnitine on the rate of incorporation of precursors into fatty acids. *J Biol Chem* 1965; 240(2): 622-627.
 19. Giorgi VS, Da Broi MG, Paz CC, Ferriani RA, Navarro PA. N-acetyl-cysteine and L-carnitine prevent meiotic Oocyte damage

- induced by follicular fluid from infertile women with mild endometriosis. *Reprod Sci* 2015, pii: 1933719115602772.
20. Mansour G, Abdelrazik H, Sharma RK, Radwan E, Falcone T, Agarwal A. L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2009; 91(5 Suppl): 2079-2086.
 21. Hashimoto S. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *J Reprod Dev* 2009; 55(1): 1-10.
 22. Cook JA, Pass HI, Iype SN, Friedman N, DeGraff W, Russo A, et al. Cellular glutathione and thiol measurements from surgically resected human lung tumor and normal lung tissue. *Cancer Res* 1991; 51(16): 4287-4294.
 23. Bavister BD. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction* 2002; 124(2): 181-196.
 24. Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73(5): 978-983.
 25. Opiela J, Lipinski D, Slomski R, Katska-Ksiazkiewicz L. Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. *Anim Reprod Sci* 2010; 118(2-4): 188-193.
 26. Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J Reprod Dev* 2007; 53(4): 707-715.
 27. Lubberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol* 2005; 5(1): 5-17.
 28. Rausell F, Pertusa JF, Gomez-Piquer V, Hermenegildo C, Garcia-Perez MA, Cano A, et al. Beneficial effects of dithiothreitol on relative levels of glutathione S-transferase activity and thiols in oocytes, and cell number, DNA fragmentation and allocation at the blastocyst stage in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2007; 74(7): 860-869.
 29. Hu YC, Wang PH, Yeh S, Wang RS, Xie C, Xu Q, et al. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(31): 11209-11214.
 30. Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* 1993; 49(1): 89-94.
 31. Vanella A, Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Di Giacomo C, Sorrenti V, et al. L-propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. *Cell Biol Toxicol* 2000; 16(2): 99-104.
 32. Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod* 2010; 83(6): 909-918.
 33. Dunning KR, Russell DL, Robker RL. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and beta-oxidation. *Reproduction* 2014; 148(1): R15-27.
 34. Somfai T, Kaneda M, Akagi S, Watanabe S, Haraguchi S, Mizutani E, et al. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular

- porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23(7): 912-920.
35. Wu GQ, Jia BY, Li JJ, Fu XW, Zhou GB, Hou YP, et al. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology* 2011; 76(5): 785-793.
 36. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006; 65(1): 126-136.
 37. Catala MG, Izquierdo D, Uzbekova S, Morato R, Roura M, Romaguera R, et al. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction* 2011; 142(4): 517-527.
 38. Mohammadi-Sangcheshmeh A, Soleimani M, Deldar H, Salehi M, Soudi S, Hashemi SM, et al. Prediction of oocyte developmental competence in ovine using glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity determined at retrieval time. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(2): 153-158.
 39. Mohammadi-Sangcheshmeh A, Veshkini A, Hajarizadeh A, Jamshidi-Adegani F, Zhandi M, Abazari-Kia AH, et al. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity with oocyte cytoplasmic lipid content, developmental competence, and expression of candidate genes in a sheep model. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31(8): 1089-1098.
 40. You J, Lee J, Hyun SH, Lee E. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves in vitro development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology* 2012; 78(2): 235-243.
 41. Phongnimitr T, Liang Y, Srirattana K, Panyawai K, Sripunya N, Treetampinich C, et al. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. *Anim Sci J* 2013; 84(11): 719-725.
 42. Macháty Z, Day BN, Prather RS. Development of early porcine embryos in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 1998; 59(2): 451-455.
 43. Hao Y, Lai L, Mao J, Im GS, Bonk A, Prather RS. Apoptosis in parthenogenetic preimplantation porcine embryos. *Biol Reprod* 2004; 70(6): 1644-1649.
 44. Su J, Wang Y, Li R, Peng H, Hua S, Li Q, et al. Oocytes selected using BCB staining enhance nuclear reprogramming and the in vivo development of SCNT embryos in cattle. *PLoS One* 2012; 7(4): e36181.
 45. Chankitisakul V, Somfai T, Inaba Y, Techakumphu M, Nagai T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology* 2013; 79(4): 590-598.