Archive of SID

پژوهشی

مجله علمی - پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره پانزدهم، شماره ۴۸، مهر و آبان ۱۳۸۴ (۱۰ - ۱)

تاثیر گلوتاتیون بر از سرگیری میوز، بلوغ و تکوین آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش

حسین ایمانی(Ph.D.)* فاطمه حسنی(M.Sc)** سیدعلی حائری‌روحانی (M.D.)*** محمدحسین نصراصفهانی (Ph.D.)****
مجتبی رضازاده(Ph.D.)***** اعظم دالمن (M.S.)** سعید کاظمی آشتیانی(Ph.D.)* عبدالحسین شاهوردی(MS.c.)******

چکیده

سابقه و هدف : هدف از این مطالعه، بررسی مطالعه تاثیر گلوتاتیون بر از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش و تکوین جنین‌های حاصل از آن است.

مواد و روش‌ها :. تخمک‌های نارس از تخمدان موش‌های سوری نژادNMRI (٦-٤ هفته‌ای) در شرایط استریل جدا شدند، و در ۳ گروه آزمایشی و یک گروه شاهد دسته‌بندی شدند. تخمک‌های گروه شاهد در محیط MEM-α حاوی FCS ۵ درصد،گروه اول (minimum essential medium eagle (Alpha) در محیط MEM-α حاوی FCS درصد، mM 1گلوتاتیون، گروه دوم در محیط MEM-α حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵IUhCG/ml ، ۱۰۰mIUrFSH و تخمک‌های گروه سوم در محیط MEM-α حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵IUhCG/ml ، ۱۰۰mIUrFSH و۱ mMگلوتاتیون قرار داده شدند. تخمک‌های نارس‌جهت‌بلوغ به‌مدت ۲٤ ساعت‌داخل انکوباتور$37^{\circ}c$ با CO_2 پنج‌درصد قرارگرفتند. لقاح و تکوین در محیط T_6انجام شد.

یافته‌ها : میزان از سرگیری میوز در گروه‌های آزمایشی یک(P=0.0001) و سه(P=0.0001) از نظر آماری نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد که در گروه شاهد، اول, دوم و سوم به ترتیب ۷٤/۲۰، ۹۲/۸۸، ۸٤/٤۹، ۸٦/۲۰ درصد بوده است. همچنین میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه‌های آزمایشی یک (P=0.0001) وسه(P=0.0001) از نظر آماری نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد که در گروه‌های آزمایشی به ترتیب ۵۹/۷۷، ۷۹/۲۸، ۵۲/۷٤ و ۷۰ درصد بود. در این مطالعه نرخ تشکیل جنین در روز اول در گروه‌های آزمایشی یک(P=0.001) وسه (P=0.007) نسبت به گروه ۲ اختلاف معنی‌داری را نشان داد واین میزان از گروه شاهد و گروه ۲ که فاقد این ماده بودند، بیش‌تر بود.

استنتاج : نتایج این مطالعه نشان داد گلوتاتیون با غلظتmM ۱ در از سرگیری میوز، شکسته شدن هسته و آزاد شدن اولین جسمک قطبی، بلوغ آزمایشگاهی، لقاح، شکل‌گیری جنین و تکوین آن تاثیر دارد

واژه های کلیدی : بلوغ آزمایشگاهی، تخمک نارس، موش، گلوتاتیون

* متخصص علوم تشریح و آناتومی،(استادیار) دانشگاه علوم پزشکی تهران
** دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی تهران
***** متخصص علوم تشریح و آناتومی(استاد) دانشگاه علوم پزشکی تهران
* تهران: خیابان ولی‌عصر، زعفرانیه، کوی آصف، کوی سیمین، پژوهشکده رویان
*** متخصص فیزیولوژی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی تهران

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

****** دانشجوی دکترای تخصصی علوم تشریح و آناتومی دانشگاه تهران

E تاریخ دریافت : ۸۳/۷/۱ تاریخ انجام اصلاحات: ۸۳/۹/۱۰ تاریخ تصویب: ۸۳/۱۱/۱٤

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

مقدمه

از آن‌جا که آنتی‌اکسیدان‌ها رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) [1] را به دام می‌اندازند، اضافه کردن آن‌ها به محیط کشت مفید است(۱). کشت جنین‌ها در آزمایشگاه تحت فشار اکسیژن بالا (۲۰درصد) نسبت به کشت جنین‌ها تحت فشار O_2 ۵ درصد یا ۷ درصد ممکن است رادیکال‌های آزاد بیش‌تری تولید کند(۳،۲). تعادل بین تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و به دام انداختن آن‌ها، عامل مهمی برای به‌دست آوردن توانایی لقاح در آزمایشگاه است(۴). به نظر می‌رسد جنین‌هایی که در آزمایشگاه کشت داده می‌شوند در معرض رادیکال‌های آزاد اکسیژن قرار می‌گیرند که مکانیسم دفاعی‌شان برای حفاظت از ساختمان‌های سلولی ظریف کافی نیست. اثرات مضر این رادیکال‌های آزاد باعث از بین رفتن عملکرد میتوکندری و آسیب به RNA, DNA و پروتئین می‌شود(۵) و همچنین اتصال اسپرم- تخمک را مهار می‌کند(۶). برای حفاظت تخمک‌ها و جنین ها از فشار اکسیداتیو در طی کشت، اضافه کردن انواع آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط کشت توصیه می‌شود؛ برای‌مثال اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌های آنزیم خارج سلولی از قبیل سوپراکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز یا آنتی‌اکسیدان‌های قابل متابولیزه به محیط کشت پیشنهاد شده است(۷،۱).

گلوتاتیون یک ترکیب سولفیدریل غیرپروتئینی و یک آنتی‌اکسیدان طبیعی می‌باشد که در سلول‌های پستانداران وجود دارد و نقش مهمی را در حفاظت سلول از آسیب‌های اکسیداتیو بازی می‌کند. این ماده در هر دو گامت با مقادیر متفاوت وجود دارد(۸،۱). همزمان با پیشرفت تخمک‌ها از حفره زاینده(GV) [2] به مرحله متافاز II غلظت گلوتاتیون داخل سلولی افزایش می‌یابد، امادرتخمک‌های‌لقاح‌یافته در مرحله پرونوکلئوس مقدار این‌ماده درمقایسه‌با تخمک‌های‌بالغ، پایین‌تر است(۹تا۱۳).

نقش‌های متفاوتی برای گلوتاتیون از جمله انتقال آمینواسید، سنتز DNA و پروتئین و احیای دی‌سولفیدها درنظر گرفته شده است(۱۴). Yamauchi و همکاران (۱۹۹۹) نیز نشان دادند که گلوتاتیون نقش های ذکر شده را در داخل تخمک در حال بلوغ ایفا می‌کند. همچنین گزارش دادند که کمبود گلوتاتیون در تخمک‌ها قبل از لقاح باعث می شود که تشکیل پرونوکلئوس‌نر(MPN) [3] دچارنقصان شود(۱۵) گلوتاتیون هم‌چنین در Decandensation هسته اسپرم همزمان با فعال‌سازی تخمک، تغییر شکل سراسپرم به پرونوکلئوس نردرهنگام لقاح نقش‌دارد(۱۶تا۱۸). سنتزگلوتاتیون‌در طی بلوغ تخمک در موش(۱۰)، هامستر(۱۱) و خوک(۱۲) گزارش شده است. بنابراین سطح گلوتاتیون یافت شده در انتهای بلوغ تخمک‌ها به عنوان یک شاخص بیوشیمیایی خوب برای بقا(Viability) تخمک می‌باشد(۱۳). در طی تکوین و بلوغ تخمک در تخمدان، همانطوری‌که تخمک به زمان تخمک‌گذاری نزدیک می‌شود، محتوی گلوتاتیون داخل سلولی نیز افزایش پیدا می‌کند(۱۱) و این تجمع گلوتاتیون ذخیره‌ای را به‌وجود می‌آورد که سلول را در مراحل بعدی پس از لقاح حفاظت خواهد کرد(۱۹). در تحقیقی گزارش شده است که تخمک‌های لقاح یافته متوقف شده در مرحله دو سلولی در آزمایشگاه در مقایسه با تکوین جنین در بدن محتوی گلوتاتیون کم‌تری دارند و این امر نشان دهنده این است که محتوای گلوتاتیون تخمک و جنین آزمایشگاهی نسبت به بدن کم‌تر است(۱۹). Reed و

1- Reactive Oxygen Species
2- Germinal Vesicle
3- Male pronucleus

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

Gardiner(۱۹۹٤) ثابت کردند که بلاستوسیت موش توانایی‌ساختن‌گلوتاتیون رادارداماجنین‌های‌اولیه‌تا مرحله مورولا توانایی محدودی‌برای‌ساختن این ماده دارند(۲۰).

بلوغ تخمک، مستلزم بلوغ هسته و سیتوپلاسم است.تغییرات مولکولی بی‌شماری از جمله فسفریلاسیون پروتئین‌ها و فعال شدن راه‌های متابولیکی ویژه در بلوغ سیتوپلاسمی دخالت دارند. یکی از این راه‌های متابولیکی، سنتز گلوتاتیون در داخل تخمک می باشد که این ماده بلوغ سیتوپلاسمی را افزایش داده و از این طریق تکوین جنین را بهبود می بخشد(۲۲،۲۱). در تخمک گاو میزان گلوتاتیون بعد از (In Vitro IVM Maturation) نشانگری برای بلوغ سیتوپلاسمی شناخته شده است(۲٤،۲۳). ترکیبات تیولی با وزن مولکولی کم از جمله سیستئامین و بتا مرکاپتواتانول سنتز گلوتاتیون داخل سلولی را افزایش می‌دهند و از این طریق سرعت تکوین جنین را بهبود می‌دهند(۲٤). اضافه کردن سیستئامین در طی IVM به تخمک‌های خوک(۲۵)، گوسفند(۸) و گاومیش(۲٦) به واسطهٔ ساختن گلوتاتیون ودر نتیجه افزایش بلوغ سیتوپلاسمی، سرعت تکوین جنین حاصله را بهبود می‌بخشد و همچنین اثرات مشابهی را با افزودن بتا مرکاپتواتانول در طی IVM بر سنتز گلوتاتیون و تکوین جنین در تخمک‌های گوسفند(۸) گاو(۲۰) و خوک(۲۷) مشاهده کرده‌اند. با توجه به مطالب بالا و آنتی‌اکسیدان بودن، گلوتاتیون، علاوه بر افزایش بلوغ سیتوپلاسمی تخمک‌های نارس میزانROS را نیز کاهش داده و تخمک نارس را از آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. لذا هدف از این مطالعه‌بررسی‌تاثیرگلوتاتیون به عنوان یک آنتی اکسیدان برازسرگیری‌میوز،بلوغ و تکوین آزمایشگاهی جنین‌های حاصل از این تخمک‌های نارس موش می‌باشد.

مواد و روش ها

تهیه تخمک‌های نارس: در این تحقیق از موش‌های سوری نژاد NMRI ٦-٤ هفته‌ای تهیه شده از انستیتورازی کرج (ایران) استفاده شد. موش‌های ماده با قطع نخاع، کشته شده و تخمدان آن‌ها در شرایط استریل خارج و پس از انتقال درون قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM-α حاوی FCS ۵ درصد، چربی‌های اضافی اطراف تخمدان حذف و با استفاده از سرنگ‌های انسولین Dissect (تشریح) شده و تخمک‌های نارس و حاوی حفره زاینده (GV) همراه با سلولهای گرانولوزا جدا شد. سپس با روش پیپت کردن، سلول‌های گرانولوزای اطراف آن برداشته شد. تخمک‌های نارس هسته‌دار(Germinal Vesicle) با سیتوپلاسم روشن ZP (Zone pollucida) یکنواخت با فضای Perivitelline مناسب یکسان برای ٤ گروه انتخاب شدند.

بلوغ تخمک‌ها:

گروه شاهد: ۳٤۵ تخمک نارس از موش‌های طبیعی گرفته شده و در محیط MEM-α حاوی FCS ۵ درصد قرار داده شد . گروه آزمایشی اول: ۳۳۸ تخمک نارس در محیط MEM-α حاوی FCS ۵ درصد و ۱mM گلوتاتیون (GssG, Merck)قرار داده شد. گروه آزمایشی دوم: ۲۳۷ تخمک نارس در محیط MEM-α حاوی FCS ۵ درصد، 100mIUrFSH, ۷/۵IUhCG/ml قرار داده شد. گروه آزمایشی سوم: ۳۲۷ تخمک نارس در محیط MEM-α حاوی FCS ۵ درصد ۷/۵IuhCG/ml ,100mIUrFSH و ۱mM گلوتاتیون قرار داده شد.

تخمک‌های هر گروه به مدت ۲٤ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با CO_2 ۵ درصد قرار داده شدند و سپس با میکروسکوپ معکوس، مراحل بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز در تمام گروه‌ها بررسی

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

شد. تخمک‌های با هسته شکسته شده به عنوان با نشانه شروع تقسیم میوز و تخمک‌های دارای جسمک قطبی به عنوان تخمک‌های بالغ یا MII (Metaphase II) شناسایی گردید.

لقاح و تکوین تخمک‌های بالغ شده: ابتدا موش‌های سوری نر نژاد NMRI به روش قطع نخاعی کشته، دم اپیدیدیم آن‌ها جدا و به قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت T_6 حاوی ٤ میلی‌گرم (Bovin SerumAlbumin)BSA در هر میلی‌لیتر منتقل شده، سپس نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی CO_2 ۵ درصد انکوبه شد. با انتقال اسپرم‌های فعال، سالم از کنار قطره (در هر میلی‌لیتر $۱۰^5 \times ۱$ عدد اسپرم) به داخل قطرات محیط T_6 حاوی ۱۵ میلی‌گرم BSA بر میلی‌لیتر، تخمک‌های بالغ شده نیز به آن‌ها منتقل شد. تخمک‌ها پس از ٦-٤ ساعت از محیط فعلی به قطره‌های محیط T_6 حاوی ٤ میلی‌گرم BAS بر میلی‌لیتر منتقل شدند. وضعیت تخمک‌ها پس از ٢٤، ٤٨، ٩٦،٧٢ ساعت به‌وسیله میکروسکوپ معکوس برای ثبت مراحل تکوین جنینی بررسی شد و نتایج حاصل با آزمون آماری Chi-square بررسی شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۲٤۷ تخمک نارس و سالم از تخمدان موش‌های سوری جدا شد و به‌طور تصادفی در ۳ گروه آزمایشی و یک گروه شاهد تقسیم‌بندی شد. همان‌طور که در جدول یک آمده است در گروه شاهد ۳٤۵ تخمک جدا شد که پس از ٢٤ ساعت در ۲۵/۷۹درصد آنها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۷٤/۲۰درصد تخمک‌های نارس مشاهده شد که از نظر آماری نسبت به گروه‌های آزمایشی یک(P=0.0001) وسه(P=0.0001) اختلاف معنی‌داری را نشان داد و از این میزان ١٤/٤٩ درصد هسته آن‌ها شکسته شد و ۵۹/۷۱ درصد تخمک‌ها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند. میزان بلوغ از نظر آماری نسبت به گروه‌های آزمایشی یک (P=0.0001) وسه(P=0.0001) اختلاف معنی‌داری را نشان داد. ١٤٤ عدد تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرم‌های موش نر مجاور (Inseminate) گردید. جدول یک نشانگر میزان لقاح و وضعیت تکامل تخمک‌های بارور شده است. نرخ تشکیل جنین در روزاول در گروه‌های آزمایشی یک‌وسه نسبت‌به گروه‌شاهد افزایش داشت ولی از نظرآماری‌اختلاف‌معنی‌داری را نشان نداد.

در گروه اول(از ۳۳۸ تخمک نارس سالم) پس از ٢٤ ساعت در ۷/۹۸درصد تخمک‌ها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۹۲/۸۸ درصد تخمک‌های نارس مشاهده شد که ازنظر آماری با گروه شاهد(P=0.0001) اختلاف معنی‌داری را نشان داد واز این میزان ۱۳/٦۰درصد هسته شکسته و ۷۹/۲۸درصد تخمک‌ها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه شاهد(P=0.0001) تفاوت معنی‌داری داشت. ۱۰۰ تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرم‌های موش نر مجاور (Inseminate) شد (جدول یک). نرخ تشکیل جنین در روز اول نسبت به گروه ۲ (P=0.001) اختلاف معنی‌داری را نشان داد

در گروه دوم آزمایشی:(از ۲۳۷ تخمک نارس سالم) پس از ٢٤ ساعت در ۲۵/۷۳ درصد آن‌ها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۷٤/۲٦ درصد تخمک‌های نارس مشاهده شد که از این میزان، هسته ۲۱/۵۱ درصد آن‌ها شکسته شد و ۵۲/۷٤ درصد آن‌ها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه شاهد، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.۷۰ عدد تخمک بالغ شده با اسپرم نر مجاور (Inseminate) شد (جدول شماره ۱).

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

جدول شماره ۱: مراحل بلوغ و تکوین تخمک‌های نارس موش در گروه شاهد و گروه‌های آزمایشی.

گروه‌های آزمایشی	تعداد تخمک نارس	دوز مصرفی گلوتاتیون	۲۴ ساعت پس از مجاورت MII (%)	GVB (%)	GV (%)	تعداد تخمک بالغ	۲۴ ساعت پس از مجاورت 4cell (%)	2cell (%)	Total (%)	۴۸ ساعت پس از مجاورت 8cell (%)	4cell (%)	2cell (%)	۷۲ ساعت پس از مجاورت 8cell (%)	4cell (%)	2cell (%)	morul (%)	۹۶ ساعت پس از مجاورت 8cell (%)	4cell (%)	2cell (%)
گروه	۳۴۵	۰	۲۰۶	۵۰	۸۹	۱۴۴	۱۷	۷۴	۹۱	۹	۳۲	۶۴	۱۷	۲۷	۵۰	۲۳	۹	۲۴	۳۸
کنترل			%۵۹/۷	%۱۴	%۲۵/۷		%۱۱/۶	%۵۱	%۶۳	%۲/۲۵	%۲۲/۲۲	%۴۴/۴۴	%۱۱/۸	%۱۸/۷۵	%۳۴/۷۲	%۱۵/۹	%۶/۷	%۱۶/۶	%۲۶/۳۸
گروه ۱	۳۳۸	mM۱	a۲۶۸	۴۶	۲۴	۱۰۰	۲۱	۵۱	bv۲	۶	۲۹	۳۵	۱۵	۲۴	۲۹	۵	۷	۱۴	۲۷
			%۷۹/۲	%۱۳/۶	%۷/۹		%۲۱	%۵۱	%۷۲	%۶	%۲۹	%۳۵	%۱۵	%۲۴	%۲۹	%۵	%۷	%۱۴	%۲۷
گروه ۲	۲۳۷	0	a۱۲۵	۵۱	۶۱	۷۰	۵	۲۷	۳۲		۱۰	۲۳	۲	۱۷	۱۷	۲	۳	۸	۱۶
			%۵۲/۷	%۲۱/۵	%۲۵/۷		%۷/۱۴	%۳۸/۵	%۴۵		۱۴/۲	%۳۳/۸	%۲/۸	%۲۴/۲	%۲۴/۲	%۲/۸	%۴/۲	%۱۱/۴	%۲۲/۸
گروه ۳	۳۲۷	1mM	a۲۲۹	۵۳	۴۵	۱۰۴	۱۴	۵۵	c۶۹	۵	۲۹	۳۹	۱۰	۲۷	۳۶	۳	۸	۲۴	۱۴
			%۷۰	%۱۶/۲	%۱۳/۷		%۱۳/۴	%۵۲/۸	%۶۲	%۴/۸	%۲۷/۸	%۳۷/۵	%۹/۶	%۲۵/۹	%۳۴/۶	%۲/۸	%۷/۶	%۲۳	۱۳/۴

در گروه سوم آزمایشی، ۳۲۷ تخمک نارس سالم جدا شد و پس از ۲۴ ساعت در ۱۳/۷۶ درصد آن‌ها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۸۶/۲۰ درصد تخمک‌های نارس مشاهده شد که از نظر آماری با گروه کنترل(P=0.0001) اختلاف معنی‌داری را نشان داد و از این میزان، هسته ۱۶/۲۰درصد آن‌ها شکسته شد و ۷۰ درصد آن‌ها تا مرحله MII پیش رفتند و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد. ۲۲۹ تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرم‌های موش نر مجاور (Inseminate) شد (جدول ۱). نرخ تشکیل جنین در روز اول نسبت به گروه ۲ (P=0.007) اختلاف معنی داری را نشان داد.

بحث

تخمک بالغ پستانداران در مرحله متافاز II آزاد می‌شود و تا زمان ورود اسپرم به داخل تخمک تحرکات لازم برای رهایی از این توقف و آزادسازی جسمک قطبی به عنوان ادامه میوز صورت می‌پذیرد(۲۸تا۳۰).

در این مطالعه مشخص شد که گلوتاتیون با غلظت ۱mM بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز را در تخمک‌های نارس موش افزایش می‌دهد؛ به این ترتیب که میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه‌های آزمایشی یک وسه نسبت به گروه شاهد و گروه دو که فاقد این ماده هستند، افزایش قابل توجهی را نشان داد که میزان بلوغ گروه‌های آزمایشی یک ,دو,سه و گروه شاهد به ترتیب ۵۲/۷۴،۷۴/۲۸ ,۷۰و۷۱/ ۵۹ درصد بود.هم چنین میزان از سرگیری میوزدر گروه یک ۹۳ درصد و در گروه سه ۸۶ درصد بود که نسبت به گروه شاهد و گروه دو که این میزان ۷۴درصد بود، افزایش قابل توجهی را نشان داد، همچنین این ماده نرخ تشکیل جنین را در روز اول افزایش داد که این میزان در گروه‌های آزمایشی یک، دو,سه وگروه‌شاهدبه ترتیب۴۵،۷۲ ,۶۶ و۶۳ درصد بود. در طی بلوغ تخمک هرگونه نقصی در بلوغ سیتوپلاسمی، تکوین جنین را تحت تاثیر قرار می‌دهد؛ حتی اگر تخمک، بلوغ هسته‌ای طبیعی نیز داشته باشد(۲۹). در گوسفند(۳۱)، گاو (۳۲)، بلوغ سیتوپلاسمی به‌وسیله هم‌کشتی (CO-Culture) تخمک‌های محصور شده از گرانولوزا (Cumulus enclosed oocytes) با تکه‌ای از فولیکول و یا با سلول‌های گرانولوزا انجام گرفت. Abeydeera و همکارانش (۱۹۹۸) ثابت کردند که در هم‌کشتی تخمک خوک با تکه‌ای از فولیکول سطح گلوتاتیون سیتوپلاسمی افزایش می‌یابد و می‌دانیم محتوای گلوتاتیون داخل سلولی به‌طور مستقیم یا

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

غیرمستقیم نشان دهنده بلوغ سیتوپلاسمی تخمک است(۲۳).

Wang و همکاران(۱۹۹۲) گزارش دادند تکوین جنین‌های گاو به بلاستوسیت در اکسیژن ۵ درصد بیش‌تر از اکسیژن ۱۰ درصد است(۳٤). بنابراین به نظر می‌رسد که غلظت بالای اکسیژن از رسیدن جنین‌های گاو به مرحله بلاستوسیت جلوگیری می‌کند. غلظت بالای اکسیژن در طی کشت آزمایشگاهی بدلیل افزایش انواع اکسیژن فعال (ROS) در سیتوپلاسم جنین‌های در حال تکوین، توانایی تکوین را کاهش می‌دهد(۳۵، ۳٦). این ترکیبات شامل پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)، آنیون‌های سوپراکسید (O_2^-) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^o) هستند که برای غشاهای سلولی(۳۷) و DNA (٦) زیان‌آور هستند و باعث آپوپتوزیس می‌شوند(۳۸). H_2O_2، OH^o آزاد می‌کند که با دیگر مولکول‌ها در سیتوپلاسم، بسیار واکنش می‌دهد و باعث آسیب سلولی می‌شود و عملکرد H_2O_2در تنظیم بیان ژن و غلظتش به‌وسیله اکسیدازهای مرتبط تنظیم می‌شود(۳۹). فعالیت اکسیدازی وابسته به غلظت O_2محیطی دارد و غلظت مناسب اکسیژن برای فعالیت این اکسیدازها در محیط کشت بیش‌تر از آن‌هایی است که در بدن قرار دارند(٤۰). مقدار H_2O_2درجنین‌های کشت شده‌تحت فشار اکسیژن ۲۰ درصد بالاست‌که اکسیدازها تحت این‌شرایط‌به‌مقداربالاتری‌تولید می‌شوند.

تغییرات اکسیداتیو ترکیبات داخل سلولی توسط انواع اکسیژن‌های واکنش دهنده (ROS) یکی از مهم‌ترین فرآیندهای خطرناک و مضر برای عملکرد مناسب سلولی است. در بسیاری سلول‌ها، سیستم‌های آنتی‌اکسیدان کارآمد می‌توانند فشار اکسیداتیو را توسط به دام انداختن ROS تضعیف کنند(٤۱).

گلوتاتیون یک ترکیب سولفیدریل غیرپروتئینی مهم در سلول‌های پستانداران است و نقش مهمی را در حفاظت سلول از آسیب اکسیداتیو دارد. ساخته شدن گلوتاتیون در طی بلوغ تخمک موش(۱۰)، خوک(۱۸) و گاو(۱۲،۲٤) گزارش شده است. این ترکیب دارای ۲ فرم اصلی می‌باشد۱- GSH(فرم سولفیدریل)۲-GSSG(فرم دی سولفید)GSH به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کند؛ به این ترتیب که ۲GSH توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز بهGSSG تبدیل می شود، این ماده با اکسید خود، H_2O_2 را که ماده ای خطرناک و سمی برای سلول است به آب تبدیل می‌کند، در نتیجه از این طریق، غلظت ROS کاهش می یابد(۴۲).

گلوتاتیون به‌واسطه سیکل γ گلوتامیل ساخته می‌شود(٤٤،٤۳) و ساخته شدنش وابسته به در دسترس بودن سیستئین در محیط کشت است. مشخص شد که بتامرکاپتواتانول و سیستئامین، سیستین را به سیستئین احیاء می‌کنند و منجر به افزایش سیستئین می‌شوند که این ماده پیش‌ساز گلوتاتیون است و باعث افزایش تشکیل گلوتاتیون می‌شود(٤۵ تا٤۷). همچنین اضافه کردن سیستئامین, بتامرکاپتواتانول و سیتئین به محیط کشت بلوغ تخمک گاو و خوک محتوی گلوتاتیون داخل سلولی را بعد از بلوغ افزایش می‌دهند و تکوین و کیفیت جنین را بهبود می‌دهد(۲۰،۱۹). لذا می‌توان مدعی شد که محتوی گلوتاتیون داخل سلولی یک علامت برای توانایی بلوغ سیتوپلاسمی است. مشخص شده که ROS در طی کشت آزمایشگاهی در متوقف کردن جنین‌های موش در مرحله ۲ سلولی نقش دارند، در حالی‌که طبق مطالعات انجام شده گلوتاتیون سلول را از آسیب‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند. اضافه کردن بتامرکاپتواتانول به محیط کشت بلوغ تخمک گوسفند، ساخته شدن گلوتاتیون را تحریک می‌کند و تکوین

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

جنین را بهبود می‌دهد(۴۹). احتمالاً گلوتاتیون عامل کلیدی مهمی در کاهش پراکسیدهای داخل سلولی است. در این مطالعه نیز مشخص شد که اضافه کردن گلوتاتیون به عنوان یک آنتی اکسیدان به محیط کشت بلوغ تخ. مک‌های نارس موش، بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز را افزایش می‌دهد و تعداد جنین‌ها را در روز اول نسبت به گروه شاهد افزایش می‌دهد.

سپاسگزاری

کلیه هزینه‌های بررسی حاضر، توسط معاونت پژوهشی پژوهشکده رویان تامین گردیده است. از کلیه همکاران شاغل در بخش‌های مختلف تحقیقاتی و بالینی رویان به‌خصوص سرکار خانم طائی و جناب آقایان صبور و فاخری که در تمام مراحل انجام طرح صمیمانه همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست منابع

1. A.A. Ali, J. F. Bilodeau, M.A. sirard.Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. ***Theriogenology***. (2003); 59: 939-949.
2. Liu Z, Foote RH. Development of bovin embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O_2. ***Biol Reprod.*** (1995); 53: 786-90.
3. Nasr Esfahani MH, Aitken JR, Jahnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stages embryos developed in vitro or in vivo. ***Development***. (1990); 109: 501-7.
4. De Lamirande, E Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. ***Rev Reprod.*** (1997); 2: 48-54.
5. Comporti M. Three models of free radical induced cell injury. ***Chern Biol Interact.*** (1986); 72: 472-7.
6. Aitken RJ. Harkiss D. Buckingham D. Relationship between iron catalysed lipid peroxidation potential an human sperm function ***J Repord Fertil***. (1993); 98: 257-65.
7. Meister A. selective modification of glutathione metabolism. **Sience**. (1983); 220: 472-7.
8. Daniel G. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. ***Theriogenology***. (2002); 57: 1443-1457.
9. Kitakawa Y. Suzuki K. Yoneda A. Watanabe T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in-vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS) and DNA fragmentation in

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

porcin embryos embryos ***thrieogenology***. (2004); 1-12.

10. Calvin HI, Grossham K, Blake EJ. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepubertal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. ***Gamete Res***. (1986); 14: 265-75.
11. Perreault SD, Salott VI. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. ***Dev Biol***. (1988); 125: 181-6.
12. Miyamura M, Yoshida M, Hamano S. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. ***Theriogenology***. (1995); 43: 282 [Abstract].
13. Funahashi H, Stumpf TT, Cantely TC, Kin NH, Day BN. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of in vitro matured porcine oocytes following in vitro fertilization and/or electrical activation. ***Zygote***. (1995); 3: 273-81.
14. Lafeur Mum, Hoorweg JJ, Retel J. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. ***Free Rad Res***. (1994);21:9-17.
15. Yamauchi N,Nagai T.Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine.***Biol Reprod***. (1999); 61:828-33.
16. Perreaull SD, Wolff RA, Zirkin BR. The role of sulfidebond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. ***Dev Biol.*** (1984); 1: 160-71.
17. Yoshide M, Ishigaki K, Pursel VG. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. ***Mol Repord*** Dev. (1992); 31: 68-71.
18. Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. ***Biol reprod.*** (1993); 49: 89-94
19. De Mutos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development. Effect of β-Mercaptoethanol, cysteine and cystine. Threnology 2000; (53): 761- 771.
20. Gardiner CS. Reed JD. Status of gluthathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryos. ***Biol. Repred***. (1994); 51: 13-13.
21. Eppig J, Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

eutherian mammals. ***Reprod Fertile Dev***. (1996); 8: 985-89.

22. Krishev RL, Bavister. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. ***Theriogenology***. (1998); 49: 103-114.
23. De matos, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. ***Biol Reprode***. (1997); 57: 1420-1425.
24. De matos DG. Furnus CC, Moses DF, Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. ***Mol Reprod Dev.*** (1995); 42: 430-432.
25. Y.Z Bing T. Nagai and H. Rodrigue Z. Martinez. Effect of cysteamine, FSH and estradiol 1713 on in vitro maturation of porcine oocytes. ***Theriogenology***. (2001); 55: 878-887.
26. B.G. Parrini. G. Neglia R. Di Palo. Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. ***Theriogenology***. (2000); 54. 1537-1542.
27. Newton H. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients, ***Human Reprod.*** (1998); 9: 237-147.
28. Escriba MJ, Garcia Ximenez Fe: use of a variable electrical pulsing sequence in rabbit oocyte activation. ***Reprod***. (2000); 40: 261-269.
29. Edwadr RG. Mammalian Eggs in the laboratory. ***Sci Am***.(1966); 215: 72-81.
30. Pincus G, Enzmam E. The Comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro part 1. The activation of ovarian eggs. ***J Exp Med***. (1935); 62: 665-75.
31. Crozet N, Huneau D, De smedt V, Torres S. In vitro fertilization with normal development in sheep Gamete ***Res***. (1987); 16: 159-70.
32. Lu KH, Gordon I, Chen HB, Mc Govern H. In vitro culture of early bovine embryos derived from in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. In proceedings of the third scientific meeting of the european embry. ***Transfer Association, lyon***. (1987); 70 [Abstract].
33. Abeydeera LR, Wang WH, Cantly TC, Day BN. Presence of B-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. ***Theriogenology***. (1998); 50: 747-56.
34. Wang WL, Jiang HS, LU KH, Polge C. The effect of gas phase on the in vitro development of bovine embryos drived from in vitro maturation and fertilization of ovarian oocytes.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

Theriogenology. (1992); 37: 320 [abstract].

35. Goto Y, Noda Y. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. ***Free Biol Med***. (1993); 15: 69-75.
36. Kwon HC, Yang HW. Hwang KJ. Effect of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro. ***J obstet Gynaecal Res.*** (1999); 25: 359-66.
37. Aitken RJ. Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. ***Biol reprod***. (1989); 141: 183-97
38. Yang WH, Hwang KJ, Detection of reactive oxygen species (Ros) and apoptosis in ***human fragmented*** embryos. Hum reprod. (1998); 13: 998-1002.
39. Guerin P, EL, Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surrondings. ***Hum reprod update***. (2001); 7: 175-89.
40. Halliwell B. Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. ***FEBS Lett.*** (1978); 92: 321-6.
41. Del corso A, Cappiello M, Mura U. thiol dependent oxidation of enzymes: the lost chunce against oxidative stress. ***Int J Biochem***. (1994); 26: 745-50.
42. Uday B,Dipak D,Ranajit k.Reactive oxygen species:oxidative damage and pathogenesis.***Current Science***. (1999); 77:658-666
43. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroxyperoxide metabolism in mammalian organs. ***Physiol Rev***. (1979); 59: 527-605.
44. Meister A, tate SS. Glutathione and related r- glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. ***Ann Rev Biochem***. (1976); 45: 559-604.
45. Farnus CC, de Matos DG. The availability of cysteine in culture medium appears to be the limiting factor for glutathione synthesis in mammalian oocytes. ***Theriogenology***. (1999); 51 (suppll): 373 [Abstract].
46. Ishii T, Bannai S, Sugita Y. Mechanism of growth stimulation of L 1270 cells by 2-mercaptoethanol in vitro. ***J Biol chem***. (1981); 256(23): 12387-92.
47. Issels RD, Nagele A, Eckert KG, Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis by cyteamine and N-acetyl-cysteine. ***Biochem pharmacol***. (1988); 37(5): 881-8.
48. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Involument of superoxide radicals in the mause two-cell

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

block. ***Mol Reprod dev***. (1991); 28: 355-36048-.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com