

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

حسین ایمانی (Ph.D.) * فاطمه حسنی (M.Sc.) ** سیدعلی حائری روحانی (M.D.) *** محمدحسین نصر اصفهانی (Ph.D.) ***
مجتبی رضازاده (Ph.D.) **** اعظم دالمن (M.S.) ** سعید کاظمی آشتیانی (Ph.D.) * عبدالحسین شاهرودی (MS.c.) *****

چکیده

سابقه و هدف: هدف از این مطالعه، بررسی مطالعه تاثیر گلوکوتایون 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 نژاد NMRI (۶-۴ 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 ۵ درصد، ۱ گلوکوتایون، گروه دوم در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵ IUhCG/ml، ۱۰۰ mIUrFSH و تخمک‌های گروه سوم در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵ IUhCG/ml، ۱۰۰ mIUrFSH و ۱ mM گلوکوتایون قرار داده شدند. تخمک‌های نارس جهت بلوغ به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷°C با CO₂ پنج درصد قرار گرفتند. لقاح و تکوین در محیط T₆ انجام 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 ۷۴/۲۰، ۸۴/۴۹، ۹۲/۸۸، ۷۴/۲۰ درصد بوده است. همچنین میزان بلوغ آزمایشگاهی 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 گروه‌های آزمایشی به ترتیب ۷۹/۲۸، ۵۹/۷۷ و ۵۲/۷۴ درصد بود. در این مطالعه نرخ تشکیل جنین در روز اول در گروه‌های آزمایشی یک (P=0.001) و سه (P=0.007) نسبت به گروه ۲ اختلاف معنی‌داری را نشان داد و این میزان از گروه شاهد و گروه ۲ که فاقد این ماده بودند، بیش تر بود.

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

واژه‌های کلیدی: بلوغ آزمایشگاهی، تخمک نارس، موش، گلوکوتایون

* تهران: خیابان ولی‌عصر، زعفرانیه، کوی آصف، کوی سیمین، پژوهشکده رویان
*** متخصص فیزیولوژی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی تهران

* 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

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

تاریخ تصویب: ۸۳/۱۱/۱۴

تاریخ انجام اصلاحات: ۸۳/۹/۱۰

تاریخ دریافت: ۸۳/۷/۱

E

مقدمه

امادرتخمک‌های لقاح‌یافته در مرحله پرونوکلئوس مقدار این ماده در مقایسه با تخمک‌های بالغ، پایین‌تر است (۱۳ تا ۹). نقش‌های متفاوتی برای گلوکاتایون از جمله انتقال آمینو اسید، سنتز DNA و پروتئین و احیای دی‌سولفیدها در نظر گرفته شده است (۱۴). Yamauchi و همکاران (۱۹۹۹) نیز نشان دادند که گلوکاتایون نقش‌های ذکر شده را در داخل تخمک در حال بلوغ ایفا می‌کند. همچنین گزارش دادند که کمبود گلوکاتایون در تخمک‌ها قبل از لقاح باعث می‌شود که تشکیل پرونوکلئوس نر (MPN) ^۳ دچار نقصان شود (۱۵). گلوکاتایون هم‌چنین در Decandensation هسته اسپرم همزمان با فعال‌سازی تخمک، تغییر شکل سراسپرم به پرونوکلئوس نردر هنگام لقاح نقش دارد (۱۶ تا ۱۸). سنتز گلوکاتایون در طی بلوغ تخمک در موش (۱۰)، هامستر (۱۱) و خوک (۱۲) گزارش شده است. بنابراین سطح گلوکاتایون 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، همانطوری که تخمک به زمان تخمک‌گذاری نزدیک می‌شود، محتوی گلوکاتایون داخل سلولی نیز افزایش پیدا می‌کند (۱۱) و این تجمع گلوکاتایون ذخیره‌ای را به وجود 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 گلوکاتایون کم‌تری دارند و این امر نشان دهنده این است که محتوای گلوکاتایون تخمک و جنین آزمایشگاهی نسبت به بدن کم‌تر است (۱۹). Reed و

از آن‌جا که آنتی‌اکسیدان‌ها رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) ^۱ را به دام می‌اندازند، اضافه کردن آن‌ها به محیط کشت مفید است (۱). کشت جنین‌ها در آزمایشگاه تحت فشار اکسیژن بالا (۲۰ درصد) نسبت به کشت جنین‌ها تحت فشار O₂ 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 به دست 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 جنین‌ها از فشار اکسیداتیو در طی کشت، اضافه کردن انواع آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط کشت توصیه می‌شود؛ برای مثال اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌های آنزیم خارج سلولی از قبیل سوپراکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز یا آنتی‌اکسیدان‌های قابل متابولیزه به محیط کشت پیشنهاد شده است (۷، ۱).

گلوکاتایون 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) ^۲ به مرحله متافاز II غلظت گلوکاتایون داخل سلولی افزایش می‌یابد،

1- Reactive Oxygen Species
2- Germinal Vesicle

3- Male pronucleus

مواد و روش ها

تهیه تخمک های نارس: در این تحقیق از موش های سوری نژاد NMRI ۶-۴ هفته ای تهیه شده از انستیتورازی کرج (ایران) استفاده شد. موش های ماده با قطع نخاع، کشته شده و تخمدان آن ها در شرایط استریل خارج و پس از انتقال درون قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، چربی های اضافی اطراف تخمدان حذف و با استفاده از سرنگ های انسولین Dissect (تشریح) شده و تخمک های نارس و حاوی حفره زاینده (GV) همراه با سلول های گرانولوزا جدا شد. سپس با روش پیت کردن، سلول های گرانولوزای اطراف آن برداشته شد. تخمک های نارس هسته دار (Germinal Vesicle) با سیتوپلاسم روشن ZP (Zone pellucida) یکنواخت با فضای Perivitelline مناسب یکسان برای ۴ گروه انتخاب شدند.

بلوغ تخمک ها:

گروه شاهد: ۳۴۵ تخمک نارس از موش های 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 گلوکاتيون (GssG, Merck) قرار داده شد. گروه آزمایشی دوم: ۲۳۷ تخمک نارس در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، ۱۰۰mIUhCG/ml و ۱۰۰mIUrFSH قرار داده شد. گروه آزمایشی سوم: ۳۲۷ تخمک نارس در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد ۱۰۰mIUhCG/ml و ۱۰۰mIUrFSH، گلوکاتيون قرار داده شد.

تخمک های هر گروه به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با CO₂ ۵ درصد قرار داده شدند و سپس با میکروسکوپ معکوس، مراحل بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز در تمام گروه ها بررسی

Gardiner (۱۹۹۴) ثابت کردند که بلاستوسیت موش توانایی ساختن گلوکاتيون را دارا ماجنین های اولیه تا مرحله مورولا توانایی محدودی برای ساختن این ماده دارند (۲۰). بلوغ تخمک، مستلزم بلوغ هسته و سیتوپلاسم است. تغییرات مولکولی بی شماری از جمله فسفریلاسیون پروتئین ها و فعال شدن راه های متابولیکی ویژه در بلوغ سیتوپلاسمی دخالت دارند. یکی از این راه های متابولیکی، سنتز گلوکاتيون در داخل تخمک می باشد که این ماده بلوغ سیتوپلاسمی را افزایش داده و از این طریق تکوین جنین را بهبود می بخشد (۲۱، ۲۲). در تخمک گاو میزان گلوکاتيون بعد از (In Vitro Maturation) IVM نشانگری برای بلوغ سیتوپلاسمی شناخته شده است (۲۳، ۲۴). ترکیبات تیولی با وزن مولکولی کم از جمله سیستامین و بتا مرکاپتوتانول سنتز گلوکاتيون داخل سلولی را افزایش می دهند و از این طریق سرعت تکوین جنین را بهبود می دهند (۲۴). اضافه کردن سیستامین در طی IVM به تخمک های خوک (۲۵)، گوسفند (۸) و گاو میش (۲۶) به واسطه ساختن گلوکاتيون و در نتیجه افزایش بلوغ سیتوپلاسمی، سرعت تکوین جنین حاصله را بهبود می بخشد و همچنین اثرات مشابهی را با افزودن بتا مرکاپتوتانول در طی IVM بر سنتز گلوکاتيون و تکوین جنین در تخمک های گوسفند (۸) گاو (۲۰) و خوک (۲۷) مشاهده کرده اند. با توجه به مطالب بالا و آنتی اکسیدان بودن، گلوکاتيون، علاوه بر افزایش بلوغ سیتوپلاسمی تخمک های نارس میزان ROS را نیز کاهش داده و تخمک نارس را از آسیب های اکسیداتیو محافظت می کند. لذا هدف از این مطالعه بررسی تاثیر گلوکاتيون به عنوان یک آنتی اکسیدان بر از سرگیری میوز، بلوغ و تکوین آزمایشگاهی جنین های حاصل از این تخمک های نارس موش می باشد.

معنی داری را نشان داد و از این میزان $14/49$ درصد هسته آن‌ها شکسته شد و $59/71$ درصد تخمک‌ها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند. میزان بلوغ از نظر آماری نسبت به گروه‌های آزمایشی یک ($P=0.0001$) و سه ($P=0.0001$) اختلاف معنی داری را نشان داد. 144 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 روز اول در گروه‌های آزمایشی یک و سه نسبت به گروه شاهد افزایش داشت ولی از نظر آماری اختلاف معنی داری را نشان نداد. در گروه اول (از 338 تخمک نارس سالم) پس از 24 ساعت در $7/98$ درصد تخمک‌ها نشانی از علائم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در $92/88$ درصد تخمک‌های نارس مشاهده شد که از نظر آماری با گروه شاهد ($P=0.0001$) اختلاف معنی داری را نشان داد و از این میزان $13/60$ درصد هسته شکسته و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه شاهد ($P=0.0001$) تفاوت معنی داری داشت. 100 تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرم‌های موش نر مجاور (Inseminate) شد (جدول یک). نرخ تشکیل جنین در روز اول نسبت به گروه گـ

گروه ۲ ($P=0.001$) اختلاف معنی داری را نشان داد

در گروه دوم آزمایشی: (از 237 تخمک نارس سالم) پس از 24 ساعت در $25/73$ درصد آن‌ها نشانی از علائم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در $74/26$ درصد تخمک‌های نارس مشاهده شد که از این میزان، هسته $21/51$ درصد آن‌ها شکسته شد و $52/74$ درصد آن‌ها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه شاهد، اختلاف معنی داری را نشان نداد. 70 عدد تخمک بالغ شده با اسپرم نر مجاور (Inseminate) شد (جدول شماره ۱).

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 500 میکرولیتری محیط کشت T_6 حاوی 4 میلی گرم (Bovin Serum Albumin) BSA در هر میلی لیتر منتقل شده، سپس نمونه‌ها به مدت $1/5$ ساعت در داخل انکوباتور 37 درجه سانتیگراد حاوی CO_2 5 درصد انکوبه شد. با انتقال اسپرم‌های فعال، سالم از کنار قطره (در هر میلی لیتر 1×10^5 عدد اسپرم) به داخل قطرات محیط T_6 حاوی 15 میلی گرم BSA بر میلی لیتر، تخمک‌های بالغ شده نیز به آن‌ها منتقل شد. تخمک‌ها پس از $6-4$ ساعت از محیط فعلی به قطره‌های محیط T_6 حاوی 4 میلی گرم BAS بر میلی لیتر منتقل شدند. وضعیت تخمک‌ها پس از 24 ، 48 ، 72 ، 96 ساعت به وسیله میکروسکوپ معکوس برای ثبت مراحل تکوین جنینی بررسی شد و نتایج حاصل با آزمون آماری Chi-square بررسی شد.

یافته‌ها

در این مطالعه 1247 تخمک نارس و سالم از تخمدان موش‌های سوری جدا شد و به‌طور تصادفی در 3 گروه آزمایشی و یک گروه شاهد تقسیم‌بندی شد. همان‌طور که در جدول یک آمده است در گروه شاهد 345 تخمک جدا شد که پس از 24 ساعت در $25/79$ درصد آن‌ها نشانی از علائم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در $74/20$ درصد تخمک‌های نارس مشاهده شد که از نظر آماری نسبت به گروه‌های آزمایشی یک ($P=0.0001$) و سه ($P=0.0001$) اختلاف

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

گروه‌های آزمایشی	تعداد تخمک نارس	دوز مصرفی گلوکاتیون	۲۴ ساعت پس از مجاورت			۴۸ ساعت پس از مجاورت			۷۲ ساعت پس از مجاورت			۹۶ ساعت پس از مجاورت			تعداد تخمک بالغ	GV (%)	GVB (%)	MII (%)
			Total (%)	2cell (%)	4cell (%)	2cell (%)	4cell (%)	8cell (%)	2cell (%)	4cell (%)	8cell (%)	2cell (%)	4cell (%)	8cell (%)				
گروه کنترل	۳۴۵	۰	۹۱	۷۴	۱۷	۱۴۴	۸۹	۵۰	۲۰۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
گروه ۱	۳۳۸	mM1	۶۳	۵۱	۲۱	۱۰۰	۴۶	۴۶	۲۳۶۸	۲۹	۲۴	۱۵	۳۵	۲۹	۶	۲۷	۲۳	۲۳
گروه ۲	۲۳۷	0	۳۲	۲۷	۵	۷۰	۶۱	۵۱	۲۱۵۰	۱۶	۸	۳	۲	۱۷	۱۷	۲	۲۳	۲۳
گروه ۳	۳۲۷	1mM	۶۶	۵۵	۱۴	۱۰۴	۴۵	۵۳	۲۲۹	۱۴	۲۴	۸	۳	۳۶	۲۷	۱۰	۳۹	۲۹
			۶۶	۵۲/۸	۱۳/۴	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۶/۲	۷۰	۱۳/۴	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷

در گروه سوم آزمایشی، ۳۲۷ تخمک نارس سالم جدا شد و پس از ۲۴ ساعت در ۱۳/۷۶ درصد آن‌ها نشانی از علائم 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 ۱۶/۲۰ درصد 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 معنی‌داری 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 (۲۸ تا ۳۰).

در این مطالعه مشخص شد که گلوکاتیون با غلظت 1mM بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز را در تخمک‌های نارس موش افزایش می‌دهد؛ به این ترتیب که میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه‌های آزمایشی یک و سه 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 ۲۸/۷۴، ۷۰/۷۱، ۵۹/۷۱ و ۶۳/۶۶ درصد بود. هم چنین میزان از سرگیری میوز در گروه یک ۹۳ درصد و در گروه سه ۸۶ درصد بود که نسبت به گروه شاهد و گروه دو که این میزان ۷۴ درصد 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 و گروه شاهد به ترتیب ۷۲، ۴۵، ۶۶ و ۶۳ 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 به وسیله هم کشتی (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 هم کشتی تخمک خوک با تکه‌ای از فولیکول سطح گلوکاتیون سیتوپلاسمی افزایش می‌یابد و می‌دانیم محتوای گلوکاتیون داخل سلولی به‌طور مستقیم یا

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 (۳۴). 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، ۳۶).

این ترکیبات شامل پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، آنیون‌های سوپراکسید (O_2^-) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^\bullet) هستند که برای غشاهای سلولی (۳۷) و DNA (۶) زیان‌آور هستند و باعث آپوپتوزیس می‌شوند (۳۸). H_2O_2 ، OH^\bullet آزاد می‌کند که با دیگر مولکول‌ها در سیتوپلاسم، بسیار واکنش می‌دهد و باعث آسیب سلولی می‌شود و عملکرد H_2O_2 در تنظیم بیان ژن و غلظت‌ش به وسیله اکسیدازهای مرتبط تنظیم می‌شود (۳۹). فعالیت اکسیدازی وابسته به غلظت O_2 محیطی دارد و غلظت مناسب اکسیژن برای فعالیت این اکسیدازها در محیط کشت بیش‌تر از آن‌هایی است که در بدن قرار دارند (۴۰). مقدار H_2O_2 در جنین‌های کشت شده تحت فشار اکسیژن ۲۰ درصد بالاست که اکسیدازها تحت این شرایط به مقدار بالاتری تولید 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 (۴۱).

گلوکاتیون یک ترکیب سولفیدریل غیرپروتئینی مهم در سلول‌های پستانداران است و نقش مهمی را در حفاظت سلول از آسیب اکسیداتیو دارد. ساخته شدن گلوکاتیون در طی بلوغ تخمک موش (۱۰)، خوک (۱۸) و گاو (۱۲، ۲۴) گزارش شده است. این ترکیب دارای ۲ فرم اصلی می‌باشد ۱-GSH (فرم سولفیدریل) ۲-GSSG (فرم دی سولفید) GSH به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند؛ به این ترتیب که ۲GSH توسط آنزیم گلوکاتیون ردوکتاز به GSSG تبدیل می‌شود، این ماده با اکسید خود، H_2O_2 را که ماده‌ای خطرناک و سمی برای سلول است به آب تبدیل می‌کند، در نتیجه از این طریق، غلظت ROS کاهش می‌یابد (۴۲).

گلوکاتیون به واسطه سیکل γ گلوتامیل ساخته می‌شود (۴۳، ۴۴) و ساخته شدنش وابسته به در دسترس بودن سیستین در محیط کشت است. مشخص شد که بتامرکاپتواتانول و سیستامین، سیستین را به سیستین احیاء می‌کنند و منجر به افزایش سیستین می‌شوند که این ماده پیش‌ساز گلوکاتیون است و باعث افزایش تشکیل گلوکاتیون می‌شود (۴۵ تا ۴۷). همچنین اضافه کردن سیستامین، بتامرکاپتواتانول و سیستین به محیط کشت بلوغ تخمک گاو و خوک محتوی گلوکاتیون داخل سلولی را بعد از بلوغ افزایش می‌دهند و تکوین و کیفیت جنین را بهبود می‌دهد (۱۹، ۲۰). لذا می‌توان مدعی شد که محتوی گلوکاتیون 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 حالی که طبق مطالعات انجام شده گلوکاتیون سلول را از آسیب‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند. اضافه کردن بتامرکاپتواتانول به محیط کشت بلوغ تخمک گوسفند، ساخته شدن گلوکاتیون را تحریک می‌کند و تکوین

سپاسگزاری

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

جنین را بهبود می‌دهد (۴۹). احتمالاً گلوکوتایون عامل کلیدی مهمی در کاهش پراکسیدهای داخل سلولی است. در این مطالعه نیز مشخص شد که اضافه کردن گلوکوتایون 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.

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 O₂. *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. *Science*. (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

- porcin embryos embryos
thriogenology. (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. Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR. The role of sulfidebond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev Biol.* (1984); 1: 160-71.
 17. Yoshida 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 glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.* (1994); 51: 13-13.
 21. Eppig J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in

- 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 Reprod.* (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 embryo. *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 driven from in vitro maturation and fertilization of ovarian oocytes.

- 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 Gynaecol 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 surroundings. *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 chance 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 (suppl): 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

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