

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

حسین ایمانی* (Ph.D.) فاطمه حسینی** (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 شاهوردی***** (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، ۵۹/۷۷، ۷۹/۲۸، ۵۲/۷۴ 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، ۵۲/۷۴ و ۷۰ 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 دکترای تخصصی علوم تشریح و آناتومی دانشگاه تهران

تاریخ تصویب: ۸۳/۱۱/۱۴

تاریخ انجام اصلاحات: ۸۳/۹/۱۰

E تاریخ دریافت: ۸۳/۷/۱

مقدمه

از آنجا که آنتی اکسیدانها رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS)^۱ را به دام می اندازند، 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 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 به دست آوردن توانایی لقاح در آزمایشگاه است (۴). به نظر می رسد جنینهایی که در آزمایشگاه کشت داده می شوند در معرض رادیکالهای آزاد اکسیژن قرار می گیرند که مکانیسم دفاعی شان برای حفاظت از ساختمانهای سلولی ظریف کافی نیست. اثرات مضر این رادیکالهای آزاد باعث از بین رفتن عملکرد میتوکندری و آسیب به DNA, RNA و پروتئین می شود (۵) و همچنین اتصال اسپرم- تخمک را مهار می کند (۶). برای حفاظت تخمکها و جنینها از فشار اکسیداتیو در طی کشت، اضافه کردن انواع آنتی اکسیدانها به محیط کشت توصیه می شود؛ برای مثال اضافه کردن آنتی اکسیدانهای آنزیم خارج سلولی از قبیل سوپراکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز یا آنتی اکسیدانهای قابل متابولیزه به محیط کشت پیشنهاد شده است (۷،۱).

گلوتاتیون یک ترکیب سولفیدریل غیرپروتئینی و یک آنتی اکسیدان طبیعی می باشد که در سلولهای پستانداران وجود دارد و نقش مهمی را در حفاظت سلول از آسیبهای اکسیداتیو بازی می کند. 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 گلوتاتیون داخل سلولی افزایش می یابد،

امادر تخمکهای لقاح یافته در مرحله پرونوکلئوس مقدار این ماده در مقایسه با تخمکهای بالغ، پایین تر است (۱۳ تا ۹). نقشهای متفاوتی برای گلوتاتیون از جمله انتقال آمینواسید، سنتز DNA و پروتئین و احیای دی سولفیدها در نظر گرفته شده است (۱۴). Yamauchi و همکاران (۱۹۹۹) نیز نشان دادند که گلوتاتیون نقشهای ذکر شده را در داخل تخمک در حال بلوغ ایفا می کند. همچنین گزارش دادند که کمبود گلوتاتیون در تخمکها قبل از لقاح باعث می شود که تشکیل پرونوکلئوس نر (MPN)^۳ دچار نقصان شود (۱۵) گلوتاتیون همچنین در Decandensation هسته اسپرم همزمان با فعال سازی تخمک، تغییر شکل سراسپرم به پرونوکلئوس نردر هنگام لقاح نقش دارد (۱۶ تا ۱۸). سنتز گلوتاتیون در 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 می باشد (۱۳). در طی تکوین و بلوغ تخمک در تخمدان، همانطوری که تخمک به زمان تخمک گذاری نزدیک می شود، محتوی گلوتاتیون داخل سلولی نیز افزایش پیدا می کند (۱۱) و این تجمع گلوتاتیون ذخیره ای را به وجود می آورد 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 محتوی گلوتاتیون تخمک و جنین آزمایشگاهی نسبت به بدن کم تر است (۱۹). Reed و

1- Reactive Oxygen Species
2- Germinal Vesicle

3- Male pronucleus

مواد و روش ها

تهیه تخمک‌های نارس: در این تحقیق از موش‌های سوری نژاد NMRI ۶-۴ 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 پیت کردن، سلول‌های گرانولوزای اطراف آن برداشته شد. تخمک‌های نارس هسته‌دار (Germinal Vesicle) با سیتوپلاسم روشن ZP (Zone pellucida) یکنواخت با فضای Perivitelline مناسب یکسان برای ۴ گروه انتخاب شدند.

بلوغ تخمک‌ها:

گروه شاهد: ۳۴۵ 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 گلوکوتایون (GssG, Merck) قرار داده شد. گروه آزمایشی دوم: ۲۳۷ تخمک نارس در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵IUhCG/ml و ۱۰۰mIUrFSH قرار داده شد. گروه آزمایشی سوم: ۳۲۷ تخمک نارس در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد ۷/۵IUhCG/ml و ۱۰۰mIUrFSH، ۱mM گلوکوتایون قرار داده شد.

تخمک‌های 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 گروه‌ها بررسی

Gardiner (۱۹۹۴) ثابت کردند که بلاستوسیت موش توانایی ساختن گلوکوتایون را دارد اما جنین‌های اولیه تا مرحله مورولا توانایی محدودی برای ساختن 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 گلوکوتایون در داخل تخمک می‌باشد که این ماده بلوغ سیتوپلاسمی را افزایش داده و از این طریق تکوین جنین را بهبود می‌بخشد (۲۱، ۲۲). در تخمک گاو میزان گلوکوتایون بعد از (In Vitro Maturation) IVM نشانگری برای بلوغ سیتوپلاسمی شناخته شده است (۲۳، ۲۴). ترکیبات تیولی با وزن مولکولی کم از جمله سیستمین و بتا مرکاپتواتانول سنتز گلوکوتایون داخل سلولی را افزایش می‌دهند و از این طریق سرعت تکوین جنین را بهبود می‌دهند (۲۴). اضافه کردن سیستمین در طی IVM به تخمک‌های خوک (۲۵)، گوسفند (۸) و گاومیش (۲۶) به واسطه ساختن گلوکوتایون و در 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 گلوکوتایون و تکوین جنین در تخمک‌های گوسفند (۸) گاو (۲۰) و خوک (۲۷) مشاهده کرده‌اند. با توجه به مطالب بالا و آنتی‌اکسیدان بودن، گلوکوتایون، علاوه بر افزایش بلوغ سیتوپلاسمی تخمک‌های نارس میزان ROS را نیز کاهش داده و تخمک نارس را از آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. لذا هدف از این مطالعه بررسی تاثیر گلوکوتایون به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بر از سرگیری میوز، بلوغ و تکوین آزمایشگاهی جنین‌های حاصل از این تخمک‌های نارس موش می‌باشد.

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 T₆ حاوی ۴ میلی گرم (Bovin Serum Albumin) BSA در هر میلی لیتر منتقل شده، سپس نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی CO₂ ۵ درصد انکوبه شد. با انتقال اسپرم‌های فعال، سالم از کنار قطره (در هر میلی لیتر ۱×۱۰^۵ عدد اسپرم) به داخل قطرات محیط T₆ حاوی ۱۵ میلی گرم BSA بر میلی لیتر، تخمک‌های بالغ شده نیز به آن‌ها منتقل شد. تخمک‌ها پس از ۶-۴ ساعت از محیط فعلی به قطره‌های محیط T₆ حاوی ۴ میلی گرم BAS بر میلی لیتر منتقل شدند. وضعیت تخمک‌ها پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ 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 ۱۲۴۷ 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 ۳۴۵ تخمک جدا شد که پس از ۲۴ ساعت در ۲۵/۷۹ درصد آن‌ها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۷۴/۲۰ درصد تخمک‌های نارس مشاهده شد که از نظر آماری نسبت به گروه‌های آزمایشی یک (P=0.0001) و سه (P=0.0001) اختلاف

معنی‌داری را نشان داد و از این میزان ۱۴/۴۹ 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) و سه (P=0.0001) اختلاف معنی‌داری را نشان داد. ۱۴۴ 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 یک و سه نسبت به گروه شاهد افزایش داشت ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در گروه اول (از ۳۳۸ تخمک نارس سالم) پس از ۲۴ ساعت در ۷۷/۹۸ درصد تخمک‌ها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۹۲/۸۸ درصد تخمک‌های نارس مشاهده شد که از نظر آماری با گروه شاهد (P=0.0001) اختلاف معنی‌داری را نشان داد و از این میزان ۱۳/۶۰ درصد هسته شکسته و ۷۹/۲۸ درصد 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

(P=0.001) اختلاف معنی‌داری را نشان داد

در گروه دوم آزمایشی: (از ۲۳۷ تخمک نارس سالم) پس از ۲۴ ساعت در ۲۵/۷۳ درصد آن‌ها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۷۴/۲۶ درصد تخمک‌های نارس مشاهده شد که از این میزان، هسته ۲۱/۵۱ درصد آن‌ها شکسته شد و ۵۲/۷۴ 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).

جدول شماره ۱: مراحل بلوغ و تکوین تخمک های نارس موش در گروه شاهد و گروه های آزمایشی.

گروه های آزمایشی	تعداد تخمک نارس	دوز مصرفی گلو تاتیون	۲۴ ساعت پس از مجاورت	تعداد تخمک بالغ	۲۴ ساعت پس از مجاورت	۴۸ ساعت پس از مجاورت	۷۲ ساعت پس از مجاورت	۹۶ ساعت پس از مجاورت	۲ cell (%)	۴ cell (%)	۸ cell (%)	morul (%)	۲ cell (%)	۴ cell (%)	۸ cell (%)	۲ cell (%)	۴ cell (%)	۸ cell (%)	Total (%)	۲ cell (%)	۴ cell (%)
گروه کنترل	۳۴۵	۰	۲۰۶ %۵۹/۷	۸۹ %۲۵/۷	۱۴۴ %۴۱/۲	۱۷ %۱۱/۶	۷۴ %۵۱	۹۱ %۶۳	۳۸ %۱۱/۲۸	۲۴ %۱۶/۶	۹ %۷/۷	۲۳ %۱۵/۹	۵۰ %۳۴/۲	۲۷ %۱۸/۷	۱۷ %۱۱/۸	۶۴ %۴۴/۴۴	۳۲ %۲۲/۲۲	۹ %۷/۲۵	۹۱ %۶۳	۷۴ %۵۱	۱۷ %۱۱/۶
گروه ۱	۳۳۸	mM۱	۲۳۶۸ %۹/۲	۴۶ %۷/۹	۲۴ %۱۳/۶	۲۱ %۱۳/۶	۵۱ %۳۱	۵۱ %۳۱	۵۱ %۳۱	۲۷ %۱۳/۶	۵ %۳	۷ %۴	۲۹ %۱۸/۷	۲۴ %۱۶/۶	۱۵ %۱۱/۸	۳۵ %۲۲/۲۲	۲۹ %۱۸/۷	۶ %۴	۵۱ %۳۱	۵۱ %۳۱	۲۱ %۱۳/۶
گروه ۲	۲۳۷	0	۲۱۲۵ %۲/۷	۵۱ %۳/۶	۶۱ %۴/۴	۵ %۳	۲۷ %۱۳/۶	۲۷ %۱۳/۶	۲۷ %۱۳/۶	۲۷ %۱۳/۶	۵ %۳	۳ %۲	۱۷ %۱۱/۸	۱۷ %۱۱/۸	۲ %۱	۲۳ %۱۵/۹	۱۰ %۷/۷	۳۲ %۲۲/۲۲	۲۷ %۱۸/۷	۵ %۳	۲۱ %۱۳/۶
گروه ۳	۳۲۷	1mM	۲۲۲۹ %۲/۷	۴۵ %۳/۶	۵۳ %۴/۴	۱۴ %۹	۵۵ %۳۵	۵۵ %۳۵	۵۵ %۳۵	۵۵ %۳۵	۱۴ %۹	۸ %۵	۳۶ %۲۴/۲	۲۷ %۱۸/۷	۱۰ %۷/۷	۳۹ %۲۶/۲۶	۲۹ %۱۸/۷	۵ %۳	۵۵ %۳۵	۵۵ %۳۵	۱۴ %۹

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 تخمک های نارس مشاهده شد که از نظر آماری با گروه کنترل ($P=0.0001$) اختلاف معنی داری 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 معنی داری را نشان داد. ۲۲۹ تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرم های 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 می شود و تا زمان ورود اسپرم به داخل تخمک تحرکات لازم برای رهایی از این توقف و آزادسازی جسمک قطبی به عنوان ادامه میوز صورت می پذیرد (۲۸ تا ۳۰).

در این مطالعه مشخص شد که گلو تاتیون با غلظت ۱mM بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز را در تخمک های نارس موش افزایش می دهد؛ به این ترتیب که میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه های 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 گروه های آزمایشی یک، دو، سه و گروه شاهد به ترتیب ۷۴/۲۸، ۵۲/۷۴، ۷۰/۷۱ و ۵۹ 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 گروه های آزمایشی یک، دو، سه و گروه شاهد به ترتیب ۷۲، ۴۵، ۶۶ و ۶۳ درصد بود. در طی بلوغ تخمک هر گونه نقصی در بلوغ سیتوپلاسمی، تکوین جنین را تحت تاثیر قرار می دهد؛ حتی اگر تخمک، بلوغ هسته ای طبیعی نیز داشته باشد (۲۹). در گوسفند (۳۱)، گاو (۳۲)، بلوغ سیتوپلاسمی به وسیله هم کشتی (CO-Culture) تخمک های محصور شده از گرانولوزا (Cumulus enclosed oocytes) با تکه ای از فولیکول و یا با سلول های گرانولوزا انجام گرفت. Abeydeera و همکارانش (۱۹۹۸) ثابت کردند که در هم کشتی تخمک خوک با تکه ای از فولیکول سطح گلو تاتیون سیتوپلاسمی افزایش می یابد و می دانیم محتوای گلو تاتیون داخل سلولی به طور مستقیم یا

غیرمستقیم نشان دهنده بلوغ سیتوپلاسمی تخمک است (۲۳).

Wang و همکاران (۱۹۹۲) گزارش دادند تکوین

جنین های گاو به بلاستوسیت در اکسیژن ۵ درصد بیش تر از اکسیژن ۱۰ درصد است (۳۴). بنابراین به نظر می رسد که غلظت بالای اکسیژن از رسیدن جنین های گاو به مرحله بلاستوسیت جلوگیری می کند. غلظت بالای اکسیژن در طی کشت آزمایشگاهی بدلیل افزایش انواع اکسیژن فعال (ROS) در سیتوپلاسم جنین های در حال تکوین، توانایی تکوین را کاهش می دهد (۳۵، ۳۶). این ترکیبات شامل پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، آنیون های سوپراکسید (O_2^-) و رادیکال های هیدروکسیل ($OH^\bullet$) هستند که برای غشاهای سلولی (۳۷) و DNA (۶) زیان آور هستند و باعث آپوپتوزیس می شوند (۳۸). H_2O_2 ، $OH^\bullet$ آزاد می کند که با دیگر مولکول ها در سیتوپلاسم، بسیار واکنش می دهد و باعث آسیب سلولی می شود و عملکرد H_2O_2 در تنظیم بیان ژن و غلظتش به وسیله اکسیدازهای مرتبط تنظیم می شود (۳۹). فعالیت اکسیدازی وابسته به غلظت O_2 محیطی دارد و غلظت مناسب اکسیژن برای فعالیت این اکسیدازها در محیط کشت بیش تر از آن هایی است که در بدن قرار دارند (۴۰). مقدار H_2O_2 در جنین های کشت شده تحت فشار اکسیژن ۲۰ درصد بالاست که اکسیدازها تحت این شرایط به مقدار بالاتری تولید می شوند.

تغییرات اکسیداتیو ترکیبات داخل سلولی توسط انواع اکسیژن های واکنش دهنده (ROS) یکی از مهم ترین فرآیندهای خطرناک و مضر برای عملکرد مناسب سلولی است. در بسیاری سلول ها، سیستم های

آنتی اکسیدان کارآمد می توانند فشار اکسیداتیو را توسط به دام انداختن ROS تضعیف کنند (۴۱).

گلوتاتیون یک ترکیب سولفیدریل غیرپروتئینی مهم در سلول های 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، ۲۴) گزارش شده است. این ترکیب دارای ۲ فرم اصلی می باشد ۱-GSH (فرم سولفیدریل) ۲-GSSG (فرم دی سولفید) GSH به عنوان آنتی اکسیدان عمل می کند؛ به این ترتیب که ۲GSH توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز به GSSG تبدیل می شود، این ماده با اکسید خود، H_2O_2 را که ماده ای خطرناک و سمی برای سلول است به آب تبدیل می کند، در نتیجه از این طریق، غلظت ROS کاهش می یابد (۴۲).

گلوتاتیون به واسطه سیکل γ گلوتامیل ساخته می شود (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 می کنند و منجر به افزایش سیستین می شوند که این ماده پیش ساز گلوتاتیون است و باعث افزایش تشکیل گلوتاتیون می شود (۴۵ تا ۴۷). همچنین اضافه کردن سیستامین، بتامرکاپتواتانول و سیستین به محیط کشت بلوغ تخمک گاو و خوک محتوی گلوتاتیون داخل سلولی را بعد از بلوغ افزایش می دهند و تکوین و کیفیت جنین را بهبود می دهد (۱۹، ۲۰). لذا می توان 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 جنین های موش در مرحله ۲ سلولی نقش دارند، در حالی که طبق مطالعات انجام شده گلوتاتیون سلول را از آسیب های اکسیداتیو حفاظت می کند. اضافه کردن بتامرکاپتواتانول به محیط کشت بلوغ تخمک گوسفند، ساخته شدن گلوتاتیون را تحریک می کند 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 گلوکاتیون عامل کلیدی مهمی در کاهش پراکسیدهای داخل سلولی است. در این مطالعه نیز مشخص شد که اضافه کردن گلوکاتیون 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, Jahnsen 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 and human sperm function *J Reprod 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. Repred.* (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 γ -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. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell

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