تاثیر سیستئامین بر از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش و تکوین جنینهای حاصله

حسین ایمانی Ph.D.[☆♦]، فاطمه حسنی M.Sc.[☆☆]، سیدعلی حائری روحانی Ph.D.[☆]، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.[★]
مجتبی رضازاده Ph.D.[★★]، اعظم دالمن M.Sc.[☆☆]، سعید کاظمی آشتیانی Ph.D.[★]، عبدالحسین شاهوردی M.Sc.[★]

☆ دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

★ پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

پست الکترونیک: Email:info@royaninstitute.org

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۱۰/۲۷، پذیرش مقاله: ۸۴/۲/۱۷

* **هدف:** مطالعه تاثیر سیستئامین بر ازسرگیری میوز و بلوغ‌آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش و تکوین جنینهای حاصل از آن

* **مواد و روشها:** تخمکهای نارس از موشهای سوری نژاد NMRI (۶-۴ هفته‌ای) در شرایط استریل جدا شدند. تخمکهای حاصل در ۳ گروه آزمایشی و یک گروه کنترل دسته‌بندی شدند. تخمکهای گروه کنترل در محیط MEMα حاوی FCS ۵ درصد، گروه یک در محیط MEMα حاوی FCS ۵درصد و ۱۰۰ میکرومولار سیستئامین، گروه دو در محیط MEMα حاوی FCS ۵درصد، ۷/۵ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر hCG، ۱۰۰میلی واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر rFSH و تخمکهای گروه ۳ در محیط MEMα حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر hCG، ۱۰۰میلی واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر rFSH و ۱۰۰ میکرومولار سیستئامین قرار داده شدند. تخمکها جهت بلوغ به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷درجه سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد قرار گرفتند.

* **یافته‌ها:** میزان از سرگیری میوز در گروه کنترل و گروههای آزمایشی یک، دو و سه به ترتیب ۷۴/۲۰، ۹۴/۵، ۷۴/۲۴ و ۹۶/۲ درصد است که بین گروه کنترل و گروه آزمایشی یک (p=۰/۰۰۰۱) و گروه آزمایشی سه (p=۰/۰۰۰۱) اختلاف معنی‌داری را نشان داد. همچنین در بلوغ آزمایشگاهی اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل نسبت به گروههای آزمایشی یک (p=۰/۰۰۰۱) و سه (p=۰/۰۰۰۱) وجود داشت که میزان تخمکهای بالغ یافته آزمایشگاهی (MII: Metaphase II) در گروه کنترل و گروههای آزمایشی یک، دو و سه به ترتیب ۵۹/۷۱، ۸۱/۲، ۵۲/۷۴، ۸۵/۶ درصد بود. نرخ تشکیل جنین در گروه یک و سه که سیستئامین به محیط کشت اضافه شد در طی روزهای اول تا چهارم نسبت به دوگروه فاقد این ماده، بیشتر بود، به طوری که در روز اول نرخ تشکیل جنین در گروه یک ۶۹ درصد (p=۰/۰۰۰۱) و در گروه سه ۶۳ درصد بود (p=۰/۰۱) که نسبت به گروه دو(۴۵ درصد) اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

* **نتیجه گیری:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سیستئامین (۱۰۰ میکرومولار) بر از سرگیری میوز، شکسته شدن هسته، آزاد شدن اولین جسمک قطبی و تخمکهای بالغ یافته آزمایشگاهی تاثیر دارد ولی بر تکوین جنینهای حاصله تاثیر چندانی ندارد.

گل واژگان: بلوغ آزمایشگاهی، تخمک نارس، موش، سیستئامین

نشریه پزشکی یاخته، سال هفتم، بهار ۸۴، شماره ۲۵، صفحات ۶-۱

مقدمه

فشار اکسیداتیو نتیجه عدم تعادل بین تولید انواع اکسیژن فعال (ROS: Reactive Oxygen Species) و مکانیسمهای دفاعی آنتی‌اکسیدان سلولی است. ROS خیلی فعال است و شامل انواع رادیکال آزاد از قبیل آنیون سوپراکسید ($O^{\cdot-}_2$) هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot-}$) است که همگی قادرند با لیپیدهای غشا، اسیدهای نوکلییک، پروتیینها، آنزیمها و دیگر مولکولهای کوچک واکنش دهند. که نهایتاً آسیب سلولی را به دنبال دارد. چون رادیکالهای آزاد دارای یک الکترون جفت نشده هستند و این الکترون را از مواد دیگر می‌گیرند تا خنثی شوند به همین دلیل خیلی فعالند. از لحاظ فیزیولوژیکی تولید ROS در متابولیسم سلولی اتفاق می‌افتد. تحت شرایط فیزیولوژیک فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری منبع اصلی ROS داخل سلولی است که ۲درصد از اکسیژنهای تولید شده در طی این چرخه به‌طور ناقص احیا می‌شوند و تولید $O^{\cdot-}_2$ می‌کنند فشار اکسیداتیو باعث انواع متفاوتی از آسیبها، مثل پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، اکسیداسیون آمینواسیدها اسیدهای نوکلییک، آپوپتوزیس و نکروزیس می‌شود (۱، ۲، ۳). غلظت ROS داخل سلولی در سیستمهای آزمایشگاهی افزایش می‌یابد. مثلاً مقادیر بالاتری از $O^{\cdot-}_2$ و

H_2O_2 در مراحل اولیه کلیواژ جنینهای موش تولید شده در آزمایشگاه در مقایسه با بدن مشاهده می‌شود (۲). غلظت اکسیژن در مجاری تناسلی ۹-۳درصد است که مشابه با شرایط استاندارد در آزمایشگاه است (۴). کشت جنینها در آزمایشگاه تحت فشار O_2 ۲۰درصد نسبت به کشت جنینها تحت فشار O_2 ۵ درصد یا O_2 ۷درصد رادیکالهای آزاد بیشتری تولید می‌کند (۵، ۶، ۷). رادیکالهای آزاد در طی کشت اتصال اسپرم - تخمک را مهار می‌کنند (۸). برای حفاظت تخمکها و جنینها از فشار اکسیداتیو در طی کشت اضافه‌کردن آنتی‌اکسیدانها به محیط کشت مفید است برای مثال اضافه کردن آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی خارج سلولی از قبیل سوپراکسیددسموتاز (SOD: Superoxide Dismutase) کاتالازیا آنتی‌اکسیدانهای قابل متابولیزه به محیط کشت پیشنهاد شده است (۹). علاوه بر مکانیسمهای آنزیمی، مکانیسمهای غیرآنزیمی از قبیل گلوتاتیون، ویتامین E و C، تحریک کننده‌های سنتزگلوتاتیون از جمله ترکیبات تیولی از قبیل سیستئامین، بتامرکاپتواتانول می‌توانند تاثیرات ROS را خنثی کنند (۱۰، ۱۱). رونویسی mRNA به اکثر آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی در تخمکها و جنینهای پستانداران صورت می‌گیرد (۱۲).

گلوتاتیون یک ترکیب تری‌پپتیدتیولی است و در همه سلولهای زنده یافت می‌شود و به عنوان مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان در سلولهای پستانداران به شمار می‌رود و نقش مهمی در حفاظت سلول از آسیبهای اکسیداتیو دارد (۱۳).

Yoshida و همکاران گزارش دادند که اتفاق مهمی که در طی بلوغ تخمک خوک پیش می‌آید سنتز کافی گلوتاتیون است. همچنین نشان دادند که سطوح بالای گلوتاتیون به تشکیل کمپلکس اسپرم تخمک برای تکوین (MPN: Male Pronucleus) کمک می‌کند (۱۴). Yamauchi و همکاران نشان دادند گلوتاتیون در سنتز پروتیین، DNA و انتقال آمینواسیدها در داخل تخمکهای در حال بلوغ نقش دارد. کمبود گلوتاتیون در تخمکها قبل از لقاح باعث می‌شود که تشکیل MPF بعد از لقاح دچار نقصان شود (۱۵). سنتز گلوتاتیون در طی بلوغ تخمک در موش (۱۶) هامستر (۱۷) و خوک (۱۸) گزارش شده است. بنابراین سطح گلوتاتیون یافت شده در انتهای بلوغ تخمک به عنوان یک شاخص بیوشیمیایی خوب برای بقا (Viability) تخمک است (۱۹).

بلوغ تخمک مستلزم بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسم است. تغییرات مولکولی بی‌شماری از جمله فسفریلاسیون پروتیینها و فعال شدن راههای متابولیکی ویژه در بلوغ سیتوپلاسمی دخالت دارند که از جمله این راهها سنتز گلوتاتیون است (۲۰). در تخمک گاو میزان گلوتاتیون بعد از بلوغ آزمایشگاهی (IVM) شاخصی برای بلوغ سیتوپلاسمی است (۲۱). ترکیبات تیولی با وزن مولکولی کم از جمله سیستئامین و بتامرکاپتواتانول سنتز گلوتاتیون داخل سیتوپلاسمی را افزایش می‌دهند و از این طریق سرعت تکوین جنین را بهبود می‌بخشند (۲۲). اضافه کردن سیستئامین طی IVM تخمکهای خوک موجب بلوغ سیتوپلاسمی می‌شود (۲۳). همچنین اضافه کردن این ماده در طی IVM به تخمک گوسفند (۲۴) و بوفالو (۲۵) سرعت تکوین جنین حاصله را بهبود می‌دهد. با توجه به مطالب فوق هدف از این مطالعه بررسی تاثیر سیستئامین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بر روند از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش و تکوین جنینهای حاصل از آن می‌باشد.

مواد و روشها

تهیه تخمکهای نارس

در این تحقیق از موشهای سوری نژاد NMRI (۶-۴هفته‌ای) تهیه شده از انستیتو رازی 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 MEMα حاوی FCS ۵درصد، چربیهای اضافی اطراف تخمدان حذف و با استفاده از سرنگهای انسولین تشریح (Dissect) شده و فولیکولهای نارس حاوی ژرمینال وزیکول همراه با سلولهای گرانولوزا جدا شد. سپس با روش پیپت کردن سلولهای گرانولوزای اطراف آن برداشته شد.

تخمکهای نارس هسته‌دار (GV: Germinal Vesicle) با سیتوپلاسم روشن، قشر شفاف (ZP: Zona Pellucida) یکنواخت با فضای دور زرده (Perivittline) مناسب برای ۴ گروه انتخاب شدند.

بلوغ تخمکها

گروه کنترل: ۳۴۵ تخمک نارس از موشهای طبیعی گرفته شده و در محیط MEMα حاوی FCS ۵درصد قرار داده شد.

گروه یک: ۲۹۲ تخمک نارس در محیط MEMα حاوی FCS ۵ درصد و ۱۰۰ میکرومولار سیستئامین (۲۲، ۳۰) قرار داده شد.

گروه دو : ۲۳۷ تخمک نارس در محیط MEMα حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵ واحد بین المللی در میلی‌لیتر hCG، ۱۰۰میلی واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر rFSH (۳۷) قرار داده شد.

گروه سه: ۲۶۴ تخمک نارس در محیط MEMα حاوی FCS ۵درصد، ۷/۵ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر hCG، ۱۰۰میلی واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر rFSH و ۱۰۰ میکرومولار سیستئامین قرار داده شد. تخمکهای هر گروه به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷درجه 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 شد.

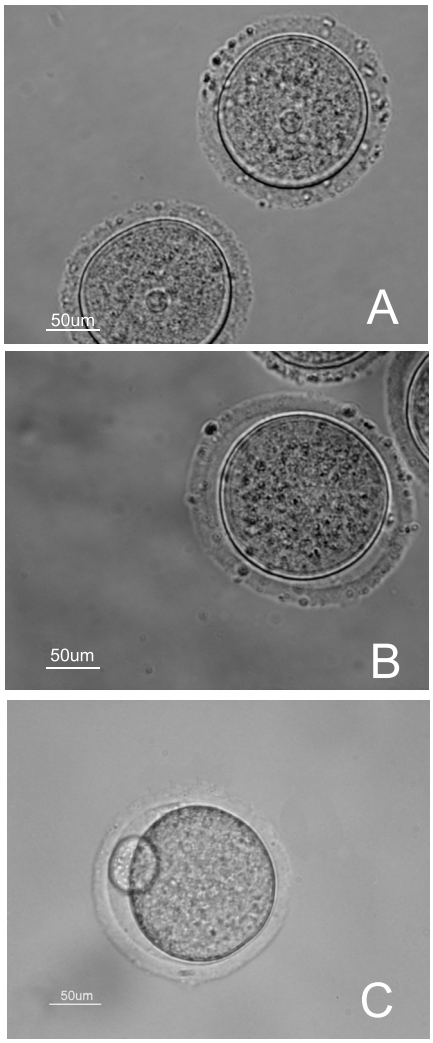
تخمکهای بدون تغییر شکل در هسته را با عنوان تخمکهای نارس، تخمکهای با هسته شکسته شده به عنوان (GVB: Germinal Vesicle Breakdown) با نشانه شروع تقسیم میوز و تخمکهای دارای جسم قطبی به عنوان تخمکهای بالغ یا (MII) شناسایی شد (شکل ۱).

لقاح و تکوین تخمکهای بالغ شده

ابتدا موشهای سوری نژاد NMRI به روش قطع نخاع کشته

شـد، دم اپـیدیدم آنـها جـدا و به قـطرات ۵۰۰ مـیکرولیتری مـحیط کـشت T_6 حـاوی ۴ مـیلی‌گرم سـرم آلبـومینی گـاوی (BSA: Bovin Serum Albumin) در هر میلی‌لیتر منتقل شد.

سپس نـمونه‌ها به مـدت ۱/۵ سـاعت در داخـل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO_2 ۵درصد انکوبه شد.



شکل ۱: Germinal Vesicle; A: GV
B: GVB; Germinal Vesicle Breakdown
Metaphase II; C: MII
(مشاهده تصویر رنگی در انتهای مقالات)

بـا انـتقال اسـپرمهای فـعال و سـالم از کـنار قـطره (در هـر مـیلی‌لیتر ۱×۱۰^{۵} عـدد اسپرم) به داخل قطرات محیط T_6 حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA، تخمکهای بالغ شده نیز به آنها منتقل شد. تخمکها پس از ۶-۴ ساعت از محیط فعلی به قطره‌های محیط T_6حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA منتقل شدند. وضعیت تخمکها پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به وسیله میکروسکوپ معکوس برای ثبت مراحل تکوین جنین بررسی و نتایج حاصل با آزمون آماری Chi-Square بررسی شد.

یافته‌ها

در ایـن مـطالعه ۱۱۳۸ تـخمک نـارس و سـالم از تـخمدان مـوشهای سـوری جدا شـده و به‌طـور تـصادفی در ۳ گـروه آزمـایشی و یـک گـروه کنترل تقسیم‌بندی شد. همان طوری که در جدول یک و دو آمده است در گروه کنترل ۳۴۵ تخمک جدا شد که پس از ۲۴ ساعت، در ۲۵/۷۹ درصد آنها نشانی از علایم از سرگیری میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۷۴/۲۰ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که نسبت به گروه یک و گـروه سه (p=۰/۰۰۰۱) اخـتلاف مـعنی‌داری را نـشان داد. از ایـن مـیزان ۱۴/۴ درصد هسته آنها شکسته شد و ۵۹/۷۱ درصد تخمکها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند. میزان بلوغ در گروه کنترل نسبت به گروه یک و سه اخـتلاف مـعنی‌داری (p=۰/۰۰۰۱) را نـشان داد (جـدول ۱). ۱۴۴ تـخمک بـالغ شـده در آزمـایشگاه بـا اسـپرم‌های مـوش نـر مـجاور (inseminate) شدند. میزان لقاح و وضعیت تکامل تخمکهای بارور شده در جدول دو آمده است. در روز اول نرخ تشکیل جنین ۶۳ درصد بـود که ۵۱ درصـد آنـها دو سـلولی و ۱۱ درصـد ۴ سـلولی بـودند. نـرخ تـشکیل جنین در ایـن گـروه نـسبت به گـروه دو اخـتلاف مـعنی داری را نـشان داد. نـرخ تـشکیل جنین در گـروه یك و گـروه سه نـسبت به گـروه کـنترل بـالاتر بـود ولی اختلاف معنی داری را نشان نـداد. در گـروه اول آزمـایشی از ۲۹۲ تـخمک نـارس سـالم پس از ۲۴ سـاعت در ۵/۷درصد تـخمکها نـشانی از عـلایم شـروع میوز دیـده نـشد. از سـرگیری میوز در ۹۴/۵درصـد تـخمکهای نـارس مـشاهده شـد که نـسبت به گـروه کـنترل و گـروه دو (p=۰/۰۰۰۱) اخـتلاف مـعنی داری را نـشان داد ولی نـسبت به گروه سه تفاوت معنی داری را نشان نداد. از این میزان ۸/۹درصد هسته آنـها شـکسته شـد و ۸۵/۶ درصـد تـخمکها تـا مـرحله MII پیشرفته و بـالغ شـدند که از نـظر آمـاری بـا گـروه کـنترل (p=۰/۰۰۰۱) و گـروه سه (p=۰/۰۰۰۱) اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۱).

جدول ۱: تاثیر سیستئامین بر بلوغ میوزی تخمکهای نارس موش کشت شده در آزمایشگاه پس از ۲۴ ساعت

گروههای آزمایشی	دوز سیستئامین (میکرومولار)	تعداد تخمکها	GV	GVB	MII
گروه کنترل	۰	۳۴۵	۸۹ ۲۵/۷درصد	۵۰ ۱۴/۴ درصد	۲۰۶ ۵۹/۷ درصد
گروه یک	۱۰۰	۲۹۲	۱۶ ۵/۴ درصد	۲۶ ۸/۹ درصد	*۲۵۰ ۸۵/۶ درصد
گروه دو	۰	۲۳۷	۶۱ ۲۵/۷ درصد	۵۱ ۲۱/۵ درصد	۱۲۵ ۵۲/۷ درصد
گروه سه	۱۰۰	۲۶۴	۱۰ ۳/۷درصد	۳۸ ۱۴/۳ درصد	*۲۱۶ ۸۱/۸ درصد

*** : نسبت به گروه دو تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (p=۰/۰۰۰۱)**
GV; Germinal Vesicle, GVB; Germinal Vesicle Breakdown, MII; Metaphase II

جدول ۲: مراحل تکوین آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش در محیط FCS ۵درصد + MEMα (گروه کنترل) و گروههای آزمایشی

گروههای آزمایشی	دوز مصرفی Cysteamine	تعداد تخمکهای بالغ	۲۴ ساعت پس از Inseminate				۴۸ ساعت پس از Inseminate				۷۲ ساعت پس از Inseminate					۹۶ ساعت پس از Inseminate					
			۲ سلولی (درصد)	۲ سلولی (درصد)	Total		۸ سلولی (درصد)	۴ سلولی (درصد)	۲ سلولی (درصد)	Total	مورولا (درصد)	۸ سلولی (درصد)	۴ سلولی (درصد)	۲ سلولی (درصد)	Total	late.B (درصد)	Early B (درصد)	مورولا (درصد)	۸ سلولی (درصد)	۴ سلولی (درصد)	۲ سلولی (درصد)	Total
گروه کنترل	۰	۱۴۴	۱۷ ۱۱/۸ درصد	۷۴ ۵۱/۳ درصد	۹۱ ۶۳ رصد		۹ ۶/۲ درصد	۳۲ ۲۲/۲ درصد	۶۴ ۴۴/۴ درصد	۱۰۵ ۷۲درصد		۱۷ ۱۱/۸ درصد	۲۷ ۸۱/۷ درصد	۵۰ ۳۴/۷ درصد	۹۴ ۶۵/۲ درصد	۱ ۶درصد	۳ ۲درصد	۲۳ ۱۵/۹ درصد	۹ ۶/۲ درصد	۲۴ ۱۶/۶ درصد	۳۸ ۲۶/۳ درصد	۷۸ ۵۴درصد
گروه ۱	۱۰۰ میکرومولار	۱۱۹	۲۲ ۱۸/۴۸ درصد	۶۱ ۵۱درصد	*۸۳ ۶۹/۷ درصد		۵ ۴/۲ درصد	۲۶ ۲۱/۸ درصد	۵۹ ۴۹/۵ درصد	۹۰ ۷۵درصد	۶ ۵درصد	۱۱ ۹/۲ درصد	۲۴ ۲۰درصد	۴۵ ۳۷/۸ درصد	۸۶ ۷۲/۲ درصد			۸ ۶/۷ درصد	۱۲ ۱۰درصد	۱۳ ۱۰/۹ درصد	۳۲ ۲۶/۸ درصد	۶۵ ۵۴درصد
گروه ۲	۰	۷۰	۵ ۷/۱۴ درصد	۲۷ ۳۸/۵ درصد	۳۲ ۴۵/۷ درصد			۱۰ ۱۴/۲ درصد	۲۳ ۳۲/۸ درصد	۳۳ ۴۷درصد	۲ ۵/۵ درصد	۱۷ ۲۴درصد	۱۷ ۲۴درصد	۱۷ ۲۴درصد	۳۶ ۵۱درصد			۲ ۲/۸ درصد	۳ ۴/۲ درصد	۸ ۱۱/۴ درصد	۱۶ ۲۲/۸ درصد	۲۹ ۴۱درصد
گروه ۳	۱۰۰ میکرومولار	۹۸	۱۳ ۱۳/۲ درصد	۵۰ ۵۱درصد	**۶۳ ۶۴/۲ درصد		۲۳ ۲۳/۴ درصد	۴۶ ۴۶/۹ درصد	۶۹ ۷۰درصد	۳ ۳درصد	۱۶ ۱۶/۳ درصد	۱۶ ۱۶/۳ درصد	۳۹ ۳۹/۷ درصد	۷۴ ۷۵درصد			۶ ۶/۱ درصد	۲۴ ۲۴/۴ درصد	۱۰ ۱۰/۲ درصد	۲۴ ۲۴/۴ درصد	۶۴ ۶۵درصد
														جنینهای متوقف شده						جنینهای متوقف شده	

* گروه یک نسبت به گروه دو اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P=0.01)
* گروه سه نسبت ب گروه دو اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P=0.001)
Early B: Early Blastocyst
Late B: Blastocyst

۱۱۹ تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرمهای موش نر مجاور Inseminate شدند. میزان لقاح و وضعیت تکامل تخمکهای بارور شده در جدول دو آمده است. نرخ تشکیل جنین در روز اول ۶۹/۷درصد بود که نسبت به گروه دو (p=۰/۰۰۱) اختلاف معنی‌داری را نشان داد و نسبت به گروه کنترل و گروه سه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. درگروه دوم آزمایشی ۲۳۷ تخمک نارس سالم جدا شد. پس از ۲۴ ساعت در ۲۵/۷۳ درصد آنها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۷۴/۲۶درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که نسبت به گروه یک و سه (p=۰/۰۰۰۱) کاهش چشم‌گیری داشت و اختلاف معنی‌داری را نشان داد ولی با گروه کنترل اختلاف چندانی نداشت. از این میزان هسته ۲۱/۵۱درصد آنها شکسته شد و ۵۲/۷۴درصد آنها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند که با گروه یک و گروه سه (p=۰/۰۰۰۱) اختلاف معنی‌داری را نشان داد (جدول ۱).

۷۰ تخمک بالغ شده با اسپرم موش نر مجاور شدند. میزان لقاح و وضعیت تکامل تخمکهای بارور شده در جدول دو آمده است. نرخ تشکیل جنین در روز اول نسبت به گروههای آزمایشی یک (p=۰/۰۰۱) و سه (p=۰/۰۱) اختلاف معنی‌داری داشت.

در گروه سوم آزمایشی ۲۶۴ تخمک نارس سالم جدا شد. پس از ۲۴ ساعت در ۳/۷درصد آنها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۹۶/۲درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که نسبت به گروه کنترل و گروه دو (p=۰/۰۰۰۱) اختلاف معنی‌داری را نشان داد. از این میزان ۱۴/۳درصد آنها شکسته شده و ۸۱/۸درصد آنها تا مرحله MII پیش رفتند و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه کنترل و گروه دو (p=۰/۰۰۰۱) اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۱).
۹۸ تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرمهای موش نر مجاور شدند. میزان لقاح و وضعیت تکامل تخمکهای بارور شده در جدول دو آمده است. نرخ تشکیل جنین در روز اول ۶۴درصد بود که نسبت به گروه دو اختلاف معنی‌داری را نشان داد (p=۰/۰۱) ولی با گروه کنترل تفاوت چندانی نداشت.

بحث

در این مطالعه تاثیر سیستئامین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک نارس موش و جنینهای حاصله بررسی گردید. این ماده یک ترکیب تیولی با وزن مولکولی کم است. اضافه کردن این ماده به محیط کشت بلوغ تخمکهای نارس موش، از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس را افزایش داد. نرخ تشکیل جنینها را نیز افزایش داد. هنگام IVM و کشت جنینها رادیکالهای آزاد اکسیژن تولید می‌شوند. اگر در طی متابولیسم گلوکز در میتوکندری طی چرخه انتقال الکترون برای تولید (ATP: Adenosine Triphosphate) (آدنوزین‌تری‌فسفات)، اکسیژن به صورت ناقص احیا گردد به جای تولید آب رادیکال آزاد اکسیژن تولید می‌شود OH^-، H_2O_2 را آزاد می‌کند که با دیگر مولکولهای سیتوپلاسمی واکنش شدید نشان می‌دهد و باعث آسیب سلولی می‌شود (۳). کشت جنینها تحت فشار اکسیژن ۲۰درصد در آزمایشگاه نسبت به جنینهایی که تحت فشار O_2 ۵درصد یا ۷درصد کشت داده شده‌اند رادیکالهای آزاد بیشتری تولید می‌شود (۵، ۶، ۷). مشخص شده است که تعادل بین تولید ROS و به دام اندازنده‌ها (Scavengering) فاکتور مهمی برای به دست آوردن توانایی لقاح در آزمایشگاه است (۱۶). به نظر می‌رسد که جنینها در آزمایشگاه در معرض فشار اکسیداتیو قرار می‌گیرند و مکانیسمهای دفاعیشان برای حفاظت از ساختمانهای سلولی ظریفشان کارآیی ندارد. تاثیرات مضر ROS در کشت آزمایشگاهی باعث اختلال میتوکندری، آسیب به DNA، RNA و پروتیین می‌شود فشار اکسیداتیو باعث قطعه

قطعه شدن DNA و موتاسیون می‌شود که توانایی تکوین جنینی را کاهش می‌دهد. با توجه به آسیبهای وارده به سلول و برای حفاظت تخمکها و جنینها اضافه کردن آنتی‌اکسیدانها به محیط کشت تخمک ضروری به نظر می‌رسد (۲۶).

(GSH: Glutathione Sulfhydryl) (گلوتاتیون) یک ترکیب سولفیدریل غیرپروتیینی است که در سلولهای پستانداران وجود دارد و نقش مهمی در حفاظت سلولی از آسیب اکسیداتیو دارد. با نزدیکی تخمک به زمان اوولاسیون (تخمک‌گذاری) در تخمدان، محتوای گلوتاتیون افزایش می‌یابد. بعد از لقاح به موازات تخمک‌گذاری، گلوتاتیون در Decondensation اسپرم شرکت می‌کند و این امر باعث انتقال سر اسپرم در حال لقاح به پرونوکلیوس نر می‌شود (۱۴، ۱۶، ۱۷). مشخص شده است که غلظت گلوتاتیون داخل سیتوپلاسمی در جنینهای گاو در تکوین آزمایشگاهی متفاوت است. کمترین مقدار آن در جنینهای ۸-۲ سلولی و بالاترین مقدار آن در بلاستوسیستهای خارج شده از زونا پلاسیدا است (۲۷). افزایش سنتز گلوتاتیون در مرحله ۱۶-۹ سلولی است که منطبق با آغاز فعال‌سازی ژنوم جنینی است (۲۸). همچنین در جنینهای موش از مرحله اولیه جنینی تا مرحله مورولا توانایی محدودی برای سنتزگلوتاتیون دارند در حالی که بلاستوسیتها توانایی سنتز این ماده را دارند (۲۹). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که سنتز مقداری از گلوتاتیون در طی بلوغ آزمایشگاهی تخمک مورد نیاز است تا مراحل بعدی تکوین جنین را حمایت کند، تا زمانی که جنینها توانایی بیوسنتز این ماده را به دست آورند. ثابت شده است که جنینهای گاو قادرند گلوتاتیون را بعد از فعال‌سازی ژنوم جنین سنتزکنند (۳۰).

GSH یک آنتی‌اکسیدان مهم در سلولهای پستانداران به شمار می‌رود. دارای دو شکل اصلی است. GSH (شکل سولفیدریل) و (GSSG: Glutathion disulphide) (شکل دی‌سولفید) است که ۲GSH توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز به GSSG که فرم اکسید آن است تبدیل می‌شود اکسید شدن این ماده باعث می‌شود که $H_2O_2 \rightarrow H_2O$ تبدیل گردد و از طرفی این ماده بلوغ سیتوپلاسمی را افزایش می‌دهد که در نتیجهٔ بلوغ سیتوپلاسمی تکوین جنینی بهبود می‌یابد (۳، ۳۱). GSH توسط چرخه گاماگلوتامیل سیستئین سنتتاز سنتز می‌شود (۳۲). سنتز این ماده وابسته به در دسترس بودن سیستئین در محیط خارج سلولی است (۳۳). سیستئین ناپایدار است و سریعاً به سیستین اکسید می‌شود، کمبود سیستئین در محیط کشت نتیجه اکسیداسیون خود به خودی سیستئین است که با تضعیف سنتز گلوتاتیون در محیط کشت همراه است. اضافه کردن ترکیبات تیولی با وزن مولکولی کم از جمله سیستئامین و بتامرکاپتواتانول به محیط کشت باندهای دی‌سولفید سیستین را می‌شکنند و سیستین را به سیستئین احیا می‌کنند و در نتیجه باعث افزایش سیستئین می‌شود که این ماده پیش‌ساز گلوتاتیون است و بنابراین سنتز گلوتاتیون افزایش می‌یابد و از این طریق تکوین جنین را بهبود می‌دهند (۳۰، ۳۴، ۳۶).

در این مطالعه سیستئامین از سرگیری میوز را به طور چشم‌گیری افزایش داد. در گروه یک و گروه سه که حاوی این ماده بودند از سرگیری میوز به ترتیب ۹۴/۵درصد و ۹۶/۲درصد بود که نسبت به گروه کنترل ۷۴درصد و گروه دو ۷۴درصد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. بلوغ آزمایشگاهی تخمک نیز تحت تاثیر این ماده به نحو چشم‌گیری افزایش نشان داده است. در گروه یک و سه میزان بلوغ به ترتیب ۸۵/۶درصد و ۸۱/۸درصد بود که نسبت به گروه کنترل ۵۹/۷درصد و گروه دو ۵۲/۷درصد اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

در این مطالعه تاثیر سیستئامین با هورمون و بدون هورمون مورد مطالعه قرار گرفت. از سرگیری میوز در گروه یک ۹۴/۵درصد بود و در گروه سه که حاوی هورمون می باشد ۹۶درصد است که تفاوت چندانی با یکدیگر ندارند. در میزان بلوغ آزمایشگاهی و تکوین جنین بین دو گروه اختلاف چندانی وجود ندارد و نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اضافه کردن هورمون به همراه سیستئامین تاثیر چندانی بر بلوغ آزمایشگاهی از سرگیری میوز و تکوین جنین در آزمایشگاه ندارد. در این مطالعه سیستئامین نرخ تشکیل جنین را افزایش داد به طوری که در گروه یک و سه که این ماده به محیط کشت اضافه شده بود در روز اول نسبت به گروه دو اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که سیستئامین با غلظت ۱۰۰میکرومولار از سرگیری میوز، بلوغ آزمایشگاهی را بهبود می‌بخشد و بر تکوین جنینهای حاصله تاثیر چندانی ندارد که احتمالاً به دلیل افزایش سنتز گلوتاتیون و در نتیجه کاهش ROS می‌باشد.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینهٔ پژوهش حاضر از محل بودجه طرح بلوغ تخمک پژوهشکده رویان تامین گردیده است بر خود فرض می‌داریم از جناب آقای فاخری کارشناس آزمایشگاه و آقای دکتر عشرتی به جهت تقبل آنالیز آماری تشکر کنیم.

References

1. Halliwell B, Gutteridge JMC: Review article: Free radicals, atioxiats and human disease: where are we now? Lab Clin Med 1992; 119: 598-620
2. Feugang JM, Roover R, Meons A, Leonard S: Addition of β-meraphothanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improres the quality of bovine balstocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. Theriogenology 2004; 1: 71-90
3. Uday B, Dipak D, Ranajit K: Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. Current Science 1999; 77: 658-666
4. Mastrioanni L, Jones R: Oxygen tensions in the rabbit falbpian tube. J Reprod Fertil 1965; 9: 99-102
5. Fowjer CJ, Callingham BA: Substrate selective activation of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by oxygen. Biochem Pharmacol 1978; 2: 1995-2000
6. Liu Z, Foote RH: Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide and taurine and with five and twenty percent O2. Biol Reprod 1995; 53: 786-790
7. Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH: Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage

stages embryos developmented in vitro or in vivo Develop 1990; 109: 501-507
8. Aitken RJ. Harkiss D, Buchinghom D: Relationship between iron catalysed lipid peroxidation potential on human sperm function. J Reprod Fertil 1993; 98: 257-265
9. Meister A: Selective modification of glutathione metabolism. Sience 1983; 220: 472-477
10. Lequarre AS, Feugag JM, Malhomme O: Expression of CU/ZN and Mn superoxide dismutase during bovine embryo development: influence of in vitro culture. Mol Reprod Dev 2001; 58: 45-53
11. Gardiner CS, Reed JO: Status of glutathione during oxidant induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. Biol Reprod 1994: 51: 1307-1314
12. El Mouatassim S, Guerin P, Menezo Y: Expression of genes encoding antioxidants enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. Mol Hum Reprod 1999: 5: 720-725
13. Daniel G: Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. Theriogenoly 2002; 57: 1443-1451
14. Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyn M, Pursel VG: Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to from male pronucleus. Biol Reprod 1993; 49: 89-94
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: 828-833
16. Calvin HI, Grosshan 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: 256-275
17. Perreault SD, Salott VI: Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondencing activitg in matuning hamster oocytes. Dev Biol 1988; 125: 181-186
18. Miyamura M, Yoshida M, Hamano S: Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. Theriogenology 1995; 43: 282
19. Funahashi H, Stampf 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: 273-281
20. Eppig J: Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. Reprod fertile Dev 1996; 8: 985-989
21. 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
22. 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
23. YZ Bing T, Nagaiad H, Rodrigue Z-Martinez: Effect of cysteamiru, FSH and estradiol 1713 on in vitro maturation of porcine oocytes. Theriogenology 2001; 55: 878-887
24. Daniel G: Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. Theriogerology 2002; 57: 1443-1451
25. Parrini BG, Neglia G, Palo RD: Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. Theriogenology 2000; 54: 1537-1542
26. Compoti M: Three models of free radical induced cell injury. Chem Biol Intract 1989; 72: 1-56
27. Lim JM, Liou SS, Hansel W: Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β-mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. Theriogenology 1996; 46: 429-439
28. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA: Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. Mol Reprod Dev 1990; 26: 90-100
29. Gardiner CS, Reed DJ: Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. Arch Biochem Biophys 1995; 318: 30-36
30. Gasparrini B, Sayond H, Neglia G, DE Matos D: Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (bubalus bubalus) oocytes: effect of cysteamine on embryo development. Theriogenology 2003; 60: 943-952
31. Daniel G, de Matos D, Bianca G, Sergio R, Jeremy G: Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. Theriogenology 2002; 17: 1443-1451
32. Meister A, Tate SS: Glutathione and the related γ-glutamyl compounds: biosynthesis and utilitization. Ann Rev biochem 1976; 45: 559-604
33. 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: 373
34. Barnnai S: Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. Biochem Biophys Acta 1984; 779: 289-306
35. Ishii T, Hishamura I, Bannai S, Sugita Y: Mechanism of growth promotion of mouse lymphoma L 1210 cells in vitro by feeder layer or 2-mercaptoethanol J Cell Physiol 1981; 107: 283-293
36. Issels RD, Nagele A, Eckert KG: Wilmannsw. promotion of cysteine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetyl-cysteine. Biochem Pharmacol 1988; 37(5): 881-888
37. Sun F, Betzendahl I, Shen Y, Cortvindt R, Smitz J, Ritter U: Preantral follicle culture as a novel in vitro assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes Mol Biol. 2004; 19: 13-22