مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۲، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۰، ۳۹۳-۳۸۷

اثر پراکسید هیدروژن و ملاتونین بر بلوغ هسته‌ای اووسیت در شرایط برون تنی

کاظم بیابانی[۱]، احمد زارع شحنه[۱]، حمید کهرام[۱]، مهدی خدایی مطلق[۲*]

۱- گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی ، گروه علوم دامی، کدپستی: ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-motlagh@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۶

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از هیدروژن پراکسید بر بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های نابالغ گوسفند بود.

مواد و روش‌ها: تخمدان‌ها از کشتارگاه جمع آوری و استحصال اووسیت به روش استاندارد انجام گرفت، کشت اووسیت‌ها در الف: TCM199 به علاوه ۱۰ درصد FBS، ۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر FSH ، ۰/۰۱ واحد بین المللی در میلی لیتر LH ، ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ب: الف + H_2O_2 ۳۰۰ میکرو مولار با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، پ: ب + ۱ میکرو مولار ملاتونین و ت: ب + ۱۰ میکرو مولار ملاتونین انجام شد.

نتایج: این مطالعه نشان داد که H_2O_2، بلوغ هسته‌ای را بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد (۱۴/۷در مقابل ۸۴/۹). ملاتونین با غلظت صفر، ۱ و ۱۰ میکرو مولار توانست هنگام تنش اکسیداتیو میزان اووسیت‌هایی که به متافاز-۲ می‌رسند را افزایش دهد (به ترتیب ۱۴/۷ در مقابل ۴۳/۲۹ و ۵۴/۱۲)، اما با افزایش غلظت ملاتونین از ۱ به ۱۰ میکرو مولار، تاثیر معنی‌داری روی بلوغ اووسیت‌ها نداشت.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ملاتونین هنگام تنش اکسیداتیو بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های گوسفند را بهبود می‌بخشد.

واژگان کلیدی: تنش اکسیداتیو، ملاتونین، اووسیت گوسفند

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

عوامل مختلفی در محیط کشت مانند تعادل تغذیه‌ای و هورمونی و همچنین تنش‌های متنوع مثل اکسیداتیو، گرما و ... در بلوغ آزمایشگاهی تخمک اثرگذار می‌باشند (۱). کشت تخمک در محیط آزمایشگاهی به دلیل تغییر در شرایط رشد مانند افزایش نور، اکسیژن، غلظت بالای متابولیت‌ها و سوبستراها سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در طول مدت زمان متابولیسم هوازی تخمک می‌شوند و در نتیجه تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد. رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها یا مولکول‌هایی هستند که به سبب دارا بودن یک یا چند الکترون جفت نشده، از فعالیت زیادی برخوردارند و به دلیل داشتن تک الکترون، هنگام گردش خون، می‌توانند به ماکرومولکول‌های حیاتی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها، DNAجانداران و کربوهیدرات‌ها متصل شده و آسیب جبران ناپذیری وارد کنند (۲).

ROS(Reactive Oxygen Species) شامل هیدروژن پراکساید، یون اکسیژن و هیدروکسیل رادیکال می‌باشد (۳) که افزایش غلظت مولکول‌های ROS در محیط کشت سبب تنش اکسیداتیو شده و به غشای سلول و DNA آسیب زده و از طرفی سبب آپوپتوزیس خواهد شد (۴). رادیکال‌های آزاد سبب از کارافتادن میتوکندری‌ها، آسیب DNA و RNA و پروتئین ها می شود (۵). کاهش غلظت مولکول‌های ROS در محیط کشت جهت بلوغ تخمک ضروری می‌باشد (۶). سلول‌های کومولوس با فعالیت آنتی اکسیدانتی خود به کمک گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز سبب خنثی شدن آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداسیون می‌شوند (۷).

یکی از راه‌های کاهش تنش اکسیداتیو در محیط کشت آزمایشگاهی بلوغ تخمک، استفاده از آنتی اکسیدانت‌ها می‌باشد. ملاتونین، مهم‌ترین هورمون غده صنوبری، در ابتدا به عنوان هورمون موثر در فیزیولوژی تولید مثل، در حیوان‌هایی که تولید مثل فصلی داشتند شناسایی شد. اخیرا گزارش شده است که ملاتونین بطور مستقیم رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد و بطور غیر مستقیم نیز با تحریک آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، در از بین بردن رادیکال‌های پراکسید هیدروژن دو برابر قوی تر از ویتامین E عمل می‌کند (۸). ملاتونین در برخی مواقع ممکن است سبب ترمیم برخی از مولکول‌هایی که اکسیده شده شود (۹). بطور کلی ملاتونین بیوانرژتیک سلول را بهبود بخشیده، مکانیسم‌های ترمیم کننده ژنوم میتوکندری را فعال کرده و تولید ATP را افزایش می‌دهد (۱۰). از طرف دیگر ملاتونین لیپید را در غشا، پروتئین را در سیتوزول و DNA را در هسته از آسیب رادیکال‌های آزاد حمایت می‌کند (۱۱). ملاتونین از طریق افزایش آنزیم‌های اصلی آنتی اکسیدانت مانند گلوتاتیون ردوکتاز، گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز سبب کاهش رادیکال‌های آزاد یا ROS می‌شود و همچنین مولکول‌های مخالف تنش اکسیداتیو را افزایش می‌دهد. برخی از اثرات ملاتونین از طریق غشا میانجی‌گری می‌شود و احتمالا گیرنده‌های غشایی و هسته ای در تسهیل اثرات آنتی اکسیدانتی ملاتونین درگیر می‌باشند بطوری که ملاتونین به راحتی از غشاهای بیولوژیک وارد سلول شده و تاثیر می‌گذارد (۱۲). پیشنهاد شده است که بافت‌های حساس مانند تخمدان، بیضه، مغز استخوان و لوله‌های گوارشی که در معرض تنش‌های اکسیداتیو قرار دارند می‌توانند به سرعت ملاتونین تولید نمایند (۱۳).

با تفاسیر به عمل آمده می‌توان انتظار داشت که ملاتونین هنگام تنش اکسیداتیو، اووسیت را از گامه‌ی بلوغ تا تبدیل شدن آن به رویان قابل انتقال، از تنش اکسیداتیو حفظ نموده و قابلیت رشد و نمو آن را بهبود بخشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از هیدروژن پراکسید بر بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های نابالغ گوسفند بود.

مواد و روش‌ها

به منظور تهیه اووسیت‌های گوسفندی، تخمدان‌ها بلافاصله پس از کشتار از لاشه دام جدا و در درون فلاسک حاوی سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد نرمال به همراه ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی سیلین و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین در هر میلی لیتر و در دمای ۳۴-۳۰ درجه سانتی‌گراد در مدت کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. کمپلکس‌های کومولوس- اووسیت (Cumulus – Oocyte Complexes) با روش آسپیره کردن از فولیکول‌های آنترال با قطر ۶-۲ میلی متر با استفاده از سوزن ۲۰ گرم که به دستگاه مکش متصل بود انجام شد. سپس COC ها در محیط کشت H-TCM199+۱۰ درصد FBS، ۵۰ میکرو لیتر هپارین، ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی‌لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر استرپتومایسین بود جمع آوری شد. پس از ارزیابی، فقط COC هایی که دارای سیتوپلاسم یکنواخت با سلول‌های پوشیده از کومولوس بود انتخاب شد و پس از ۴ بار

www.SID.ir
Archive of SID

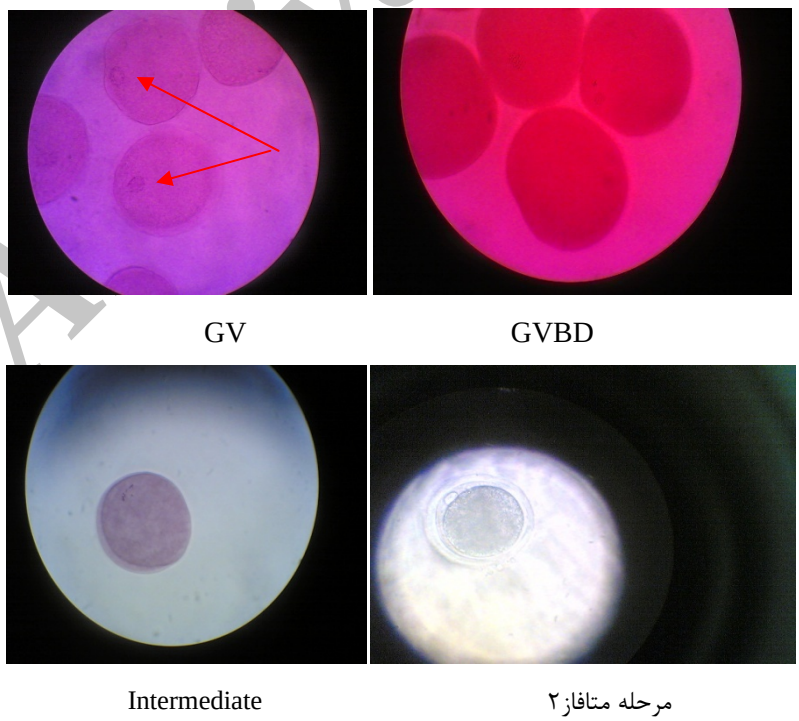
شستشو در محیط بدون هپارین، در قطره های ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت بلوغ در گروههای ۱۰-۸ تایی قرار داده شد و روی آن‌ها با روغن معدنی پوشانده شد. سپس درون انکوباتوری که دمای آن ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد بوده و دارای ۵ درصد گازکربنیک و هوای بسیار مرطوب بود به مدت ۲۷ ساعت بالغ شدند. محیط بلوغ آزمایشگاهی TCM199+ ۱۰ درصد FBS، ۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر FSH، ۰/۰۱ واحد بین المللی در میلی لیتر LH ، ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی‌لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی‌لیتر استرپتومایسین بود. گروههای آزمایشی نیز به این صورت بود: گروه۱: تنش اکسیداتیو (H_2O_2، ۳۰۰ میکرومولار) ، گروه۲: تنش اکسیداتیو + ۱ میکرومولار ملاتونین، گروه۳: تنش اکسیداتیو +۱۰ میکرومولار ملاتونین، گروه۴: کنترل.

برای ارزیابی مرحله بلوغ هسته‌ای، بعد از بلوغ، اووسیت‌ها با اسید استیک و اتانول به نسبت ۱ به ۳ بر روی اسلاید فیکس و با اورسئین ۱ درصد رنگ آمیزی شد و سپس برای ارزیابی کروموزم‌های متافاز میوز-۲، از میکروسکوپ اینورت با بزرگ نمایی X ۴۰۰ استفاده شد. داده‌های بدست آمده پس از ارزیابی بلوغ هسته‌ای، با آزمون کای اسکوار و با استفاده از رویه GENMOD در برنامه SAS ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

اثر تنش اکسیداتیو و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های نابالغ گوسفند، پس از ۲۷ ساعت کشت در جدول و شکل ۱ نشان داده شده است.

در این مطالعه ۴۴۷ تخمک نابالغ و سالم از تخمدان‌های کشتارگاهی گوسفندان جمع آوری گردید و در سه گروه آزمایشی و گروه شاهد ارزیابی شدند. در گروه شاهد از ۱۳۹ تخمک نابالغ که به مدت ۲۷ ساعت در انکوباتور کشت شد ۹۸/۵۷ درصد از تخمک های نابالغ از سرگیری تقسیم میوز مشاهده شد. در حالیکه در ۱/۴۳ درصد تخمک‌ها، پس از کشت هیچگونه علائمی از آغاز میوز رویت نشد که از نظر آماری نسبت به گروههای آزمایشی یک، دو و سه دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P<0/05$). از بین این میزان ۶/۴۷ درصد هسته شکسته شده بود (GVBD) و ۷/۱۹ درصد در مرحله بین بلوغ و هسته شکسته‌ها قرار داشت و ۸۴/۹ درصد تخمک‌ها تا مرحله متافاز ۲ پیشرفته و به مرحله بلوغ رسیده بودند.



شکل ۱: GV مرحله ایست که پس از طی مدت زمان کشت هیچگونه تغییری درهسته آن دیده نمی شود. مرحله GVBD که در این حالت غشای اطراف هسته شکسته شده است ولی به مرحله بلوغ نهایی نرسیده است. Intermediate مرحله ای است مابین هسته شکسته و بلوغ کامل و مرحله متافاز دو زمانی است که بلوغ اووسیت رخ داده و جسم قطبی در آن قابل مشاهده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: اثر تنش اکسیداتیو و غلظت های مختلف ملاتونین بر بلوغ هسته ای اووسیت های نابالغ گوسفند، پس از ۲۷ ساعت کشت

گروه‌ها	اووسیت نابالغ	H_2O_2 (میکرو مولار)	ملاتونین (میکرو مولار)	GV	GVBD	Intermediate	M-II
شاهد	۱۳۹	۰	۰	۲(۱/۴۳±۰/۷۱)^{a}	۹(۶/۴۷±۰/۳۴)^{a}	۱۰(۷/۱۹±۰/۳۳)^{a}	۱۱۸(۸۴/۹±۰/۲۴)^{a}
تیمار۱	۱۰۲	۳۰۰	۰	۵۵(۵۳/۹۴±۰/۲)^{c}	۲۰(۱۹/۶±۰/۲۵)^{b}	۱۲(۱۱/۷۶±۰/۲۱)^{a}	۱۵(۱۴/۷±۰/۲۸)^{c}
تیمار۲	۹۷	۳۰۰	۱	۶(۶/۲±۰/۴۲)^{ab}	۹(۹/۲۷±۰/۳۵)^{a}	۴۰(۴۱/۲۴±۰/۲۱)^{b}	۴۲(۴۳/۲۹±۰/۲)^{b}
تیمار۳	۱۰۹	۳۰۰	۱۰	۷(۶/۴۲ ±۰/۳۹)^{b}	۱۱(۱۰/۰۹±۰/۳۲)^{ab}	۳۲(۲۹/۳۶±۰/۲۱)^{b}	۵۹(۵۴/۱۲±۰/۱۹)^{b}

c،b،a: اختلاف معنی‌داری بین تیمارها را در هر ستون در سطح ۵ درصد (α=۰/۰۵) نشان می‌دهد. GV: اووسیت‌هایی که در مرحله کیسه‌ی زاینده هستند. GVBD: اووسیت‌هایی که در مرحله‌ی ناپدید شدن کیسه‌ی زاینده هستند. Intermediate: اووسیت هایی که در مرحله‌ی بین GVBD و M-II مانده‌اند و M-II: اووسیت‌هایی که در مرحله‌ی متافاز-۲ قرار دارند. نتایج به صورت Means±S.E در داخل پرانتز گزارش شده است.

میزان بلوغ در گروه شاهد نسبت به تیمارهای یک، دو و سه از نظر آماری دارای اختلاف معنی داری می‌باشد (P<۰/۰۵).

در گروه آزمایشی اول ۱۰۲ تخمک نارس سالم کشت شد که پس از گذشت ۲۷ ساعت در ۵۳/۹۴ درصد از تخمک ها هیچ تغییری مشاهده نشد و از سرگیری میوز در ۴۶/۰۶ درصد از تخمک‌های نابالغ رویت گردید که ۱۹/۶ درصد آنها هسته شکسته بود و ۱۱/۷۶ درصد در مرحله بین هسته شکسته و بالغ (مرحله میانی) متوقف شده بودند همچنین ۱۴/۷ درصد به مرحله متافاز ۲ رسیده و بالغ شده بودند که از نظر آماری با تیمارهای دو، سه و گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود (P<۰/۰۵) .

در گروه آزمایشی دوم از ۹۷ تخمک نارس سالم کشت شده، پس از گذشت ۲۷ ساعت ۶/۲ درصد در مرحله نابالغ متوقف شده بودند و از سرگیری میوز در ۹۳/۰۸ درصد از تخمک‌های نابالغ رویت گردید که ۹/۲۷ درصد آنها هسته شکسته بود و ۴۱/۲۴ درصد در مرحله بین هسته شکسته و بالغ متوقف شده بودند. همچنین ۴۳/۲۹ درصد به مرحله متافاز ۲ رسیده و بالغ شده بودند که از نظر آماری با تیمارهای یک و گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود (P<۰/۰۵) و با تیمار سه دارای اختلاف معنی‌داری نداشت.

در گروه آزمایشی سوم ۱۰۹ تخمک نارس سالم کشت شد. پس از گذشت ۲۷ ساعت ۶/۴۲ درصد در مرحله نابالغ متوقف شده بودند و از سرگیری میوز در ۹۳/۵۸ درصد از تخمک‌های نابالغ رویت گردید که ۱۰/۰۹ درصد آنها هسته شکسته بود و ۲۹/۳۶ درصد در مرحله میانی متوقف شده بودند همچنین ۵۴/۱۲ درصد به مرحله متافاز ۲ رسیده و بالغ شده که از نظر آماری با تیمارهای یک و گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود (P<۰/۰۵) و با تیمار دو دارای اختلاف معنی‌داری نداشت.

تنش اکسیداتیو پس از ۲۷ ساعت کشت، بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های گوسفند را بطور معنی داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل کاهش داد (۱۴/۷در مقابل ۸۴/۹). غلظت ملاتونین در سطوح ۱ و ۱۰ میکرومولار توانست هنگام تنش اکسیداتیو بلوغ میوزی اووسیت‌های گوسفندی را بطور معنی‌داری بهبود بخشد (به ترتیب ۱۴/۷در مقابل ۴۳/۲۹ و ۵۴/۱۲) و میزان اووسیت‌هایی را که به مرحله متافاز-۲ می‌رسند را افزایش دهد (P<۰/۰۵). اما با افزایش غلظت ملاتونین از ۱ به ۱۰ میکرو مولار میزان بلوغ اووسیت تغییر نیافت. علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در تکنولوژی تولید مثلی، کاهش کیفیت اووسیت به عنوان یک مشکل در ناباروری حیوانات ماده باقی مانده است.

بحث

ROS بویژه H_2O_2، در طول فرایند تخمک‌ریزی در داخل فولیکول تولید می‌شود. استفاده از پراکسید هیدروژن به میزان ۱۰۰ میکرو مولار، موجب مرگ سلولی اووسیت‌های همستر و تخمک موش در محیط کشت in vitro شد (۱۴ و ۱۵). غلظت داخل فولیکولی ملاتونین در فولیکول‌های بالغ نسبت به فولیکول‌های کوچک آترزیی شده بیشتر است که در فولیکول‌های پیش از تخمک‌ریزی تقریبا ۳ برابر بیشتر از سطح سرمی آن است. ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدانت نقش اساسی در حمایت از اووسیت در مقابل ROS دارد. ملاتونین آسیب DNA و پروتئین میتوکندری‌ها را کاهش می‌دهد و فعالیت زنجیره انتقال الکترون را بهبود می‌بخشد. ملاتونین

www.SID.ir
Archive of SID

ممکن است بطور مستقیم از آسیب به میتوکندری در اووسیت جلوگیری کند که منجر به بهبود کیفیت اووسیت می‌شود (۱۶). نتایج این مطالعه اثرات مضر H_2O_2 را روی بلوغ اووسیت گوسفند تایید کرد و ملاتونین اثرات مضرH_2O_2 را خنثی می‌کند که با یافته‌های تامورا و همکارانش (۱۶) مطابقت داشت.

تخمک بالغ پستانداران در مرحله متافازII آزاد می‌شود و تا زمان ورود اسپرم به داخل تخمک تحرکات لازم برای رهایی از این توقف و آزادسازی جسم قطبی به عنوان ادامه میوز صورت می‌پذیرد. در این مطالعه مشخص شد که ملاتونین با غلظت۱ و ۱۰ میکرومولار بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز را در تخمک‌های نارس گوسفند افزایش می‌دهد؛ به این ترتیب که میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه های آزمایشی دو و سه نسبت به گروه یک که فاقد این ماده هستند، افزایش قابل توجهی را نشان داد.

ملاتونین نقش مهمی را در حفاظت سلول از آسیب اکسیداتیو دارد که بواسطه افزایش آنزیم‌های مانند گلوتاتیون ردوکتاز، گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز میزان رادیکال‌های آزاد یا ROS را کاهش می‌دهد.

احتمالا ملاتونین از عوامل کلیدی موثر در کاهش پراکسیدهای داخل سلولی است. در این مطالعه نیز مشخص شد که اضافه کردن ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدانت به محیط کشت بلوغ تخمک‌های نارس گوسفند، بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز افزایش یافت و با افزایش غلظت ملاتونین در محیط کشت اثرات منفی تنش اکسیداتیو کاهش یافت.

ملاتونین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت وآنزیم‌های سطوح سلولی تاثیر می‌گذارد از طرفی ممکن است ملاتونین با تاثیر مستقیم از وارد شدن آسیب به میتوکندری تخمک‌ها ممانعت نماید و سبب افزایش کیفیت تخمک گردد (۱۷) که از اثرات ضد آپوپتوزی ملاتونین بر انواع سلول‌های مختلف ناشی می‌شود (۱۸ و ۱۹).

برخی مطالعات نشان داده‌اند که ملاتونین نرخ زنده مانی جنین و میزان باروری آزمایشگاهی را افزایش دهد (۲۰). ملاتونین، فعالیت تخمدان و فولیکول سازی را توسعه می‌دهد (۲۱) متابولیت‌های ملاتونین، رادیکالهای آزاد را حذف می‌کنند و در افزایش تولید برخی از آنزیم آنتی اکسیدانتی نقش فراوانی ایفا می‌نماید (۲۲).

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار محیط کشت با ملاتونین میزان بلوغ را در مقایسه با گروه شاهد افزایش می‌دهد که با نتایج وازکوز و همکاران (۲۲) تاثیر مثبت ملاتونین بر بلوغ تخمک‌های گوسفند را گزارش نمودند مطابقت می‌نماید.

نتیجه گیری

بطور کلی این پژوهش نشان داد که تنش اکسیداتیو سبب اثرات سمی در بلوغ آزمایشگاهی اووسیت شده و جنبه ممانعت کنندگی در بلوغ اووسیت دارد. از طرفی ملاتونین بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های نابالغ گوسفند را هنگام تنش اکسیداتیو بهبود می‌بخشد. بهبود بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های گوسفند هنگام تنش اکسیداتیو در این پژوهش را شاید بتوان به اثرات مفید و چندگانه ملاتونین ارتباط داد.

منابع

1. Abedelahi M, Salehnia A, Allameh A, Davoodi D. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide Activity. Human Reproduction. 2010; 25(4): 977–985.

2. Hallwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch. Biochem. Biophys. 1990; 280,1-3.

3. Jung-Taek K, Ok-Jae K, Dae-Kee K, Hee-Jung P, et al. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells J. Pineal Res. 2009; 46: 22–28.

4. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. Fertil Steril 2004; 82: 593–600.

5. Peter CKL, Adashi Ey, The Ovary Second Edition Elsevier Inc. 2004; 113-130.

6. Morado SA, Cetica PD, Beconi MT, Dalvit GC. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. Reprod Fertil Dev. 2009; 21: 608–614.

7. Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? Reprod Biomed Online. 2009; 18: 864–880.

8. Pieri C, Marra M, Moroni R, Recchioni. M, et al. Melatonin: a peroxyl radical Scavenger Mor effective than vitamin E. Life Sci. 1994; 55: 271-276.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Luther JS, Redmer DA, Reynolds LP, Choi JT, et al. Ovarian follicular development and oocyte quality in anestrous ewes treated with melatonin, a Controlled Internal Drug Release (CIDR) device and follicle stimulating hormone. Theriogenology. 2005; 63(8): 2136-46.

10. Malgorzata K, Reiter RJ. Effect of melatonin in protection ageist cellular damage coused by Ionizing radiation. P.S.E.B.M. 2000; 225: 9-22.

11. Reiter RJ. Melatonin and human reproduction. Ann Med. 1998; 30:103–108.

12. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2003; 17: 273–285.

13. Russel J, Reiter SD, Paredest A, Ahmet K, et al. Melatonin combats molecular terrorism at the mitochondrial level Interdisc Toxicol. 2008; 1(2): 137–149.

14. Bladier C, Wolvetang EJ, Huchinson P, de Hann JB, et al. Response of a primary human fibroblast cell line to H2O2: Senescence-like growth arrest or apoptosis? Cell Growth Differ. 1997; 8: 589-598.

15. Chan PJ, Calinisan JH, Corselli JU, Patton WC, et al. Updating quality control assays in the assisted reproductive technologies laboratory with a cryopreserved hamster oocyte DNA cytogenotoxicity assay. J. Assi Rep and Gen. 2001; 18: 129-134.

16. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. J. Pineal Res . 2007; 44: 280–287.

17. Hiroshi T, Akihisa T, Ichiro M. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. J Pineal Res. 2008; 44(3): 280-343.

18. Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, et al. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. Theriogenology. 2005; 64: 1677–1689.

19. Juknat AA, Mendez Mdel V, Quaglino A, Fameli CI. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. J Pineal Res. 2005; 38(2): 84-92.

20. Valasi F, Tsiligianni T, Papanikolaou T, Dimitriadis I, et al. Melatonin improves the developmental competence of sheep oocytes. Reprod Domest Anim. 2006; 41:341.

21. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, et al. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? J Pineal Res. 2007; 42(1): 28-42.

22. Vazquez MI, Abecia JA, Forcada F, Casao A. Effects of exogenous melatonin on in vivo embryo viability and oocyte .0competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus. Theriogenology. 2010; 74(4): 618-26.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Winter 2012; 2(4): 387-393

Effect of H_2O_2 and Melatonin on *In vitro* Oocyte Maturation

Biabani K[1], Zare Shahneh A[1], Kohram H[1], Khodaei Motlagh M [2*]

1. Department of Animal Sciene, Faculty of Agriculture University of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak 38156-8-8349. Iran
* Email corresponding author: m-motlagh@araku.ac.ir

Received: 18 Dec. 2011 Accepted: 24 Feb. 2012

Abstract

Aim: The aim of this study was to determine the effect of stress oxidative (H_2O_2) and different concentrations of melatonin on nuclear maturation of immature oocytes in sheep.

Material and Methods: Ovary collection and oocyte recovery was carried out by standard method. Oocytes culture was in the following conditions: A: TCM199+10% FBS, 5µg/ml FSH, 0.01IU/ml LH, 100 IU/ml penicillin and 100 IU/ml streptomycin, B: A + H_2O_2 (300 µM) at 38/5 C°, C: B + 1 µM melatonin and D: B + 10µM melatonin.

Results: This study showed that H_2O_2 significantly ($P<0.05$) decreases nuclear maturation in compare to control (14.7 vs. 84. 9). 0, 1 and 10 µM melatonin could improve oocytes to reach to metaphase-II stage (respectively 14.7 vs. 43.29, 54.12). But increasing melatonin dose from 1 to 10 µM, did not have any significant effect on oocytes maturation.

Conclusion: The results of this study showed that melatonin improves sheep oocytes maturation during oxidative stress.

Keywords: Stress oxidative, Melatonin, Sheep oocyte

Archive of SID

www.SID.ir