Archive of SID

حضور پنی‌سیلین - استرپتومایسین در طی بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای گاو، بلوغ هسته و رشد بعدی جنین را متأثر می‌سازد.

ابوالفضل شیرازی Ph.D.☆♦

☆شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی

♦شهرکرد، صندوق پستی ۱۱۵، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی

چکیده

* **هدف:** بررسی تاثیر حضور پنی سیلین - استرپتومایسین در طی بلوغ آزمایشگاهی (IVM: In Vitro Maturation) مجموعه سلولهای کومولوس - تخمک گاو (COCs: Camulus Oocyte Compteres) بر روی بلوغ هسته و سیتوپلاسم تخمک و رشد بعدی جنین

* **مواد و روشها:** مجموعه سلولهای کومولوس - تخمک به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور حاوی ۵ درصد گاز کربنیک در اتمسفر مرطوب و دمای ۳۹° سانتیگراد در محیطهای زیر کشت داده می‌شدند: ۱) TCM حاوی ۱۰ درصد FCS (Fetal calf serum)، ۰/۰۵ IU/ml rhFSH (human recombinant FSH) و ۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین - ۱۰۰ µg استرپتومایسین، ۲) TCM عاری از FCS و rhFSH در حضور پنی سیلین استرپتومایسین با دوز مذکور.

* **یافته‌ها:** حضور پنی‌سیلین - استرپتومایسین در طی بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای گاو در محیط کشت حاوی FCS و rhFSH به طور معنی داری ($P< 0.05$) درصد تخمکهای مرحله MII (متافاز II) را افزایش داده لیکن پس از خارج سازی FCS و rhFSH از محیط، تاثیر فوق الذکر قابل مشاهده نبود. متعاقب تقسیم بندی COCs به دو گروه روشن و تیره، تاثیر مثبت آنتی بیوتیک بر بلوغ هسته در هر دو گروه کمتر گردید به طوری که درصد تخمکهای مرحله MII در CCs روشن در محیط حاوی آنتی بیوتیک و فاقد آن به ترتیب ۷۶ و ۷۲ درصد و در مورد COCs تیره به ترتیب ۸۳ و ۸۰ درصد محاسبه گردید.

درصد تخمکهای با تیپ III پراکندگی گرانولهای کورتیکال (CGs: Cortical Granules) و نیز میزان پراکندگی سلولهای کومولوس در طی بلوغ آزمایشگاهی COCs، تحت تاثیر حضور آنتی بیوتیک قرار نگرفته، لیکن حضور آنتی بیوتیک در طی IVM رشد و تقسیمات اولیه جنینی را پس از انجام IVF (In Vitro Fertilization) به طور معنی داری ($P< 0.05$) متاثر نموده و سبب کاهش درصد بلاستوسیستهای حاصله در روز ۹ پس از لقاح شده بود.

* **نتیجه‌گیری:** حضور pen-strep در طی بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای گاو تأثیری مثبت بر روند بلوغ هسته تخمک داشته و این تأثیر در شرایط حضور، FCS و rhFSH در محیط کشت القاء می‌گردید. ازطرفی علیرغم عدم تأثیر حضور pen-strep بر نحوه پراکندگی CGs، لیکن تقسیمات جنینی به طور منفی متاثر می‌گردید.

گل واژگان : بلوغ آزمایشگاهی، rhFSH، پنی‌سیلین - استرپتومایسین، بلوغ هسته، گرانولهای کورتیکال

نشریه پزشکی یاخته، سال سوم، زمستان ۸۰، شمارهٔ ۱۲، صفحات ۱۸۴-۱۷۷

تاریخ وصول: ۸۰/۶/۲۰، تاریخ پذیرش: ۸۰/۱۰/۱۷

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

حضور مقادیر استاندارد آنتی‌بیوتیکها در محیطهای کشت سلولی ظاهراً هیچ تأثیر توکسیک و مخربی بر روی سلولها نداشته لیکن از آنجایی که آنتی‌بیوتیکها، مواد با فعالیت بیولوژیکی فعالی می‌باشند، این احتمال که آنها به طریقی در فرایندهای سلولی دخالت نمایند، می‌بایستی مدنظر قرار گیرد (۱). ترکیب توام pen-strep، به ترتیب متعلق به دو خانواده بزرگ از آنتی‌بیوتیکهای بتا- لاکتام و آمینوگلیکوزیدها، به‌دلیل طیف وسیع ضد میکربی (۲) و حداقل بودن تأثیرات نامطلوب بر روی حیات سلولهای یوکاریوتیک، سبب استفاده گسترده آنها در محیطهای کشت سلولی شده هر چند که امکان تأثیر آنها بر روی برخی از فعالیتهای سلولی را نیز نمی‌بایستی کاملاً نادیده گرفت (۳، ۴). مطالعات متعدد به عمل آمده در خصوص ارزیابی خطرات حضور آنتی بیوتیکهای خانواده آمینوگلیکوزیدی و بتا- لاکتام بر روی سلولهای یوکاریوتیک (۵، ۶، ۷، ۸، ۹)، مشخص نموده است که بر حسب مدت زمان مجاورت و نیز غلظت آنتی‌بیوتیک، این قبیل آنتی‌بیوتیکها قادر خواهند بود تا فعالیتهای سلولی را به درجاتی تحت تأثیر قرار دهند (۱۰، ۱۱، ۱۲). همچنین مشخص شده است که آنتی‌بیوتیکها میزان رشد جنینهای پستانداران را از طریق تداخل با تقسیمات سلولی یا توقف رشد آنها، به طور منفی متأثر می‌سازند (۱۳). بنابراین در این مطالعه سعی شده که تأثیرات احتمالی حضور مقادیر متداول pen-strep در محیط کشت COCs گاو در طی IVM بر روی بلوغ هسته و سیتوپلاسم تخمک و نیز رشد بعدی جنین مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روشها

* جمع‌آوری و کشت COCs

تخمدانها پس از جمع‌آوری، در داخل ترموس فلاسک قرار داده شده و ظرف مدت ۱ ساعت از کشتارگاه به آزمایشگاه ارسال گردیدند. مجموعه سلولهای کومولوس - تخمک از طریق آسپیراسیون فولیکولهای ۸-۲ میلی‌متری و براساس حضور لایه‌های فشرده سلولهای کومولوس در اطراف تخمک (بیش از ۳ لایه) انتخاب می‌شدند. COCs انتخاب شده یکبار در محیط بافر شده (Gibco BRL, Paisly, UK) TCM-199+hepes و بار دیگر در محیط (Gibco cat nr 31100-027) Earle's salt + glutamine) IVM (TCM-199 شستشو داده شده و سپس بطور تصادفی در گروههای ۳۵ تایی در هر یک از چهار حفره پلیتهای کشت چهار حفره‌ای (Nunc A/S, Rosklide, Denmark) حاوی ۵۰۰ µl از محیط کشت منتقل و در داخل انکوباتور حاوی ۵ درصد CO2 در اتمسفر مرطوب و در دمای ۳۹° سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده می‌شدند.

* لقاح خارج رحمی و کشت جنین

انجام IVF و IVC(In vitro culture) نیز در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO2 در اتمسفر مرطوب و دمای ۳۹° سانتیگراد صورت گرفت. بدین منظور نمونه‌های منجمد اسپرم گاو پس از ذوب شدن به لوله آزمایش حاوی پرکل (Percoll) ۴۰ و ۹۰ درصد اضافه شده و این مجموعه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ می‌گردید (در دمای ۲۷° سانتیگراد، ۷۰۰×g). پس از انجام سانتریفوژ سطح رویی نمونه مورد نظر دور ریخته شد به طوری که حدود ۱۵۰ µl از نمونه مورد نظر در ته لوله آزمایش، محتوی سلولهای اسپرم، باقی می‌ماند. تعداد ۳۵ COCs به داخل ۴۳۰ µl مدیای لقاح (Fert-Talp)، توصیف شده توسط Parrish و همکارانش (۱۴)، که فاقد گلوکز و حاوی ۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین - ۱۰۰ µg استرپتومایسین بود، (به جای جنتامایسین) منتقل و به این مجموعه ۲۰ µl سوسپانسیون اسپرم (با غلظت نهایی ۱۰۶×۵/۰/ml اسپرم)، ۲۰ µl هپارین (با غلظت نهایی ۱۰ µg/ml) و ۲۰ µl (حاوی PHE(Penicillamine, Hypotaurine, Epinephrine ۲۰ mM پنی‌سیلامین - D، ۱۰ mM هایپوتورین و ۱ mM اپی‌نفرین) اضافه گردید. پس از ۲۲-۱۸ ساعت کشت، COCs به مدت ۳ دقیقه ورتکس می‌گردید و سلولهای کومولوس از اطراف تخمک برداشته شد و تخمکهای برهنه شده به داخل محیط کشت جنین منتقل می‌شدند. بدین منظور زایگوتهای برهنه شده در گروههای ۳۵ تایی به داخل حفرات پلیتهای چهار حفره‌ای حاوی ۰/۵ ml مدیای TCM-199 حاوی ۱۰ درصد FCS بر روی کشت یک لایه‌ای از سلولهای (Rat Buffalo) Liver BRL منتقل می‌گردیدند (سیستم Co-culture).

* کشت سلولهای BRL

سلولهای کبدی Buffalo rat، جدا شده از خط سلولی BRL، بدست آمده از ATCC (American Type culture collection) (۱۵) در محیطی به نسبت ۱ به ۱ از دو مدیای Ham's F12 و Dulbecco's Modified Eagle (Gibco) حاوی ۷/۵ درصد FCS (Gibco) و آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. این سلولها از سلولهای که اخیراً از ATCC به دست آمده و دارای خاصیت ممانعت از رشد در صورت تماس با یکدیگر هستند، متمایز می‌باشند.

* ارزیابی بلوغ هسته و پراکندگی سلولهای کومولوس

پس از کشت COCs، وضعیت هسته تخمک توسط رنگ آمیزی DAPI (4,6-diamidino-2-Phenyl-indol) توصیف شده توسط Mori و همکارانش (۱۹۸۸) (۱۶)، مشخص می‌گردید. بطور اجمال، ابتداً COCs به مدت ۶-۳ دقیقه ورتکس شده و سپس تخمکهای برهنه شده با گلوتارآلدهاید ۲/۵ درصد (W/V) به‌مدت ۱۵ دقیقه فیکس و پس از شستشو در BPS، با رنگ(W/V) ۲/۵ درصد DAPI (محلول رنگی مرکب از ۱۰ µl از رنگ مذکور در ۵۰۰ µl PBS بمدت ۳-۲ دقیقه) رنگ آمیزی و بر روی اسلایدهای میکروسکپیک مستقر می‌شدند. وضعیت هسته تخمکهای رنگ آمیزی شده در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. تخمکهای دارای کروماتین پراکنده یا کمی متراکم در مرحله وزیکول ژرمینال (GV: Germinal vesicle)، تخمکهای دارای کروماتین متراکم به طوری که تشکیل شبکه نامنظم از جفت کروموزومهای انفرادی

www.SID.ir

Archive of SID

(پرومتافاز) یا صفحه متافاز را بدهند (بدون حضور جسم قطبی) در مرحله متافاز I (MI:Metaphase I) و تخمکهای دارای جسم قطبی یا دو لکه کروماتینی درخشان در مرحله متافاز II (MII:Metaphase II) از روند بلوغ هسته قرار می‌گرفتند. پراکندگی سلولهای کومولوس از طریق اندازه‌گیری قطر (میانگین دو قطر عمود بر هم) COCs با استفاده از میکروسکوپ مجهز به صفحه مدرج در شروع و انتهای بلوغ آزمایشگاهی COCs انجام می‌پذیرفت.

* ارزیابی پراکندگی گرانولهای کورتیکال

پس از انجام IVM، سلولهای کومولوس توسط عمل ورتکسینگ (Vortexing) از اطراف تخمک کنار زده می‌شدند. نحوه پراکندگی گرانولهای کورتیکال با استفاده از روش ایمنوفلورسانس توصیف شده توسط Yoshida و همکارانش (۱۷) مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. در این روش ابتدا تخمکهای برهنه شده در حضور ۰/۱ درصد Triton-X-100 در PBS (V/V) به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۳۹° سانتیگراد نفوذپذیر و سپس در پارافورمالدئید ۲ درصد (V/V) در PBS به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط فیکس می‌گردیدند. متعاقباً پس از ۳ بار شستشو در PBS، به مدت یک ساعت در دمای ۳۹° سانتیگراد در محلول بلوک کننده متشکل از M ۰/۱ glycine، ۰/۱ درصد (W/V) Triton-X-100، ۱ درصد پودر شیر (W/V)، ۰/۵ درصد BSA (W/V) و ۰/۰۲ درصد سدیم ازاید (W/V) (azide Sodium) (۱۸) نگهداری شده و سپس تخمک‌ها در مجاورت ۱۰۰ mg/ml FITC (Fluorescein isothiocyanate) متصل به لکتین PNA (EY Laboratories, Inc., SanMateo, California) (Penanut agglutinin) (FITC-PNA) در PBS در دمای ۳۹° سانتیگراد و به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری می‌شدند. درصورت تمایل می‌توان پس از ۳ بار شستشوی تخمکها در PBS، نسبت به رنگ آمیزی مضاعف آنها با رنگ ۲/۵ درصد DAPI اقدام نمود. تخمکهای رنگ آمیزی شده پس از استقرار بر روی اسلایدهای میکروسپیک توسط میکروسکوپ اپی‌فلورسنت مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. نحوه پراکندگی گرانولهای کورتیکال در سطح سیتوپلاسم به ۳ صورت کلی قابل مشاهده بود.

I) تجمع گرانولهای کورتیکال بصورت دستجات بزرگ یا پراکندگی یکنواخت، II) تجمع گرانولهای کورتیکال در نواحی حاشیه‌ای سیتوپلاسم به‌صورت ذرات مجزا یا دستجات کوچک، III) تجمع کم و بیش یکنواخت گرانولهای کورتیکال در نواحی حاشیه‌ای سیتوپلاسم به صورت یک خط به محاذات غشاء سلولی (۱۷).

* ارزیابی رشد جنینی

جنینها ازنظر مورفولوژیک تقسیم‌بندی شده و کفایت سیستم کشت جنین به ترتیب زیر مورد ارزیابی قرار می‌گرفت:

۱) درصد جنینهای با تقسیمات سلولی چهار روز پس از لقاح

۲) درصد بلاستوسیستهای حاصله، نه روز پس از لقاح

(تعداد بلاستوسیست‌ها در روز نهم) / تعداد زیگوتهای کشت داده شده

۳) درصدبلاستوسیتهای خارج شده‌از زونا ۱۱ روز پس از لقاح

(تعداد بلاستوسیتهای خارج شده از زونا در روز ۱۱) / تعداد بلاستوسیست‌ها در روز نهم

* گروههای آزمایشی

گروههای آزمایش شامل ۶ گروه بوده و هرکدام حداقل ۳ بار تکرار شدند.

۱) ارزیابی وضعیت بلوغ هسته تخمک‌ها پس از ۲۴ ساعت کشت COCs در مدیای TCM-199 حاوی ۱۰ درصد FCS و ۰/۰۵ IU/ml rhFSH (Organon International, Oss, The Netherlands) در حضور ۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین (Gibco).

۲) ارزیابی وضعیت بلوغ هسته تخمکها پس از ۲۴ ساعت کشت COCs در مدیای TCM-199 عاری از FCS و rhFSH در حضور pen-strep.

۳) ارزیابی وضعیت بلوغ هسته تخمکها پس از ۲۴ ساعت کشت در دو گروه مختلف از COCs روشن و تیره در مدیای TCM-199 حاوی FCS و rhFSH در حضور pen-strep.

- پس از آسپیراسیون COCs، برخی از آنها از ظاهری تیره‌تر و برخی دیگر از ظاهری روشنتر برخوردار می‌باشند. غالب COCs تیره از فولیکولهای آترتیک و COCs روشن از فولیکولهای غیرآترتیک بدست می‌آیند. علت تیره‌تر بودن COCs بدست آمده از فولیکولهای آترتیک بیشتر بودن درصد سلولهای کومولوس نکروتیک در بین توده سلولهای مذکور می‌باشد.

۴) ارزیابی نحوه پراکندگی گرانولهای کورتیکال در سیتوپلاسم تخمکها پس از ۲۴ ساعت کشت COCs در مدیای TCM-199 حاوی FCS و rhFSH در حضور pen-strep.

۵) ارزیابی میزان پراکندگی سلولهای کومولوس COCs پس از ۲۴ ساعت کشت در مدیای TCM-199 حاوی FCS و rhFSH در حضور pen-strep.

۶) ارزیابی میزان رشد و تقسیمات اولیه جنینی در سیستم Co-culture (مرکب از مدیای کشت + سلولهای BRL) در شرایطی که تخمکها در طی IVM در مدیای TCM-199 حاوی FCS و rhFSH و در معرض pen-strep قرار گرفته بودند.

در تمامی ۶ گروه آزمایش مذکور محیطهای کشت عاری از آنتی‌بیوتیک در طی IVM به عنوان گروههای کنترل (شاهد) در نظر گرفته می‌شدند.

* آنالیز آماری

نتایج از طریق آزمون مربع کای مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و اختلافات با $P < 0.05$ معنی‌دار محسوب می‌گردیدند.

یافته‌ها

حضور pen-strep با مقادیر متداول در مدیای TCM-199 حاوی FCS و rhFSH در طی بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای گاو تأثیری مثبت

www.SID.ir

Archive of SID

بر روند بلوغ هسته داشته به طوری که سبب افزایش معنی‌دار ($P< 0.05$) درصد تخمکهای مرحله MII در قیاس با گروه کنترل گردید (جدول ۱).

جدول ۱: تأثیر حضور pen-strep در مدیای TCM-199 حاوی FCS و rhFSH در طی IVM (کشت ۲۴ ساعته) تخمکهای گاو بر روی بلوغ هسته

گروههای آزمایشی	تعداد کلی تخمک	مراحل بلوغ هسته(٪)		
		GV	MI	MII
تحت درمان(pen-strep)	۳۲۸	۸(۲)	۵۲(۱۲)	۲۷۸(۸۶)[a]
کنترل	۳۷۱	۷(۱)	۸۱(۱۷)	۲۸۳(۸۱)[b]

a, b; ($P<0.05$)

معهذا در صورت حذف FCS و rhFSH از مدیای کشت، تأثیر معنی‌دار حضور pen-strep بر روند بلوغ هسته از میان می‌رفت (جدول ۲).

جدول ۲: تأثیر حضور pen-strep در محیط TCM-199 عاری از FCS و rhFSH در طی IVM (کشت ۲۴ ساعته) تخمکهای گاو بر روی بلوغ هسته

گروههای آزمایشی	تعداد کلی تخمک	مراحل بلوغ هسته(٪)		
		GV	MI	MII
تحت درمان(pen-strep)	۵۵۱	۲۹(۵)	۱۵۲(۲۸)	۲۷۰(۶۷)
کنترل	۵۱۲	۲۹(۷)	۱۴۲(۲۸)	۲۲۲(۶۵)

تأثیر حضور pen-strep در طی بلوغ آزمایشگاهی دو گروه مختلف از COCs روشن و تیره بر روی بلوغ هسته تخمکها در جدول ۳ قابل ملاحظه می‌باشد. علیرغم وجود اختلاف معنی‌دار ($P< 0.05$) بین درصد کلی تخمکهای مرحله MII پس از کشت COCs تیره در قیاس با COCs روشن (به‌ترتیب ۸۱/۵ در مقابل با ۷۴ درصد)، لیکن اختلاف معنی‌داری بین درصد تخمکهای مرحله MII پس از کشت COCs در حضور یا عدم حضور pen-strep چه در گروه COCs روشن (به ترتیب ۷۶ در مقابل ۷۲ درصد) و چه در گروه COCs تیره (۸۳ در مقابل ۸۰ درصد) مشاهده نگردید (جدول ۳).

جدول ۳: تأثیر حضور pen-strep در محیط TCM-199 حاوی FCS و rhFSH در طی IVM (کشت ۲۴ ساعته) تخمکهای گاو بدست آمده از دو گروه مختلف از COCs تیره و روشن

COCs	گروه آزمایشی	تعداد کلی تخمکها	نحوه پراکندگی گرانولهای کورتیکال		
			GV	MII	MI
روشن	تحت درمان (pen-strep)	۶۲۸	۳	۱۵۲(۲۴)	۴۸۲(۷۶)
	کنترل	۵۵۸	۲	۱۵۳(۲۷)	۴۰۲(۷۲)
تیره	تحت درمان (pen-strep)	۳۳۹	۰	۶۹(۱۷)	۲۲۰(۸۲)
	کنترل	۳۴۵	۰	۷۰(۲۰)	۲۷۵(۸۰)

الگوی پراکندگی گرانولهای کورتیکال در سطح سیتوپلاسم تخمکها پس از ۲۴ ساعت کشت COCs در محیط کشت حاوی pen-strep بیانگر عدم تأثیر حضور آنتی‌بیوتیک بر روند مذکور است (جدول ۴).

جدول ۴: تاثیر حضور pen-strep در محیط TCM-199 حاوی FCS و rhFSH در طی IVM (کشت ۲۴ ساعته) تخمکهای گاو بر روی نحوه پراکندگی گرانولهای کورتیکال

گروههای آزمایشی	تعداد کلی تخمک	نحوه پراکندگی گرانولهای کورتیکال(٪)		
		تیپ I	تیپ II	تیپ III
تحت درمان(pen-strep)	۲۹۲	۱۸(۶)	۱۸۲(۶۲)	۹۲(۳۱)
کنترل	۲۹۲	۶(۲)	۱۹۹(۶۸)	۸۷(۳۰)

درخصوص تأثیر حضور آنتی‌بیوتیک (به مدت ۲۴ ساعت) در طی IVM، بر روی رشد بعدی جنین، علیرغم عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار در درصد جنینهای تقسیم شده در روز ۴ پس از لقاح در دو گروه تحت درمان و کنترل، لیکن درصد بلاستوسیستهای حاصله نه روز پس از لقاح در گروه تحت درمان (حضور pen-strep) به تعویق افتاده بود ($P< 0.05$). معهذا یازده روز پس از لقاح درصد بلاستوسیستهای هچ شده (خارج شده از لایه زونا‌پلوسیدا) اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه کنترل و تحت درمان نشان نمی‌داد (جدول ۵).

جدول ۵: تأثیر حضور pen-strep در محیط TCM-199 حاوی FCS و rhFSH در طی IVM (کشت ۲۴ ساعته) تخمکهای گاو بر روی رشد بعدی جنین

گروههای آزمایشی	تعداد تخمکها	تعداد جنینهای تقسیم شده(٪)	تعداد بلاستوسیستها(٪)		
		روز ۴ پس از IVF		تعداد کلی	هچ شده
تحت درمان(pen-strep)	۵۳۱	۳۵۷(۶۶)	۱۰۷(۲۰)	۱۲۹(۲۴)	۸۲(۶۳)
کنترل	۵۲۷	۳۶۰(۶۷)	۱۲۵(۲۵)	۱۳۲(۲۷)	۹۱(۶۴)

جدول ۶: تاثیر حضور pen-strep در محیط TCM-199 حاوی FCS و rhFSH در طی IVM (کشت ۲۴ ساعته) تخمکهای گاو بر روی میزان پراکندگی سلولهای کومولوس

گروههای آزمایشی Mean±SD	تعدادCOCs	قطر COCs(µm)	
تحت درمان (pen-strep)	۱۵۰	۶/۹۸	۲۲/۷۵
کنترل	۱۳۰	۷/۷۱	۲۲/۹۰

هیچ اختلاف معنی‌داری در میزان پراکندگی سلولهای کومولوس در COCsکشت داده شده در مدیای کشت حاوی آنتی‌بیوتیک در قیاس با گروه کنترل مشاهده نگردید (جدول ٦).

بحث

آنتی‌بیوتیکها از اجزاء مشترک غالب محیطهای کشت سلولی هستند. غلظتهای مجاز آنهاکه به طور معمول در سیستمهای کشت سلولی به‌کار برده می‌شوند، بر اساس یافته‌های حاصل از مطالعات اولیه‌ای است که در آنها مقادیر توکسیک آنتی‌بیوتیکها در محیطهای کشت سلولی مشخص شده است (۴، ۱۹). براساس نتایج حاصل از همین مطالعات، پنی‌سیلین - استرپتومایسین به عنوان مفیدترین ترکیب بی‌خطر مطرح گردیده و مقادیر توصیه شده ترکیب این دو آنتی‌بیوتیک در محیطهای کشت سلولی به‌ترتیب ۱۰۰ IU/ml و ۱۰۰ µg/ml برای پنی‌سیلین و

www.SID.ir

Archive of SID

استرپتومایسین در نظر گرفته شده است. همین مقادیر بدون اینکه تاثیرات احتمالی آنها، هر چند ناچیز، بر روی متابولیسم سلولی (۲۰)، مورفولوژی جنین و سرعت رشد آن مورد توجه قرار گرفته باشد، عیناً در محیطهای کشت تخمکها و جنینهای گاو نیز به کار برده شده‌اند.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه حضور آنتی‌بیوتیک (pen-strep) در طی IVM تخمکهای گاو در مدیای TCM-199 حاوی FCS و rhFSH تأثیری مثبت بر روند بلوغ هسته تخمک داشته لیکن این تأثیر زمانی از نظر آماری معنی‌دار می‌گردد که مدت زمان کشت تخمکها ۲۴ ساعت به طول بیانجامد، چراکه در تخمکهای که کشت آنها به مدت ۱۶ ساعت به طول انجامید چنین تأثیر مثبتی ناشی از حضور آنتی‌بیوتیک در مدیای کشت مشاهده نگردید (۲۱). ازطرفی با حذف FCS و rhFSH از مدیای کشت نیز تأثیر مثبت و معنی دار pen-strep بر روند مذکور حذف می‌گردید. بنابراین به نظر می‌رسد که حضور مقادیر متداول pen-strep در محیط کشت COCs تأثیرات مثبت FCS و rhFSH بر روند از سرگیری تقسیمات میوزی، را تقویت می‌نماید.

مطالعات متعدد به عمل آمده امکان وقوع واکنش متقابل بین ترکیبات آمینوگلیکوزیدی با غشاء و یا آنزیمهای مرتبط با غشاء سلولی، را مطرح می‌نمایند (۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶). همچنین مشخص گردیده است که آنتی‌بیوتیکهای این خانواده می‌توانند با مکانیسمهای انتقال علائم سلولی تداخل نموده و بر روی گیرنده‌های سلولی که در مسیر انتقال علائم از پروتئین - G استفاده می‌نمایند، تأثیر بگذارند (۲۷، ۲۸). ازطرفی این احتمال که فاکتورهای رشد موجود در سرم (FCS) و یا rhFSH در مسیر فعال سازی cAMP از پروتئین - G استفاده نمایند (۲۹)، می تواند دلیلی برای تقویت تأثیرات مثبت FCS و rhFSH بر روند بلوغ هسته تخمکها، توسط pen-strep موجود در مدیای کشت بوده باشد. از طرفی مشخص شده است که پنی‌سیلین و استرپتومایسین بر روی کانالهای یونی (۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴) و برخی از گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی نیز (۳۵) تأثیر می‌گذارند.

علیرغم تأثیر مثبت حضور pen-strep بر روند بلوغ هسته تخمکها در محیط کشت دو گروه مختلف از COCs تیره و روشن، لیکن اختلاف معنی‌داری بین دو گروه تحت درمان و کنترل مشاهده نگردید. با این حال درصد تخمکهای مرحله MII پس از IVM دو گروه مختلف از COCs، تیره و روشن، (به ترتیب ۸۱/۵ درصد در مقابل ۷۴ درصد) معرف وجود اختلاف معنی‌دار ($P< 0.05$) بین دو گروه مذکور بوده که این خود مؤید نتایج به دست آمده توسط سایر محققین می‌باشد (۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹). به عبارت دیگر تقسیم میوزی در تخمکهای بدست آمده از COCs تیره سریعتر آغاز و از نظر مراحل و سرعت تغییرات بلوغ نیز همواره جلوتر از تخمکهای حاصل از COCs روشن می‌باشند (۳۹).

علیرغم تأثیر مثبت حضور pen-strep در طی IVM بر روند بلوغ هسته تخمکها، لیکن حضور آنتی‌بیوتیکهای مذکور تأثیر مثبتی بر روند بلوغ سیتوپلاسم نداشته چراکه الگوی پراکندگی گرانولهای کورتیکال در سطح سیتوپلاسم بویژه تیپ III اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه تحت درمان و کنترل نشان نمی‌داد (نحوه پراکندگی CGs در سطح سیتوپلاسم به عنوان یکی از شاخصهای قابل اعتماد جهت ارزیابی کفایت بلوغ سیتوپلاسم تخمکهای گاو در نظر گرفته می‌شود) (۱۷).

در خصوص تأثیرات احتمالی حضور pen-strep در طی IVM بر روی رشد و تقسیمات بعدی جنین، علیرغم عدم تأثیر حضور آنتی‌بیوتیک بر روی درصد جنینهای تقسیم شده در روز ۴ پس از لقاح، لیکن درصد بلاستوسیستهای حاصله در روز ۹ پس از لقاح کاهش معنی‌داری ($P< 0.05$) را نشان می‌داد. در مطالعات انجام شده تأثیر مهارکنندگی آنتی‌بیوتیکها بر روی تکثیر سلولهای یوکاریوتیک در مراحل مختلف متابولیسم سلولی مشخص گردیده و نیز تأثیرات مهار کنندگی یا تقویتی آنتی‌بیوتیکهای مهارکننده سنتز پروتئینها بر روی مکانیسمهای مسئول مرگ سلولی مشخص شده است (۴۰). از طرفی مشخص گردیده است که جنینهای با رشد سریعتر، از کفایت بیشتری در لانه گزینی برخوردار بوده (۴۱) و نیز ارتباطی قوی بین جنینهای با رشد تأخیری و بروز ناهنجاریهای کروموزومی مشاهده شده است (۴۲، ۴۳).

از میان مکانیزمهای مختلف مسمومیت زایی آنتی‌بیوتیکهای بتا-لاکتام، مسمومیت زایی برعلیه حاملین سوبستراهای آنیونیک میتوکندریها، که منجر به کاهش ثانویه در تنفس میتوکندریایی می‌گردد، متداولتر از سایر مکانیزمها می‌باشد (۱۲، ۴۴). ازطرفی فرض بر این است که آنتی‌بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی نیز به طریق الکترو استاتیک نسبت به فسفولیپیدهای غشاهای بیولوژیک واکنش نشان داده و بدین ترتیب ساختار و عملکرد فیزیولوژیک آنها را مختل نمایند. همچنین با تغییر در نفوذپذیری غشاء و ترغیب انقباض آن، عملکرد سایر غشاها و ارگانلها من‌جمله میتوکندریها را مختل می‌سازند (۴۵). قابل ذکر است که با مهار فعالیت ($K^+ Na^+$,)-ATPase غشاء، تعادل الکترولیتهای سلولی بهم خورده و عملکرد سلولی مختل می‌گردد (۴۶).

ارزیابی میزان پراکندگی سلولهای کومولوس در برگیرنده تخمک، به عنوان شاخصی مبنی بر طبیعی بودن روند بلوغ آزمایشگاهی تخمکها حاکی از عدم تأثیر حضور pen-strep بر روند مذکور می‌باشد.

در مجموع، از تجزیه و تحلیل یافته‌های به دست آمده از این مطالعه می‌توان چنین نتیجه گیری نمود که روند بلوغ هسته تخمکهای گاو در طی IVM به طور مثبت تحت تأثیر حضور مقادیر متداول pen-strep در مدیای کشت حاوی FCS و rhFSH قرار می‌گیرد. از طرفی علیرغم عدم تأثیر pen-strep بر روی نحوه پراکندگی یا ساختار گرانولهای کورتیکال، لیکن به نظر می‌رسد که حضور آنتی‌بیوتیکهای مذکور در طی بلوغ آزمایشگاهی تخمکها تأثیری منفی بر سرعت رشد جنینها داشته و شاید علت این امر را بتوان مربوط به تأثیر منفی آنتی‌بیوتیکها بر روی نحوه پراکندگی سایر ارگانلهای سلولی نظیر میتوکندریها (۴۷)، دستگاه گلژی، میکرو توبول‌ها (۴۸) و غیره دانست که با روند صحیح بلوغ سیتوپلاسم در تعارض بوده و احتمالاً از طریق تأثیر بر وقایع مرتبط با تقسیمات سلولی سبب به تعویق افتادن و یا مهار رشد جنینها می‌گردند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله مؤلف تشکر و سپاس خود را از بخش IVF دانشگاه اوترخت بویژه آقایان Dr. MM Bevers، Dr. B Colenbrander و

www.SID.ir

Archive of SID

خانمها E Zinstra، L Vantol و Drs. Beker ARGL به دلیل فراهم آوری تجهیزات و راهنمائیهای تکنیکی و نیز وزارت تحقیقات و فن‌آوری جمهوری اسلامی ایران به دلیل فراهم آوری امکان انجام این مطالعه در کشور هلند ابراز می‌دارد.

References

1. Liversedge NH, Jenkins JM, Keay SD, McLaughlin EA, Al-Sufyan H, Maile LA, Joels LA, Hull MG: Antibiotic treatment based on seminal cultures from asymptomatic male partners in in-vitro fertilization is unnecessary and may be detrimental. Hum Reprod 1996; 11: 1227-1231
2. Forman R, Guillett-Rosso F, Fari A, Volante M, Frydman R, Testart J: Importance of semen preparation inavoidance of reduced in vitro fertilization results attributable to bacteria Fertil Steril 1987; Mar; 47(3): 527-530
3. Beauchamp D, Laurent G, Maldague P, Abid S, Kishore BK, Tulkens PM: Protection against gentamycin-induced early renal alterations (phospholipidosis, increased DNA synthesis) by co-administration of poly-L-aspartic acid. J Pharmacol Exp Ther 1990; 255: 858-866
4. Jacoby F: Macrophages, Coordinating ed, Willmer. 1965, vol 2, Academic Press, London
5. Brasseur R, Carlier MB, Laurent G, Claes PJ, Vanderhaeghe HJ, Tulkens PM, Ruysschaert JM: Interaction of streptomycin and streptomycylamine derivatives with negatively charged lipid layers. Correlation between binding, conformation of complexes and inhibition of lysosomal phospholipase activities. Biochem Pharmacol 1985; 34: 1035-1047
6. Carlier MB, Laurent G, Claes PJ, Vanderhaeghe HJ, Tulkens PM: Inhibition of lysosomal phospholipases by aminoglycoside antibiotics: *in vitro* comparative studies. Antimicrob Agents Chemother 1983; 23: 440-449
7. Cottell E, McMorrow J, Lennon B, Fawsy M, Cafferkey M, Harrison RF. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. Fertil Steril 1996; 66: 776-780
8. Laurent G, Tulkens PM. Aminoglycoside nephrotoxicity: Cellular and molecular aspects. ISI atlas of science/ pharmacology 1987; 1: 40-44
9. Mingeot-Leclercq MP, Brasseur R, Schanck A: Molecular parameters involved in aminoglycoside nephrotoxicity. J Toxicol Environ Health 1995; 44: 263-300
10. Holyoak GR, Wang S, Liu G, Bunch TJ, Evans RC, Bunch TD: The effects of ceftiofur sodium (Naxcel) on bovine oocyte and preimplantation embryonic development assessed by *in vitro* embryo production techniques. J Vet Pharmacol Ther 1998; 21: 92-98
11. Marques CC, Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AEM: Neomycin disturbs bovine oocyte maturation and delays embryo development *in vitro*. Theriogenology 1997; 47: 194
12. Tune BM, Hsu CY: Mechanisms of beta-lactam antibiotic nephrotoxicity. Toxicol Lett 1990; 53: 81-86
13. Magli MC, Gianaroli L, Fiorentino A, Ferraretti AP, Fortini D, Panzella S: Improved cleavage rate of human embryos cultured in antibiotic-free medium. Hum Reprod 1996; 11: 1520-1524
14. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL: Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod 1988; 38: 1171-1180
15. Coon HG. Clonal culture of differentiated rat liver cells. J Cell Biol 1968; 39: 29a
16. Mori C, Hashimoto H, Hoshino K: Fluorescence microscopy of nuclear DNA in oocytes and zygotes during in vitro fertilization and development of early embryos in mice. Biol Reprod 1988; 39: 737-742
17. Yoshida M, Gran DG, Pursel VG: Confocal and fluorescenct microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. Mol Reprod Dev 1993; 36: 462-468
18. Kim NH, Funahashi H, Abeydeera LR, Moon SJ, Parther RS, Day BN: Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes *in vitro*. J Reprod Fertil 1996;107: 79-86
19. Lanbeck P, Paulsen O: Cytotoxic effects of four antibiotics on endothelial cells. Pharmacol Toxicol 1995; 77: 365-370
20. Hu JF, Gilmer L, Hopkins R, Wolfinbarger L, Jr: Effects of antibiotics on cellular viability in porcine heart valve tissue [published erratum appears in Cardiovasc Res 1990 Feb;24(2):168]. Cardiovasc Res 1989; 23: 960-964
21. Shirazi A, Colenbrander B, Bevers MM: The effect of penicillin-streptomycin on nuclear maturation of cultured bovine oocytes. In: 14th International congress on animal reproduction 2000, Stockholm, Sweden,

www.SID.ir

Archive of SID حضور آنتی بیوتیک در محیط کشت

(abst) 18: p 48
22. Alexander AM, Gonda I, Harpur ES, Kayes JB: Interaction of aminoglycoside antibiotics with phospholipid liposomes studies by microelectrophoresis. J Antibiot (Tokyo) 1979; 32: 504-510
23. Chung L, Kaloyanides G, McDaniel R, McLaughlin A, McLaughlin S: Interaction of gentamicin and spermine with bilayer membranes containing negatively charged phospholipids. Biochemistry 1985; 24: 442-452
24. Hostetler KY, Hall LB: Inhibition of kidney lysosomal phospholipases A and C by aminoglycoside antibiotics: possible mechanism of aminoglycoside toxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 1663-1667
25. Lipsky JJ, Lietman PS: Aminoglycoside inhibition of a renal phosphatidylinositol phospholipase C. J Pharmacol Exp Ther 1982; 220: 287-292
26. Marino A, Pisanti N: [Pharmacokinetics and nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics]. Clin Ter 1989; 129: 421-428
27. Herrmann E, Gierschik P, Jakobs KH: Neomycin induces high-affinity agonist binding of G-protein-coupled receptors. Eur J Biochem 1989; 185:677-683
28. Seydel JK, Coats EA, Cordes HP, Wiese M: Drug membrane interaction and the importance for drug transport, distribution, accumulation, efficacy and resistance. Arch Pharm (Weinheim) 1994; 327: 601-610
29. Mattioli M: Transduction mechanisms for gonadotropin- induced oocyte maturation. Zygote 1994; 2: 347-349.
30. Gannier F, White E, Lacampagne A, Garnier D, Le Guennec JY: Streptomycin reverses a large stretch induced increases in [Ca2+]i in isolated guinea pig ventricular myocytes. Cardiovasc Res 1994; 28: 1193-1198
31. Keiner S, Zimmermann U: [Glutathione-SH as protection from cytotoxic side-effects of gentamycin. Studies with isolated outer hair cells]. Hno 1995; 43: 492-497
32. Sanders DA, Fiddes I, Thompson DM, Philpott MP, Westgate GE, Kealey T: In the absence of streptomycin, minoxidil potentiates the mitogenic effects of fetal calf serum, insulin-like growth factor 1, and platelet- derived growth factor on NIH 3T3 fibroblasts in a K^+ channel-dependent fashion. J Invest Dermatol 1996; 107: 229-234
33. Schacht J: Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity. Otolaryngol Clin North Am 1993; 26: 845-856
34. Twyman RE, Green RM, McDonald RL: Kinetics of open channel block by penicillin of single GABAA receptor channels from mouse spinal cord neurones inculture. J Physiol (Lond) 1992; 445: 97-127
35. Golicov PP: The effect of antibiotics on the function of type-II and -III glucocorticoid receptors. Farmakol Toksikol 1991; Jul-Aug 54: 445-448
36. Laurincik J, Kroslak P, Hyttel P, Pivko J, Sirotkin AV: Bovine cumulus expansion and corona-oocyte disconnection during culture *in vitro*. Reprod Nutr Dev 1992; 32: 151-161
37. Laurincik J, Oberfranc M, Pivko J, Grafenau P, Kubovicova E: [Characteristics of the cumulus-oocyte complex during the preovulatory period in superovulated heifers]. Vet Med (Praha) 1992; 37: 141-147
38. Leibfried L, First NL: Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J Anim Sci 1979; 48: 76-86
39. De Wit AA, Wurth YA, Kruip TA: Effect of ovarian phase and follicel quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. J Anim Sci 2000 May; 78(5): 1277-1283 Related Articles, Books
40. Vaux DL: Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 786-789
41. Gardner DK, Sakkas D: Mouse embryo cleavage, metabolism and viability: role of medium composition. Hum Reprod 1993; 8: 288-295
42. Munne S, Grifo J, Cohen J, Weier HU: Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study. Am J Hum Genet 1994; 55: 150-159
43. Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J: Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. Hum Reprod 1993; 8: 2185-2191
44. Tune BM: Renal tubular transport and nephrotoxicity of beta lactam antibiotics: structure-activity relationships. Miner Electrolyte Metab 1994; 20: 221-231
45. Kaloyanides GJ: Drug-phospholipid interactions: role in aminoglycoside nephrotoxicity. Ren Fail 1992; 14: 351-357
46. Aramaki Y, Takahashi M, Inaba A, Ishii Y, S

www.SID.ir

Archive of SID

Tsuchiya: Uptake of aminoglycoside antibiotics into brush-border membrane vesicles and inhibition of (Na^+ + K^+)-ATPase activity of basolateral membrane. Biochim Biophys Acta 1986; 862:111-8.

47. Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, wolf E: Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. Related Articles, Books, LinkoutBiol, Reprod 2001; 64(3): 904-909

48. Kania G, Kanka J, Katska L, Rynska B: Distribution of the cortical granules and cytoplasmic organelles in bovine IVM oocytes with experimentally induced hardening of the zona pellucida. In: 4th Annual Conference of the Europian Society for Domestic Animal Reproduction. 2000

www.SID.ir