

تأثیر سیستمین 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 نصرافهانی **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](mailto:info@royaninstitute.org)

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۱/۲۷، پذیرش مقاله: ۸۴/۲/۱۷

*** هدف:** مطالعه تأثیر سیستمین بر از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی 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 ۵ درصد و ۱۰۰ میکرومولار سیستمین، گروه دو در محیط MEMα حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر hCG، ۱۰۰ میلی واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر rFSH و تخمکهای گروه ۳ در محیط MEMα حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر hCG، ۱۰۰ میلی واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر rFSH و ۱۰۰ میکرومولار سیستمین قرار داده شدند. تخمکها جهت بلوغ به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO₂ ۵ درصد قرار گرفتند.

*** یافته‌ها:** میزان از سرگیری میوز در گروه کنترل و گروههای آزمایشی یک، دو و سه به ترتیب ۷۴/۲۴ و ۹۴/۵، ۷۴/۲۰ و ۷۴/۲۴ 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 سیستمین به محیط کشت اضافه شد در طی روزهای اول تا چهارم نسبت به دو گروه 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.

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

کل واژگان: بلوغ آزمایشگاهی، تخمک نارس، موش، سیستمین

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

مقدمه

از مواد دیگر می‌گیرند تا خنثی شوند به همین دلیل خیلی فعالند. از لحاظ فیزیولوژیکی تولید ROS در متابولیسم سلولی اتفاق می‌افتد. تحت شرایط فیزیولوژیکی فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری منبع اصلی ROS داخل سلولی است که ۲ درصد از اکسیژنهای تولید شده در طی این چرخه به‌طور ناقص احیا می‌شوند و تولید O^{۰۲} می‌کنند فشار اکسیداتیو باعث انواع متفاوتی از آسیبها، مثل پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، اکسیداسیون آمینواسیدها اسیدهای نوکلئیک، آپوپتوزیس و نکروزیس می‌شود (۱، ۲، ۳). غلظت ROS داخل سلولی در سیستمهای آزمایشگاهی افزایش می‌یابد. مثلاً مقادیر بالاتری از O^{۰۲} و

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^{۰۲}) هیدروژن پراکسید (H₂O₂) و رادیکال هیدروکسیل (OH^۰) است که همگی قادرند با لیپیدهای غشا، اسیدهای نوکلئیک، پروتئینها، 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

مطالب فوق هدف از این مطالعه بررسی تاثیر سیستمین به عنوان یک آنتی اکسیدان بر روند از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش و تکوین جنینهای حاصل از آن می باشد.

مواد و روشها

تهیه تخمکهای نارس

در این تحقیق از موشهای سوری نژاد NMRI (۶-۴ هفته ای) 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 MEMa حاوی FCS ۵ درصد، 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 هسته دار (GV: Germinal Vesicle) با سیتوپلاسم روشن، قشر شفاف (ZP: Zona Pellucida) یکنواخت با فضای دور زرده (Perivitelline) مناسب برای ۴ گروه انتخاب شدند.

بلوغ تخمکها

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

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

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

گروه سه: ۲۶۴ تخمک نارس در محیط MEMa حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵ واحد بین المللی در میلی لیتر hCG، ۱۰۰ میلی واحد بین المللی در میلی لیتر rFSH و ۱۰۰ میکرومولار سیستمین قرار داده شد. تخمکهای هر گروه به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ CO₂ 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 تخمکهای نارس (GVB: Germinal Vesicle Breakdown) با نشانه شروع تقسیم میوز و تخمکهای دارای جسم قطبی به عنوان تخمکهای بالغ با (MII) شناسایی شد (شکل ۱).

لقاح و تکوین تخمکهای بالغ شده

ابتدا موشهای سوری نژاد NMRI به روش قطع نخاع کشته

H₂O₂ در مراحل اولیه کلیواژ جنینهای موش تولید شده در آزمایشگاه در مقایسه با بدن مشاهده می شود (۲). غلظت اکسیژن در مجاری تناسلی ۹-۳ درصد است که مشابه با شرایط استاندارد در آزمایشگاه است (۴). کشت جنینها در آزمایشگاه تحت فشار O₂ ۲۰ درصد نسبت به کشت جنینها تحت فشار O₂ ۵ درصد یا O₂ ۷ درصد رادیکالهای آزاد بیشتری تولید می کند (۵، ۶، ۷). رادیکالهای آزاد در طی کشت اتصال اسپرم - تخمک را مهار می کنند (۸). برای حفاظت تخمکها و جنینها از فشار اکسیداتیو در طی کشت اضافه کردن آنتی اکسیدانها به محیط کشت مفید است برای مثال اضافه کردن آنتی اکسیدانهای آنزیمی خارج سلولی از قبیل سوپراکسیددسموتاز (SOD: Superoxide Dismutase) کاتالاز یا آنتی اکسیدانهای قابل متابولیزه به محیط کشت پیشنهاد شده است (۹). علاوه بر مکانیسمهای آنزیمی، مکانیسمهای غیر آنزیمی از قبیل گلوکوتایون، ویتامین E و C، تحریک کننده های سنتز گلوکوتایون از جمله ترکیبات تیولی از قبیل سیستمین، بتامراکاپتواتانول می تواند تاثیرات ROS را خنثی کنند (۱۰، ۱۱). رونویسی mRNA به اکثر آنتی اکسیدانهای آنزیمی در تخمکها و جنینهای پستانداران صورت می گیرد (۱۲).

گلوکوتایون یک ترکیب تری پپتیدیولی است و در همه سلولهای زنده یافت می شود و به عنوان مهم ترین آنتی اکسیدان در سلولهای پستانداران به شمار می رود 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 می آید سنتز کافی گلوکوتایون است. همچنین نشان دادند که سطوح بالای گلوکوتایون به تشکیل کمپلکس اسپرم تخمک برای تکوین (MPN: Male Pronucleus) کمک می کند (۱۴). Yamauchi و همکاران نشان دادند گلوکوتایون در سنتز پروتیین، DNA و انتقال آمینواسیدها در داخل تخمکهای در حال بلوغ نقش دارد. کمبود گلوکوتایون در تخمکها قبل از لقاح باعث می شود که تشکیل MPF بعد از لقاح دچار نقصان شود (۱۵). سنتز گلوکوتایون در طی بلوغ تخمک در موش (۱۶) هامستر (۱۷) و خوک (۱۸) گزارش شده است. بنابراین سطح گلوکوتایون یافت شده در انتهای بلوغ تخمک به عنوان یک شاخص بیوشیمیایی خوب برای بقا (Viability) تخمک است (۱۹).

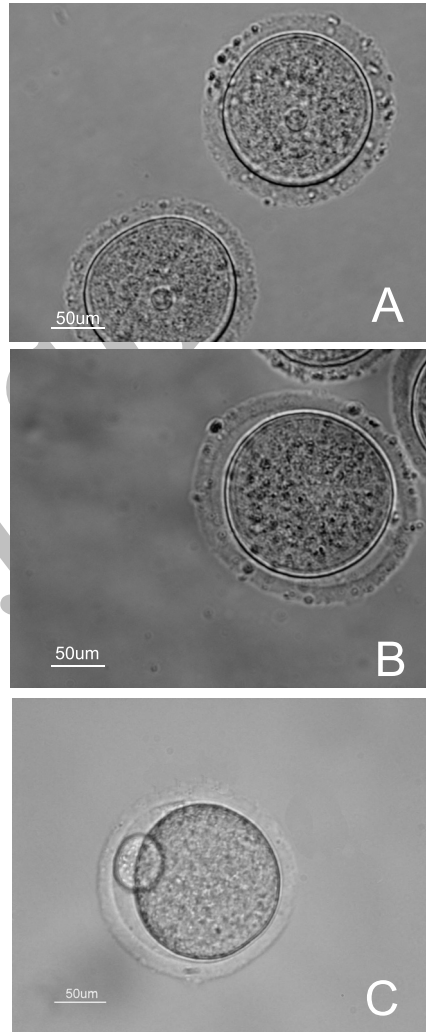
بلوغ تخمک مستلزم بلوغ هسته ای و سیتوپلاسم است. تغییرات مولکولی بی شماری از جمله فسفریلاسیون پروتیینها و فعال شدن راههای متابولیکی ویژه در بلوغ سیتوپلاسمی دخالت دارند که از جمله این راهها سنتز گلوکوتایون است (۲۰). در تخمک گاو میزان گلوکوتایون بعد از بلوغ آزمایشگاهی (IVM) شاخصی برای بلوغ سیتوپلاسمی است (۲۱). ترکیبات تیولی با وزن مولکولی کم از جمله سیستمین و بتامراکاپتواتانول سنتز گلوکوتایون داخل سیتوپلاسمی را افزایش می دهند و از این طریق سرعت تکوین جنین را بهبود می بخشند (۲۲). اضافه کردن سیستمین طی IVM تخمکهای خوک موجب بلوغ سیتوپلاسمی می شود (۲۳). همچنین اضافه کردن این ماده در طی IVM به تخمک گوسفند (۲۴) و بوفالو (۲۵) سرعت تکوین جنین حاصله را بهبود می دهد. با توجه به

با انتقال اسپرمهای فعال و سالم از کنار قطره (در هر میلی لیتر 1×10^5 عدد اسپرم) به داخل قطرات محیط T₆ حاوی ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر BSA، 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 بر میلی لیتر 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 این مطالعه ۱۱۳۸ تخمک نارس و سالم از تخمدان موشهای سوری جدا شده و به‌طور تصادفی در ۳ گروه آزمایشی و یک گروه 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 علائم از سرگیری میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۷۴/۲۰ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که نسبت به گروه یک و گروه سه ($p=0/0001$) اختلاف معنی داری را نشان داد. از این میزان 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 اختلاف معنی داری ($p=0/0001$) را نشان داد (جدول ۱). 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. در روز اول نرخ تشکیل جنین ۶۳ درصد بود که ۵۱ درصد آنها دو سلولی و ۱۱ درصد ۴ سلولی بودند. نرخ تشکیل جنین در این گروه نسبت به گروه دو اختلاف معنی داری را نشان داد. نرخ تشکیل جنین در گروه یک و گروه سه نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ولی اختلاف معنی داری را نشان نداد. در گروه اول آزمایشی از ۲۹۲ تخمک نارس سالم پس از ۲۴ ساعت در ۵۷/۷ درصد تخمکها نشانی از علائم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۹۴/۵ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که نسبت به گروه کنترل و گروه دو ($p=0/0001$) اختلاف معنی داری را نشان داد ولی نسبت به گروه سه تفاوت معنی داری را نشان نداد. از این میزان ۸/۹ درصد هسته آنها شکسته شد و ۸۵/۶ درصد تخمکها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه کنترل ($p=0/0001$) و گروه سه ($p=0/0001$) اختلاف معنی داری داشت (جدول ۱).

شد، دم اسپیدیم آنها جدا و به قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت T₆ حاوی ۴ میلی گرم سرم آلبومینی گاوی (BSA: Bovin Serum Albumin) در هر میلی لیتر منتقل شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی CO₂ ۵ درصد انکوبه شد.



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

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

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

*: نسبت به گروه دو تفاوت معنی داری را نشان دادند ($p=0/0001$)

GV; Germinal Vesicle, GVB; Germinal Vesicle Breakdown, MII; Metaphase II

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

گروههای آزمایشی	دوز مصرفی Cysteamine	تعداد تخمکهای بالغ	Inseminate ۲۴ ساعت پس از				Inseminate ۲۸ ساعت پس از				Inseminate ۳۲ ساعت پس از				Total				
			۲ سلولی (درصد)	۳ سلولی (درصد)	۴ سلولی (درصد)	مورولا (درصد)	۲ سلولی (درصد)	۳ سلولی (درصد)	۴ سلولی (درصد)	مورولا (درصد)	۲ سلولی (درصد)	۳ سلولی (درصد)	۴ سلولی (درصد)	مورولا (درصد)					
گروه کنترل	۰	۱۲۴	۱۷/۸	۵۱/۳	۶۳/۳	۹۱	۲۲/۲	۳۲/۴	۶۴/۲	۱۰۵	۱۱/۸	۸۱/۷	۳۴/۷	۶۵/۲	۲۷	۲۳/۲	۳۴/۷	۶۵/۲	۹۴
گروه ۱	۱۰۰ میکرومولار	۱۱۹	۱۸/۲۸	۵۱/۳	۶۹/۷	۶۱	۲/۲	۲۱/۸	۲۶/۲	۹۰	۱۱	۲۴/۲	۳۷/۸	۷۲/۲	۶	۲۴	۳۷/۸	۷۲/۲	۸۶
گروه ۲	۰	۷۰	۷/۱۴	۳۸/۵	۲۵/۷	۲۷	۱۴/۲	۳۳/۸	۲۳/۲	۳۳	۲	۵/۵	۲۴/۲	۱۷/۲	۳۳	۱۷	۲۴/۲	۳۶	۳۶
گروه ۳	۱۰۰ میکرومولار	۹۸	۱۳/۲	۱۸/۲۸	۶۴/۲	۱۳	۲۳/۲	۴۶/۹	۲۳/۲	۶۹	۱۶	۱۶/۳	۳۹/۷	۷۳/۲	۳	۱۶	۱۶/۳	۳۹/۷	۷۳

* گروه یک نسبت به گروه دو اختلاف معنی داری را نشان داد (P=0.01)

* گروه سه نسبت به گروه دو اختلاف معنی داری را نشان داد (P=0.001)

Early B: Early Blastocyst

Late B: Blastocyst

است. نرخ تشکیل جنین در روز اول ۶۴ درصد بود که نسبت به گروه دو اختلاف معنی داری را نشان داد (p=۰/۰۱) ولی با گروه کنترل تفاوت چندانی نداشت.

بحث

در این مطالعه تاثیر سیستمین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک نارس موش و جنینهای حاصله بررسی گردید. این ماده بک 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 می شوند. اگر در طی متابولیسم گلوکز در میتوکندری طی چرخه انتقال الکترون برای تولید (ATP: Adenosine Triphosphate) (آدنوزین تری فسفات)، اکسیژن به صورت ناقص احیا گردد به جای تولید آب رادیکال آزاد اکسیژن تولید می شود. H_2O_2 ، OH^- را آزاد می کند که با دیگر مولکولهای سیتوپلاسمی واکنش شدید نشان می دهد و باعث آسیب سلولی می شود (۳). کشت جنینها تحت فشار اکسیژن ۲۰ درصد در آزمایشگاه نسبت به جنینهایی که تحت فشار O_2 ۵ درصد یا ۷ درصد کشت داده شده اند رادیکالهای آزاد بیشتری تولید می شود (۵، ۶، ۷). مشخص شده است که تعادل بین تولید ROS و به دام اندازندهها (Scavenging) فاکتور مهمی برای به دست آوردن توانایی لقاح در آزمایشگاه است (۱۶). به نظر می رسد که جنینها در آزمایشگاه در معرض فشار اکسیداتیو قرار می گیرند و مکانیسمهای دفاعیشان برای حفاظت از ساختمانهای سلولی ظرفیشان کارایی ندارد. تاثیرات مضر ROS در کشت آزمایشگاهی باعث اختلال میتوکندری، آسیب به DNA، RNA و پروتیین می شود فشار اکسیداتیو باعث قطعه

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 ۶۹/۷ درصد بود که نسبت به گروه دو (p=۰/۰۰۱) اختلاف معنی داری را نشان داد و نسبت به گروه کنترل و گروه سه تفاوت معنی داری را نشان نداد. در گروه 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 ۷۴/۲۶ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که نسبت به گروه یک و سه (p=۰/۰۰۱) کاهش چشم گیری داشت و اختلاف معنی داری را نشان داد ولی با گروه کنترل اختلاف چندانی نداشت. از این میزان هسته ۲۱/۵۱ درصد آنها شکسته شد و ۵۲/۷۴ درصد آنها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند که با گروه یک و گروه سه (p=۰/۰۰۱) اختلاف معنی داری 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 معنی داری داشت.

در گروه سوم آزمایشی ۲۶۴ تخمک نارس سالم جدا شد. پس از ۲۴ ساعت در ۳/۷ درصد آنها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۹۶/۲ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که نسبت به گروه کنترل و گروه دو (p=۰/۰۰۱) اختلاف معنی داری را نشان داد. از این میزان ۱۴/۳ درصد آنها شکسته شده و ۸۱/۸ درصد آنها تا مرحله MII پیش رفتند و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه کنترل و گروه دو (p=۰/۰۰۱) اختلاف معنی داری 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

در محیط کشت همراه است. اضافه کردن ترکیبات تیولی با وزن مولکولی کم از جمله سیستتامین و بتامرکاپتوتانول به محیط کشت باندهای دی سولفید سیستین را می شکند و سیستین را به سیستین احیا می کنند و در نتیجه باعث افزایش سیستین می شود که این ماده پیش ساز گلوپتایون است و بنابراین سنتز گلوپتایون افزایش می یابد و از این طریق تکوین جنین را بهبود می دهند (۳۰، ۳۴، ۳۶).

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

در این مطالعه تاثیر سیستتامین با هورمون و بدون هورمون مورد مطالعه قرار گرفت. از سرگیری میوز در گروه یک ۹۴/۵ درصد بود و در گروه سه که حاوی هورمون می باشد ۹۶ درصد 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 می دهد که اضافه کردن هورمون به همراه سیستتامین تاثیر چندانی بر بلوغ آزمایشگاهی از سرگیری میوز و تکوین جنین در آزمایشگاه ندارد. در این مطالعه سیستتامین 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 معنی داری را نشان داد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که سیستتامین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار از سرگیری میوز، بلوغ آزمایشگاهی را بهبود می بخشد و بر تکوین جنینهای حاصله تاثیر چندانی ندارد که احتمالاً به دلیل افزایش سنتز گلوپتایون و در نتیجه کاهش ROS می باشد.

تقدیر و تشکر

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

قطعه شدن DNA و موتاسیون می شود که توانایی تکوین جنینی را کاهش می دهد. با توجه به آسیبهای وارده به سلول و برای حفاظت تخمکها و جنینها اضافه کردن آنتی اکسیدانها به محیط کشت تخمک ضروری به نظر می رسد (۲۶).

(GSH: Glutathione Sulfhydryl) (گلوپتایون) یک ترکیب سولفیدریل غیرپروتئینی است که در سلولهای پستانداران وجود دارد و نقش مهمی در حفاظت سلولی از آسیب اکسیداتیو دارد. با نزدیکی تخمک به زمان اولولاسیون (تخمک گذاری) در تخمدان، محتوای گلوپتایون افزایش می یابد. بعد از لقاح به موازات تخمک گذاری، گلوپتایون در **Decondensation** اسپرم شرکت می کند و این امر باعث انتقال سر اسپرم در حال لقاح به پرونوکلئوس نر می شود (۱۴، ۱۶، ۱۷). مشخص شده است که غلظت گلوپتایون داخل سیتوپلاسمی در جنینهای گاو در تکوین آزمایشگاهی متفاوت است. کمترین مقدار آن در جنینهای ۲-۸ سلولی و بالاترین مقدار آن در بلاستوسیتهای خارج شده از زونا پلاسیدا است (۲۷). افزایش سنتز گلوپتایون در مرحله ۱۶-۹ سلولی است که منطبق با آغاز فعال سازی ژنوم جنینی است (۲۸). همچنین در جنینهای موش از مرحله اولیه جنینی تا مرحله مورولا توانایی محدودی برای سنتز گلوپتایون دارند در حالی که بلاستوسیتها توانایی سنتز این ماده را دارند (۲۹). این یافتهها پیشنهاد می کند که سنتز مقداری از گلوپتایون 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 گلوپتایون را بعد از فعال سازی ژنوم جنین سنتز کنند (۳۰).

GSH یک آنتی اکسیدان مهم در سلولهای پستانداران به شمار می رود. دارای دو شکل اصلی است. GSH (شکل سولفیدریل) و (GSSG: Glutathion disulphide) (شکل دی سولفید) است که GSH ۲ توسط آنزیم گلوپتایون ردوکتاز به GSSG که فرم اکسید آن است تبدیل می شود اکسید شدن این ماده باعث می شود که $H_2O \rightarrow H_2O_2$ تبدیل گردد و از طرفی این ماده بلوغ سیتوپلاسمی را افزایش می دهد که در نتیجه بلوغ سیتوپلاسمی تکوین جنینی بهبود می یابد (۳، ۳۱). GSH توسط چرخه گاما گلوپتایون سیستین سنتز می شود (۳۲). سنتز این ماده وابسته به در دسترس بودن سیستین در محیط خارج سلولی است (۳۳). سیستین ناپایدار است و سریعاً به سیستین اکسید می شود، کمبود سیستین در محیط کشت نتیجه اکسیداسیون خود به خودی سیستین است که با تضعیف سنتز گلوپتایون



References

- Halliwell B, Gutteridge JMC: Review article: Free radicals, atoxiats and human disease: where are we now? Lab Clin Med 1992; 119: 598-620
- Feugang JM, Roover R, Meons A, Leonard S: Addition of β -meraphothanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine balstocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. Theriogenology 2004; 1: 71-90
- Uday B, Dipak D, Ranajit K: Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. Current Science

- 1999; 77: 658-666
- Mastrianni L, Jones R: Oxygen tensions in the rabbit falbpian tube. J Reprod Fertil 1965; 9: 99-102
- Fowjer CJ, Callingham BA: Substrate selective activation of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by oxygen. Biochem Pharmacol 1978; 2: 1995-2000
- 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
- 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, Buchingham 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. *Science* 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 Moutassim 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. *Theriogenology* 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 decondensing activity in maturing 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 cysteamine, 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. *Theriogenology* 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 utilization. *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. Bannai 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

