# اثر غلظت‌های مختلف گلوکز بر بلوغ تخمک کومولوس‌دار مدل گاوی، لقاح و تکوین پیش ازلانه گزینی آن درشرایط آزمایشگاه

دکترنورالله رضائی*، دکترسید محمد باقر هاشمی**، دکترمحمدجعفر گل‌علی پور***، دکتر ری چنگ چین****

## چکیده

***سابقه و هدف:*** *مواد مغذی و سوبستراهای مختلف انرژی‌زا در محیط کشت می‌توانند در بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک اثر بگذارند. در مورد تأثیر گلوکز برروی بلوغ تخمک در محیط کشت و تکوین رویانی بعدی آن، نظرات متناقضی وجود دارد. هدف از این مطالعه تعیین اثر غلظت‌های مختلف گلوکز بر بلوغ تخمک کومولوس‌دار، لقاح و تکوین پیش از لانه‌گزینی آن در یک مدل گاوی است.*

***مواد و روش‌ها:*** *تخمدان‌های گاوی از یک کشتارگاه جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. مجموعه تخمک کومولوس (۱۱۷۰ عدد) از فولیکول‌هایی (به قطر۶-۲ میلی‌متر) آسپیره و به‌طور تصادفی در چهارگروه (سه‌گروه تجربی و یکی کنترل) تقسیم سپس در دیش‌های کشت ارگان حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت بلوغ کشت داده شدند. به محیط‌های کشت بلوغ گروه‌های تجربی به‌ترتیب مقادیر ۳، ۱/۵، ۱میلی گرم در میلی‌لیتر D- گلوکز اضافه شد و همه در انکوباتور ۳۸/۵ درجه سانتیگراد، دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و هوای ۹۵ درصد با رطوبت بالا برای مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. ۳۹۴ تخمک پس از کشت برای بررسی میزان بلوغ به‌طور تصادفی فیکس و۷۷۶ تخمک دیگر را برای بررسی میزان لقاح و تکوین رویانی اولیه با اسپرم‌های ذوب شده گاو نر لقاح داده و بعد از ۱۸ ساعت از لقاح، ۳۸۷ تخمک (تخم فرضی) به منظور بررسی میزان لقاح فیکس و ۳۸۹ عدد دیگر در محیط‌های تکوینی مشابه تا مرحله بلاستوسیست (روز هشتم بعد از لقاح) کشت داده شدند. نمونه‌ها با استرئومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفته و نتایج با آزمون کای‌دو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.*

***یافته‌ها:*** *نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بلوغ تخمک‌ها در محیط‌های دارای گلوکز در مقایسه با گروه کنترل (به‌ترتیب۸۲، ۷۹ و۸۰ درصد در مقابل گروه کنترل ۵۵ درصد) به‌طور معناداری بیشتر بوده است ($P<0/001$) گر چه میزان لقاح تخمک‌ها در بین گروه‌های مختلف فرقی نداشت (به‌ترتیب۵۷، ۵۴ و۵۰ درصد در مقابل گروه کنترل ۴۹ درصد)، اما میزان تشکیل بلاستوسیست‌ها در گروه‌های مورد، به‌طور معناداری ($P<0/01$) بیشتر از گروه کنترل بوده است (به‌ترتیب۳۰، ۳۳ و۳۲ درصد در مقابل گروه کنترل ۱۴درصد).*

***نتیجه‌گیری:*** *یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که گلوکز در محیط کشت بلوغ، در بلوغ تخمک کومولوس‌دار و تکوین رویانی بعدی آن اثر مثبت دارد.*

***کلیدواژه‌ها:*** *گلوکز، تخمک گاوی، بلوغ آزمایشگاهی، لقاح.* « دریافت: ۸۴/۱۰/۲۷ پذیرش:۸۵/۱۰/۱۲»

*دانشیارگروه تشریح دانشکده پزشکی ساری ** استادیارگروه بیوشیمی و ژنتیک دانشکده پزشکی ساری

*** دانشیار گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی گرگان

**** دانشیار بخش زنان و زایمان، دانشگاه مک گیل، کانادا

* **عهده‌دار مکاتبات:** مازندران، ساری، بلوار خزر، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، تلفن تماس:۳۲٤۱۰۳۱-۰۱۵۱، نمابر:۳۲٤۷۱۰٦-۰۱۵۱

Email: noor454@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

**مقدمه**

رشد و تکوین اولیه رویان، نیاز به فعالیت متابولیکی قابل توجه برای تولید انرژی (ATP) و سنتز انواع مولکول‌های پیچیده دارد (۱). مواد مغذی و سوبستراهای مختلف انرژی مورد استفاده برای بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاه، بربلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک به شدت تأثیر گذاشته و بعد از لقاح تخمک بر تکوین رویان اثر می‌گذارند (۲). تکوین رویان شدیداً تحت تأثیر شرایط بلوغ تخمک قرار دارد (۳). گلوکز، پیرووات ولاکتات سوبستراهای اصلی برای متابولیسم انرژی در سلول‌های پیکری (کومولوس) هستند (٤ و ٥). پیرووات سوبسترای اصلی انرژی است که می‌تواند به‌طور مستقیم به‌وسیله تخمک و تخم استفاده شود (٦). همچنین گلوتامین می‌تواند به‌عنوان یک سوبسترای انرژی، در بهبود بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های هامستر (۷) و خرگوش (۸) عمل کند. گزارش شده است که گلوکز و گلوتامین جهت پیشبرد سنتز ترکیبات پورینی جدید در داخل سلول‌های پیکری کومولوس، با هم عمل می‌کنند به‌طوری که زمان و مدت سنتز این ترکیب، تعیین‌کننده توقف یا ادامه تقسیم میوزی در تخمک‌ها خواهد بود (۹). به‌علاوه در طول بلوغ آزمایشگاهی تخمک مقداری از گلوکز می‌تواند به گلوکز آمین تبدیل شود و برای سنتز ماتریکس خارج سلولی و گسترش کومولوس استفاده شود (۳). همچنین گزارش شده است که ترکیب گلوکز و ۱۱ اسید آمینه در طول بلوغ آزمایشگاهی تخمک، برای تکامل بعد از لقاح رویان گاو مهم هستند (۱۰).

تحقیقات نشان داده است که سلول‌های کومولوس در استفاده از سوبستراهای انرژی ( شامل گلوکز، پیرووات، لاکتات و اسیدهای آمینه) در طی بلوغ آزمایشگاهی تخمک، نقش مهم و کلیدی را بازی می‌کنند از طرف دیگر حضور هورمون محرکه فولیکولی باعث افزایش جذب گلوکز به‌وسیله مجموعه اووسیت، کومولوس شده و حضور هورمون لوتئینیزینگ در محیط کشت قدرت تکاملی اووسیت‌ها را افزایش داده و اکسیداسیون گلوکز در داخل مجموعه کومولوس، اووسیت را افزایش می‌دهد (۱۱). استفاده تخمک از پیرووات به‌واسطه ارتباطش با سلول‌های کومولوس است (۱۲). Geshi و همکارانش در سال ۲۰۰۰ گزارش کرده‌اند که سدیم پیرووات در محیط بلوغی بدون سرم، می‌تواند بلوغ هسته‌ای تخمک‌های گاوی عاری از کومولوس را حمایت کند و پیش ببرد (۱۳)، اما Zheng و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان داده‌اند که پیرووات به تنهایی برای بلوغ سیتوپلاسمی تخمک کافی نیست (١٤). Sutton و همکارانش در سال۲۰۰۳ اظهار داشتند گرچه تخمک‌ها توانایی محدودی در استفاده از گلوکز دارند، اما سلول‌های کومولوس می‌توانند گلوکز را از طریق گلیکولیز به پیرووات یا لاکتات متابولیزه کنند تا به‌وسیله تخمک‌ها مورد استفاده قرار گیرد(۳). همچنین سلول‌های کومولوس می‌تواند با حضور اسید آمینه سیستئین در محیط کشت بلوغ، گلوتاتیون را که یک ماده آنتی‌اکسیدان در داخل سلول است بسازند (۱۵).

بلوغ مجموعه تخمک، کومولوس در محیط بدون گلوکز منجر به اختلال در گسترش کومولوس و تکوین رویان می‌شود(۱۰). اما محققین دیگر اظهار داشتند که حضور، گلوکز در محیط کشت بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاه درتکوین رویانی پیش از جایگزینی رویان‌های هامستر(١٦)، موش (۱۷) و گاو (۲۰-۱۸) می‌تواند اثرات زیان‌آور داشته باشد. همچنین گلوکز در بلوغ تخمک‌های

Archive of SID
www.SID.ir

انسانی عاری از کومولوس در طول کشت در محیط آزمایشگاه اثرمهاری دارد (۲۱). Saito و همکارانش در (سال۱۹۹٤) گزارش کرده‌اند که گلوکز در بلوغ تخمک‌های نارس هسته‌دار (ژرمینال وزیکول) موش مفید نیست و ممکن است مانع میوز و نیز بلوغ تخمک‌های فولیکولی شود (۲۲). درحالی‌که Lim و همکارانش در سال ۲۰۰۰ گزارش کردند که گلوکز بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های گاوی را به پیش می‌برد (۲۳). لذا با توجه به اظهارات متفاوت مذکور، اثر غلظت‌های مختلف گلوکز بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک و تکوین رویانی بعدی آن به بررسی بیشتری نیاز دارد. هدف از این مطالعه تعیین اثر غلظت‌های مختلف گلوکز بر روی بلوغ تخمک کومولوس‌دار گاوی، لقاح و تکوین رویانی اولیه آن در شرایط آزمایشگاه می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### ● بلوغ تخمک‌ها در شرایط آزمایشگاه

تخمدان‌های گاو(۳٤۰ عدد) از یک کشتارگاه جمع‌آوری شد. گاوها از نوع هولشتین بالای سه سال بوده‌اند. تخمک‌ها در سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در مدت ۲ ساعت بعد از کشتار به آزمایشگاه انتقال داده شدند. مجموعه تخمک -کومولوس از فولیکول‌هایی به قطر ٦-۲ میلی‌متر با سرسوزن شماره ۱۸ وصل به یک سرنگ ۱۰ سی‌سی آسپیره و در زیر لوپ مجموعه تخمک، کومولوس‌هایی که دارای حداقل سه لایه سلول کومولوس دراطراف خود بوده و سیتوپلاسم هموژن داشتند، جمع‌آوری شده است. زیرا اندازه تخمک و ارتباط بین سلولی بین تخمک و سلول‌های کومولوس جهت کسب ظرفیت قابلیت بلوغ در تخمک، مهم است. تعداد تخمک‌ها ۱۱۷۰ عدد بودند. مجموعه تخمک، کومولوس چهاربار به سرعت در محیط فر با شستشوی تخمک (Hepes Buffered Tyrodes Medium) TLH حاوی ۰/۳ درصد پلی‌وینیل پیرولیدون (Polyvinyl Pyrolidone= PVP) و۵۰ میکروگرم در میلی‌لیترجنتامایسین شستشو شده‌اند (۲٤)، و به‌طور تصادفی به چهار گروه (سه گروه تجربی و یک گروه کنترل) تقسیم شدند. محیط کشت بلوغ شامل یک محیط با ترکیب شیمیایی مشخص (۲۵) که به آن ۰/۳درصد PVP و ۷۵ میلی‌واحد در میلی‌لیتر هر یک ازهورمون‌های محرکه فولیکولی (FSH) و لوتئینیزینگ هورمون (LH) اضافه شد. بر اساس مطالعه زمینه‌ای، گروه کنترل تنها در محیط کشت بلوغ، گروه تجربی۱ در محیط کشت بلوغ با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر D– گلوکز، گروه تجربی ۲ در محیط کشت بلوغ با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر D– گلوکز و گروه تجربی ۳ در محیط کشت بلوغ با غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر D– گلوکز کشت داده شدند. بعد از شستشو، ۱۰ تخمک در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت بلوغ در یک دیش کشت ارگان با حفره مرکزی کشت داده شدند. مجموعه تخمک - کومولوس در ۳۸/۵ درجه سانتیگراد در شرایط ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۵درصد هوا با حداکثر رطوبت در انکوباتور قرار داده شدند. بعد از ۲٤ ساعت از کشت، به‌طور تصادفی ۳۹٤ تخمک به‌منظور بررسی میزان بلوغ، فیکس شدند و ۷۷٦ تخمک برای لقاح آزمایشگاهی استفاده شدند. همه مواد مصرفی در این تحقیق از شرکت سیگما تهیه گردیده است.

### ● آماده کردن اسپرم و لقاح آزمایشگاهی

نی‌های اسپرم در آب ۳۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۳۰ ثانیه ذوب شدند و اسپرم‌ها همان‌طوری که Chian

Archive of SID

www.SID.ir

همکارانش در سال۲۰۰۲ شرح داده‌اند به روش شناور کردن (swim-up) آماده شدند (۲٤). سپس اسپرم و تخمک در قطرات ۵۰ میکرولیتر ازمحیط لقاح (modified mTALP (Tyrodes medium محتوی ۲ میکروگروم در میلی‌لیتر هپارین در زیر روغن در دمای ۳۸/۵ درجه سانتیگراد در ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۵ درصد هوا با ماکزیمم رطوبت به مدت ۱۸ساعت انکوبه شدند (۲٤). غلظت نهایی اسپرم در هر قطره $۱۰^{٦} \times ۱$ اسپرم در هر میلی‌لیتر بود و در هر قطره ۵ تخمک قرار داده شد.

● کشت جنین

بعد از ۱۸ ساعت از لقاح ۳۸۷ تخمک (زیگوت فرضی presumptive zygote) برای بررسی میزان لقاح به طورتصادفی فیکس و۳۸۹ تخمک برای بررسی تکوین رویانی اولیه سه بار در محیط TLH شستشو داده شدند و سپس به قطره ۵۰ میکرولیتری محیط تکوینی Bovine Embryo Culture Medium) BECM) مکمل با ۳ میلی‌گرم در میلی لیتر BSA (Bovine Serum Albumin) و۱ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین در زیر روغن کشت داده شدند (۲۲). جنین‌ها ۱۲۰ ساعت بعد از لقاح در محیط مذکور کشت داده شدند و سپس به محیط کشت دیگری حاوی قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط BECM مکمل با ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله (Fetal Calf Serum =FCS و ۰/۲۵ میلی‌مول اسیدپیرووِیک در زیر روغن برای کشت تکوینی بیشتر (تا ۱۹۲ ساعت یا روز هشتم بعد از لقاح) قرار داده شدند.

● ثابت کردن (فیکس) تخمک‌ها

بعد از ۲٤ ساعت بلوغ و ۱۸ ساعت از لقاح، تخمک‌ها به‌وسیله پیپتاژ مکانیکی از سلول‌های کومولوس عاری شده و بین لام و لامل قرار داده شدند و در فیکساتیو (محلول اسید استیک و اتانل به نسبت ۱ به ۳) برای حداقل ۲٤ ساعت فیکس شدند تخمک‌ها سپس با اورسئین درصد رنگ‌آمیزی شدند( ۲۵). لام‌ها در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست از نظر بلوغ تخمک و میزان لقاح بررسی شدند (۲۵).

بلوغ تخمک‌ها به‌صورت تخمک نارس هسته‌دار (germinal vesicle )، مرحله متافاز یک (MI) با مشاهده کروموزوم‌های موجود در هسته و بدون مشاهده جسم قطبی اولیه، مرحله متافاز دو (MII) با مشاهده جسم قطبی اولیه و کروموزوم‌های موجود در هسته سلول تعیین گردید. لقاح با مشاهده دو پرونوکلئوس همرا با دم اسپرم در سیتوپلاسم مشخص شده است. همچنین تخمک‌هایی با دو پرونوکلئوس و یک جسم قطبی ثانویه واضح اما بدون دم اسپرم هم به‌عنوان لقاح‌یافته تلقی شده‌اند.

میزان تخمک‌های بالغ، میزان تخمک‌های لقاح یافته و میزان بلاستوسیست‌های گروه‌ها محاسبه گردید برای مقایسه آماری از آزمون کای اسکویر استفاده شده و مقدارP کمتر از ۵٪ معنادار تلقی شده است.

## یافته‌ها

همان‌طوری که در جدول ۱ نشان داده شده است، میزان بلوغ تخمک‌ها در محیط‌های بلوغ گروه‌های تجربی محتوی ۳، ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گلوکز (به‌ترتیب ۸۲، ۷۹ و ۸۰ درصد) بیشتر از میزان بلوغ تخمک‌ها در محیط بدون گلوکز یا محیط کنترل (۵۵ درصد) بوده است، آزمون نشان داد که این اختلاف به لحاظ آماری معنادار می‌باشد (P<۰/۰۰۱) اما بین میزان بلوغ تخمک در گروه‌های تجربی با غلظت‌های مختلف گلوکز اختلاف

Archive of SID

www.SID.ir

**جدول۱**- اثر غلظت‌های مختلف گلوکز در محیط کشت بلوغ، بر روی میزان بلوغ تخمک کومولوس‌دار گاوی، لقاح و تکوین رویانی اولیه آن‌ها در شرایط آزمایشگاه *

| غلظت گلوکز (mg/l) | فراوانی اووسیت‌های بلوغ یافته به مرحله متافاز دو | | | فراوانی اووسیت‌های لقاح یافته | | | فراوانی بلاستوسیست‌ها، در روز هشتم بعد از لقاح | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | تعدادنمونه | موارد‌مثبت | درصد | تعدادنمونه | موارد‌مثبت | درصد | تعدادنمونه | موارد‌مثبت | درصد |
| ۰ | ۹۵ | ۵۲ [a] | ۵۵ | ۹۲ | ٤۵ [a] | ٤۹ | ۹۳ | ۱۳ [a] | ۱٤ |
| ۱ | ۱۰۱ | ۸۳ [b] | ۸۲ | ۹۹ | ۵٦ [a] | ۵۷ | ۹۷ | ۲۹ [b] | ۳۰ |
| ۱/۵ | ۹۹ | ۷۸ [b] | ۷۹ | ۹٦ | ۵۲ [a] | ۵٤ | ۱۰۰ | ۳۳ [b] | ۳۳ |
| ۳ | ۹۹ | ۷۹ [b] | ۸۰ | ۱۰۰ | ۵۰ [a] | ۵۰ | ۹۹ | ۳۲ [b] | ۳۲ |

* داده‌ها از ٦ بار تکرار آزمایش جمع‌آوری شده‌اند.

[a,b] در هر ستون، اعداد با نشانه‌های مختلف، اختلاف معناداری با گروه کنترل (یا مقدار صفر) دارند (از راست به چپ درستون۲: (P<۰/۰۰۱) درستون ۳،(P<۰/۰۵ ) ستون ٤ ، (P<۰/۰۱).

معناداری وجود نداشت. همچنین میزان گسترش کومولوس در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه مورد به‌مراتب بیشتر بوده است. بین میزان لقاح تخمک‌های گروه‌های تجربی (به‌ترتیب ۵۷، ٥٤ و ۵۰ درصد) در مقایسه با گروه کنترل (٤۹درصد) اختلاف معناداری وجود نداشت. همچنین میزان تشکیل بلاستوسیست در گروه‌های تجربی (به‌ترتیب ۳۰، ۳۳ و ۳۲ درصد) بیشتر از گروه کنترل (۱٤درصد) بوده است و آزمون نشان داد که این اختلاف به لحاظ آماری معنادار می‌باشد (P<۰/۰۱). بین میزان تشکیل بلاستوسیست در گروه‌های تجربی با غلظت‌های مختلف گلوکز اختلاف معناداری وجود نداشت.

تعداد کل تخمک‌ها ۱۱۷۰ عدد (۳۹٤ تخمک در ستون ۲ برای بررسی میزان بلوغ، ۳۸۷ تخمک در ستون ۳ برای بررسی میزان لقاح و ۳۸۹ تخمک در ستون ٤ برای تکوین بیشتر) بودند.

## بحث

یافته‌های این تحقیق نشان داد که افزودن گلوکز به محیط کشت بلوغ اووسیت گاوی، در مقایسه با کنترل به‌طور معناداری سبب بلوغ اووسیت نابالغ می‌شود (P<۰/۰۰۱) و نتایج گزارشات قبلی در این زمینه را تأیید می‌کند (۲٦ و۲۷).

گرچه درصد بلوغ اووسیت‌ها در مطالعه حاضر (جدول۱) به‌مراتب بیشتر از درصد اووسیت‌های بلوغ‌یافته در نتایج گزارش‌شده توسط Hashimoto و همکارانش در سال۲۰۰۰ بوده است که این تفاوت می‌تواند ناشی از ترکیبات محیط کشت بلوغ و شرایط کشت باشد، بلکه مشابه نتایج آن‌ها با افزایش غلظت گلوکز در محیط بلوغ، درصد بلوغ اووسیت کاهش داشته است (۸۰ درصد با ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مقابل ۸۲درصد با ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). بنابراین نتایج نشان می‌دهد که غلظت پائین گلوکز (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) شرایط کشت مطلوب را

Archive of SID

www.SID.ir

برای تکامل رویان فراهم می‌کند اما افزایش غلظت گلوکز باعث افزایش درصد بلوغ اووسیت نمی‌گردد. مطالعات در این زمینه نشان داده است که غلظت پائین گلوکز در طول کشت جنین‌های گاوی سودمند است اما غلظت بالای گلوکز در محیط کشت، تکامل رویانی اولیه در شرایط آزمایشگاه را مهار می‌کند و تأثیرات معکوس روی تکامل بعدی جنین دارد. پیشنهاد شده است این تأثیرات ممکن است مربوط به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش ذخیره داخل سلولی گلوتاتیون باشد (۲۰، ۲۲، ۲۷ و ۲۸).

تحقیقات نشان داده است که سلول‌های کومولوس در استفاده از سوبستراهای انرژی (مانند گلوکز) در طول بلوغ آزمایشگاهی اووسیت نقش مهم و کلیدی را بازی می‌کنند، به‌طوری‌که در فقدان این سلول‌ها، اووسیت‌های نابالغ پستانداران به‌علت نقص در انتقال گلوکز سطح بسیار پایینی از جذب، فعالیت گلیکولیتیک و اکسیداسیون گلوکز را از خود نشان می‌دهند (۲۲ و ۲۶). از طرفی گسترش مطلوب توده کومولوس برای اوولاسیون طبیعی و نیز لقاح بعدی ضروری به‌نظر می‌رسد (۱).

مطالعات نشان داده است که اسید هیالورونیک عامل اصلی گسترش کومولوس است (۱۱). گلوکز، گلوتامین و هگزوزآمین‌ها از سوبستراهای اصلی سنتز اسید هیالورونیک هستند، به‌طوری که ناکافی بودن سوبستراها برای سنتز اسید هیالورونیک (مانند گلوکز) در محیط کشت بلوغ منجر به اختلال در تکمیل بلوغ هسته‌ای (۲۷)، گسترش اووسیت و تکوین بلاستوسیست می‌شود (۱۰)؛ لذا پیشنهاد می‌شود با توجه به این‌که یکی از ترکیبات موجود در محیط کشت بلوغ تحقیق ما مشابه تحقیقات گذشته (۲۰ و ۲۸) ال-گلوتامین بوده است، این ماده یک پیش‌ساز متابولیک برای سنتز هگزوز آمین‌ها است و افزودن آن به محیط کشت باعث بهبود گسترش سلول‌های کومولوس توده کومولوس– اووسیت می‌گردد، همراه با گلوکز اضافه شده به محیط کشت بلوغ اسید هیالورونیک را می‌سازند. اسید هیالورونیک باعث گسترش سلول‌های کومولوس شده و سلول‌های کومولوس که در طول بلوغ آزمایشگاهی نقش مهمی در جذب گلوکز دارند، گلوکز موجود در محیط را جذب نموده و به پیرووات تبدیل می‌کند (۲۹).

همچنین نقش اصلی گلوکز در طول بلوغ اووسیت به‌خصوص در مراحل آغازین بلوغ آزمایشگاهی اووسیت، تولید TP و اسیدکربوکسیلیک از طریق گلیکولیز است (۱۱).

افزودن گلوکز به محیط کشت، گلیکولیز اووسیت را افزایش می‌دهد و بالارفتن میزان گلیکولیز در اووسیت‌های بلوغ یافته در شرایط آزمایشگاه، قدرت تکوینی اووسیت را بالا می برد(۲۶). به‌علاوه مجموعه کومولوس- اووسیت علاوه بر را ه گلیکولیز، از راه پنتوز فسفات گلوکز را متابولیزه می‌کند و به نظر می‌رسد متابولیت‌های گلوکز ضمن تولید انرژی، در تنظیم بلوغ میوزی اووسیت و نیزدر سنتز نوکلئوپورین ها چهت تنظیم بلوغ هسته‌ای اووسیت شرکت می‌کنند (۱۰ و ۲۶) و بنابه اظهارات Sutton و همکارانش (۳۰)، غلظت گلوکز در طول بلوغ مجموعه اووسیت– کومولوس روی چندین عمل شامل پیشرفت میوزدر اووسیت، قابلیت تکوینی اووسیت و گسترش کومولوس تأثیر می‌گذارد.

گرچه در مطالعه حاضر حضور ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گلوکز یا بیشتر در محیط کشت بلوغ اووسیت گاوی در مقایسه با کنترل روی لقاح تأثیر معناداری

Archive of SID

www.SID.ir

نداشت، اما به‌طور معناداری سبب تکوین رویانی بعدی تا مرحله بلاستوسیست شده است (P<۰/۰۱). نتایج ما از نظر میزان لقاح با نتایج گزارش Hashimoto و همکارانش (۲۷) تفاوت داشته است که این تفاوت ممکن است ناشی از محیط کشت لقاح و کیفیت اسپرم باشد، اما از نظر میزان بلاستوسیست با مطالعات قبلی در این زمینه مطابقت داشته است (۱۰، ۲٦ و ۲۷) و با نتایج تحقیق Iwata و همکارانش (۲۰) که گزارش کردند غلظت ٤/٥ میلی‌مول گلوکز در محیط کشت بلوغی، تکوین رویانی به مرحله بلاستوسیست را در مقایسه با کنترل به‌طور معناداری مهار می‌کند اما اختلاف معناداری بین غلظت ۱/٥ میلی‌مول گلوکز با گروه کنترل روی تکوین رویانی وجود ندارد، مغایرت داشته است زیرا همان‌طوری که این محققین اظهار داشته‌اند آن‌ها در ترکیب محیط کشت بلوغی خود از FCS ۱۰٪ استفاده کرده‌اند که حاوی ۰/۰٥ میلی‌گرم گلوکز بوده است و در گروه‌های مورد و شاهد وجود داشت. لذا ما در این تحقیق برای رفع این مشکل به‌جای FCS ازPVP استفاده کردیم. به‌نظر می‌رسد با توجه به متغیر بودن متابولیسم گلوکز تأثیر آن در مراحل اولیه تکوین رویانی چندان محسوس نباشد اما با پیشرفت تکوین اثرات خود را بیشتر نشان خواهد داد.

در مطالعات انجام‌شده روی مرحله پیش از لانه گزینی رویان موش نشان‌داده‌شد که تغییرات مهمی در متابولیسم انرژی در طول کلیواژ روی می‌دهد. مهم‌ترین این تغییرات در ارتباط با استفاده از گلوکز است. برای مثال رویان دو سلولی موش نمی‌تواند از هر دو سوبسترا (گلوکز و پیرووات) استفاده کند بلکه تنها می‌تواند از پیرووات استفاده کند اما بر خلاف آن رویان هشت سلولی موش می‌تواند از هر دو سوبسترا استفاده کند. علت این سوبسترای انرژی منحصر به فرد مربوط به فعالیت گلیکولیتیک پایین و توقف یکی از آنزیم‌ها مانند ٦- فسفات- فروکتوکیناز است (٦). Iwata و همکارانش در سال ۱۹۹۸ گزارش کرده‌اند که متابولیسم گلوکز در سراسر تکوین رویانی متغیر است، به‌طوری‌که در مراحل اولیه تکوین رویان گاوی با حضور درصد کم گلوکز در محیط کشت بلوغ، متابولیسم گلوکز در مقایسه با مورولا یا بلاستوسیست پایین است. اما حضور غلظت بالای گلوکز (٤/٥میلی‌مول) در محیط کشت بلوغ، تکوین رویانی از مرحله ٤ سلولی به مرحله بلاستوسیست را مهار می‌کند (۲۰).

مطالعات متعددی نشان داده است که گلوکز زیادی در محیط کشت بلوغ در تکوین اووسیت‌های هامستر (۱٦ و ۳۱)، گاو(۲۰-۱۸) و موش (۱۷، ۲۰ و ۳۲) به مرحله بلاستوسیست اختلال ایجاد می‌کند که این امر می‌تواند احتمالاً به‌علت افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش گلوتاتیون داخل سلولی موجود در اووسیت باشد، زیرا رادیکال‌های آزاد اکسیژن بیشتری در شرایط کشت آزمایشگاهی نسبت به شرایط کشت داخل بدن تولید می‌شود که این امر می‌تواند مربوط به زیر حد مطلوب بودن فشار اکسیژن باشد(۲۰ و ۲۸). اکسیژن برای ادامه حیات نیاز است اما متابولیت‌هایش نظیر انواع اکسیژن‌های فعال ((Reactive oxygen Species (ROS) می‌تواند عمل سلول را تغییر دهد و یا برای حیات سلول خطرساز باشد. بنابراین به‌منظور حفظ عمل طبیعی سلول، ROS اضافی باید به‌طور دایم غیرفعال شود که این عمل به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌های موجود در سلول رخ می‌دهد. آنیون سوپراکسید (O2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و پروکسید هیدروژن (H2O2) از انواع اکسیداتیو

Archive of SID

www.SID.ir

اصلی هستند (۲۸ و ۳۳). رادیکال‌های آزاد اکیسژن تولیدشده در شرایط آزمایشگاه با پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA سلول واکنش نشان می‌دهند و منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌ها، پراکسیداسیون غشای لیپیدی و تغییرات DNA می‌شود. غلظت بالای هیدروکسید اکسیژن سبب پراکسیداسیون لیپید می‌شود و منجر به مرگ سلول می‌شود. همچنین شواهدی وجود دارد که تولید رادیکال‌های آزاد به‌وسیله اتواکسیداسیون گلوکز در شرایط فیزیولوژیکی ایجاد می‌شود که به نوبه خود تکثیر سلولی را طولانی می‌کند یا تغییرات بیوشیمیایی ایجاد می‌کند که عمل سلول را تغییر می‌دهد یا سبب مرگ سلولی در محیط آزمایشگاه می‌شود (۲۰ و ۲۸).

## نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق نشان داد که حضور گلوکز در محیط کشت بلوغ برای بلوغ اووسیت کومولوس‌دار گاوی و تکامل رویانی بعدی اثر مثبت دارد. به‌طوری‌که غلظت پایین گلوکز (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نه‌تنها برای بلوغ اووسیت گاوی مؤثر است بلکه برای تکوین بعدی رویان مفید می‌باشد اما افزایش غلظت گلوکز باعث افزایش درصد بلوغ اووسیت نمی‌گردد.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله محققان مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاری آقایان احمدکمال عبدالجلیل و جین ته‌چونگ اعلام می دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

# Abstract:

## *Effect of Various Concentrations of Glucose on Bovine Cumulus–Oocyte Complexes Maturation, Fertilization and Early Embryonic Development in Vitro*

---

***Rezaei, N.[1]; Hashemi, S.M.B[2]; Golalipour, MJ.[3]; Chian, R.C.[4]***

*1. Associate professor, Department of Anatomy, Mazandaran University of medical sciences, Iran.*

*2. Assistant professor, Department of Biochemistry & Genetics, Mazandaran University of medical sciences, Iran.*

*3. Associate professor, Department of Anatomy, Gorgan University of medical sciences, Iran.*

*4. Associate professor, Department of Gynecology, McGill University, Canada.*

---

***Background & Objectives****: Different energy substrates and nutrients can greatly influence oocyte nuclear and cytoplasmic maturation. Effect of glucose on in-vitro oocyte maturation and subsequent early embryonic development is controversial. The objective of the present study was to verify the effect of various concentrations of glucose on cumulus-oocyte complexes maturation, fertilization and early embryonic development using a bovine model.*

***Materials & Methods****: Ovaries were collected from the local abattoir and brought into laboratory. Cumulus-oocyte complexes (n=1170) were aspirated from follicles, randomly divided into 4 groups (3 treatment/experimental & 1 control), and cultured in an organ culture dish containing 1 ml maturation medium, in treatment groups, chemically defined medium, supplemented with 1.0, 1.5 or 3.0 mg/ml D-glucose respectively, at 38.5 degrees on the Celsius scales in an atmosphere of 5% CO2 and 95% air with high humidity for 24 hours. Following maturation, 394 oocytes were fixed randomly for 24h, for maturation rates; and 776 oocytes were inseminated with frozen-thawed bull semen for fertilization rates and early embryonic development, 387 oocytes (presumptive zygotes) fixed randomly for fertilization rates, and 389 oocytes (presumptive zygotes) were cultured for development with similar medium to blastocyst stage (day 8). The samples were examined by streomicroscope and the results were analysed by $X^2$ test.*

***Results****: The oocytes maturation rates were higher (P<0.001) in the medium contained glucose compared to the control group (82%, 79% and 80% vs. 55% respectively). Although fertilization rates of oocytes were not different among groups, (57%, 54% and 50% vs. 49% respectively), the rates of blastocyst formation in the treatment group were significantly higher (p<0.01) than the control (30%, 33% and 32% vs.14%).*

***Conclusion:*** *These results confirm that the presence of glucose, in the maturation medium, is important for oocyte maturation and the subsequent embryonic development.*

***Keywords****: Bovine Oocyte, In Vitro Maturation, Glucose, Fertilization.*

Archive of SID

www.SID.ir

## منابع

1. Furnus CC, Matos DG, De Martinez AG, Matkovic M. Effect of glucose on embryo quality and post-thaw viability of in-vitro-produced bovine embryos. Theriogenology 1997; 47:481-90

2. Dows SM, Hudson GD. Energy substrates and the completion of spontaneous meiotic maturation. Zygote 2000; 8:339-51

3. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. Rproduction 2004; 128(3):313-19

4. Kim JH, Funahashi H, Niwa K, Okuda K. Glucose requirements at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi–defined medium. Theriogenology 1993; 39:875-86

5. Rieger D, Loskutoff NM. Changes in the metabolism of glucose, Pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. J Reprode Fertil 1994; 100:257-62

6. Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. J Reprod Fertil 1984; 72(1):9-13

7. Gwatkin and Haidri. Requirements for the maturation of hamster oocytes in vitro. Exp Cell Res 1973; 76(1):1-7

8. Bae IH, Foote RH. Utilization of glutamine for energy and protein synthesis by cultured rabbit follicular oocytes. Exp Cell Res 1975; 90(2):432-6

9. Downs SM, Verhoeven A. Glutamine and the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes: influence of culture medium, glucose, and cumulus cells. Mol Reprod Dev 2003; 66(1):90-7

10. Rose-Hellekant TA, Libersky-Williamson EA, Bavister BD. Energy substrates and amino acids provided during in vitro maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. Zygote 1998; 60:285-294

11. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. Hum Reprod Uptake 2003; 9(1):35-47

12. Leese HJ, Barton AM. Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. J Exp Zool 1985; 234(2):231-5

Archive of SID

www.SID.ir

13. Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. Biol Reprod 2000; 63(6):1730-4

14. Zheng P, Bavister BD, Ji W. Energy substrate requirement for in vitro maturation of oocytes from unstimulated adult rhesus monkeys. Mol Reprod Dev 2001; 58(3):348-55

15. de Matos D, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of bovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. Theriogenology 2002; 57:1443-51

16. Barnett DK, Bavister BD. Inhibitory effects of glucose and phosphate on the second cleavage division of hamster embryos is it linked to metabolism? Hum Reprod 1996; 11:177-83

17. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. J Reprod Fertil 1989; 86(2):679-88

18. Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryo: influence of glucose, lactate, pyruvate, aminoacids and vitamins. Thriogenology 1992; 37:963-78

19. Donnini D, Zambite AM, Perrella G, Ambesi-Impiombateo FS, Curcio F. Glucose may induce cell death through a free radical-mediated mechanism. Biochem Biophys Res Commun 1996; 219:412-17

20. Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. Theriogenology 1998; 50:365-75

21. Cekleniak NA, Combelles CM, Ganz DA, Fung J, Albertini DF, Racowsky C. A novel system for in vitro maturation of human oocytes. Fertil Steril 2001; 75(6):1185-93

22. Saito T, Hiroi M, Kato T. Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice. Biol Reprod 1994; 50:266-70

23. Lim Jm, Lee BC, Lee EC, Chung HM, Koj J, Paik SE, et al. In vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein free medium: effects of carbohydrates and amino acids. Reprod Fertil Dev 1999; 11(2):127-32

24. Chian RC, Chung J, Downey BR, Tan SL. Maturational and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. Reprod Biomed Online 2002; 4(2):129-34

25. Rezaei N, Chian RC. Effects of essential and non-essential amino acids on in vitro maturation, fertilization and development of immature bovine oocytes. Iran J Reprod Med 2005; 3(1):36-41

Archive of SID

www.SID.ir

26. Krisher RL, Bavister BD. Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes in vitro is associated with increased developmental competence. Mol Reprod Dev 1999; 53(1):19-26

27. Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. Mol Reprod Dev 2000; 56:520-26

28. Iwata H, Hashimoto S, Ohota M, Kimura K, Shibano K, Miyake M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. Reprod 2004; 127:159-64

29. Gandolfi F, Milanesi E, Pocar P, Luciano AM, Brevini TAL, Acocella F, et al. Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation . Mol Reprod Dev 1998; 49:168-75

30. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG: Effect of hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear maturation during in vitro maturation in a synthetic follicle fluid medium. Rprod Fertil Dev 2005; 17(4):407-15

31. McKiernan SH, Bavister BD, Tasca RJ.Energy substrate requirements for in-vitro development of hamster 1- and 2-cell embryos to the blastocyst stage. Hum Reprod 1991; 6(1):64-75

32. Downs SM, Humpherson PG, Martin KL, Leese HJ. Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in cumulus-enclosed mouse oocytes. Mol Reprod Dev 1996; 44:121-31

33. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril 2000; 79:829-43

Archive of SID

www.SID.ir