Archive of SID

فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال سیزدهم، شماره ۳، صفحه ۱۶۲ - ۱۵۱ (پاییز ۱۳۸۹)

اثر اسیدآسکوربیک بر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 و تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان‌های انجمادی و غیرانجمادی در محیط کشت

طاهره مازوچی[1*]، طاهره خامه‌چیان[1]، سید غلامعباس موسوی[2]

[1] مرکز تحقیقات علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
[2] گروه آمار و بهداشت عمومی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی کاشان

چکیده

زمینه: این مطالعه جهت ارزیابی اثر اسیدآسکوربیک بر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 و تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان انجماد شیشه‌ای و غیر انجمادی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق یکی از دو تخمدان ۴۰ موش سوری ماده به روش انجماد شیشه‌ای منجمد شد. فولیکول‌های پره‌آنترال به روش مکانیکی از تخمدان‌های انجمادی و غیرانجمادی جدا و به‌مدت ۱۰ روز در محیط α-MEM و در ۴ گروه کشت، شامل غیرانجمادی و محیط کشت فاقد اسیدآسکوربیک (NVNA)، غیرانجمادی و حاوی اسیدآسکوربیک (NVA)، انجمادی و فاقد اسیدآسکوربیک (VNA) و انجمادی و حاوی اسیدآسکوربیک (VA)، از نظر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2، میزان بقا، قطر فولیکول‌ها و تشکیل حفره آنتروم مقایسه شدند.

یافته‌ها: قطر فولیکول‌ها در روز دوم در گروه‌های NVNA، NVA، VNA و VA به ترتیب ۱۵۸/۵±۷/۲، ۱۶۱/۹±۹/۶، ۱۵۱/۷±۶/۴ و ۱۵۶/۹±۷/۶ و در روز چهارم به‌ترتیب ۲۱۳/۱±۱۱/۸، ۲۱۸/۸±۸/۵، ۲۰۲/۹±۶/۲ و ۲۱۵/۹±۹/۲ میکرومتر بود. قطر فولیکول‌ها در روز دوم و چهارم در گروه NVA و NVNA به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه VNA بود (به‌ترتیب p=۰/۰۱۱ و p=۰/۰۰۱). در گروه انجمادی اسیدآسکوربیک قطر فولیکولی را در روز چهارم کشت افزایش داد (p=۰/۰۰۱). بیان نیمه‌کمی ژن Bax در گروه NVA نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری کمتر بود (p=۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: اسیدآسکوربیک در گروه غیرانجمادی تأثیری بر روی رشد، بقا و تشکیل حفره آنتروم در شرایط *in vitro* نداشت. اما سبب کاهش بیان ژن Bax در گروه غیرانجمادی و بهبود رشد فولیکول‌ها پس از انجماد شیشه‌ای تخمدان شد.

واژگان کلیدی: اسیدآسکوربیک، انجماد شیشه‌ای، فولیکول‌های پره‌آنترال، ژن Bax، ژن Bcl-2

دریافت مقاله: ۸۸/۸/۲- پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۲۱

*مرکز تحقیقات علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران، کدپستی: ۸۸۱۴۱-۸۷۱۵۹

Email:mazoochi45@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کشت فولیکول‌های جداشده از تخمدان روش مفیدی است که برای مطالعه فرآیند تکوین فولیکول‌ها، اثرات سمی و تراتوژنیک ترکیبات و یا داروهای جدید بر روی رشد فولیکول استفاده می‌شود (۱). همچنین از کشت فولیکول‌های نابالغ برای بررسی اثرات انجماد بر تخمدان و در بالین برای بدست آوردن تخمک‌های بالغ بعد از انجماد تخمدان استفاده می‌شود. همراهی فن‌آوری انجماد بافت تخمدانی و بلوغ تخمک‌ها در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) می‌تواند روش مناسبی برای حفظ باروری در بیماران جوان مبتلا به سرطان باشد؛ قبل از اینکه رادیودرمانی یا شیمی‌درمانی، ذخیره تخمدانی آنها را تخریب نماید (۴-۲).

روش‌های کشت مختلفی به منظور رشد فولیکول‌ها، تولید اووسیت‌های کاملاً صلاحیت‌دار با قدرت باروری، پایه‌ریزی شده است. آنچه که در همه شیوه‌های کشت مشابه است، وجود منبع غذایی، الکترولیت‌ها، اسیدهای آمینه و سایر عوامل ضروری برای رشد فولیکول‌ها و دیگری حذف همه تولیدات زائد مانند آمونیاک است که ممکن است تجمع پیدا کرده و برای رشد فولیکول‌ها مضر باشد (۵). در شیوه‌های کشت مختلف مرحله رشد فولیکولی، روش جداسازی فولیکول‌ها، ترکیب محیط کشت و همچنین شرایط کشت فولیکول متفاوت می‌باشد.

در این نوع مطالعات انتخاب مرحله بلوغ فولیکول مهم می‌باشد. چراکه علی‌رغم اینکه تخمدان دارای مجموعه‌ای از فولیکول‌ها در مراحل مختلف رشد می‌باشد، انتخاب مرحله‌ای از رشد که بتواند در *in vitro* به‌خوبی تکوین یافته و بالغ شود حائز اهمیت می‌باشد. فولیکول‌های بدوی اگرچه بیش از ۹۰ درصد از جمعیت فولیکول‌ها را تشکیل می‌دهند، اما کشت آنها در *in vitro* با مشکل روبرو است. درصورتی‌که کشت فولیکول‌های پره‌آنترال با موفقیت انجام شده است (۶).

فولیکول‌هایی که به روش مکانیکی یا آنزیمی از تخمدان جدا شده‌اند، می‌توانند به روش کروی و یا غیرکروی کشت داده شوند. اگرچه در روش کشت غیرکروی فولیکول پس از رشد ساختار سه‌بعدی خود را از دست می‌دهد اما فولیکول‌های آنترال حاصل، عملکرد تمام اجزاء خود یعنی سلول‌های تکا، گرانولوزا و اووسیت را حفظ می‌کنند و تکامل فولیکول شبیه به شرایط محیط زنده (*in vivo*) است. در این روش لایه سلول‌های تکای اطراف غشا پایه که ممکن است سدی برای رسیدن اکسیژن و مواد غذایی موجود در محیط کشت به سلول‌های گرانولوزا باشد، فولیکول را به کف ظرف کشت می‌چسباند و سلول‌های گرانولوزا غشا پایه را پاره کرده از سلول‌های تکا بیرون می‌زنند و بدین ترتیب دسترسی تمام اجزا فولیکولی به مواد موجود در محیط کشت زیادتر می‌شود (۷). به‌علاوه در شیوه‌های کشت‌های مختلف، محیطی که استفاده می‌شود و همچنین مکمل-هایی که به آن اضافه می‌شود متفاوت می‌باشد. فولیکول‌های تخمدانی موش عموماً در α-MEM[1] کشت داده می‌شوند که برای انواع سلول‌های با سرعت تقسیم زیاد مناسب است (۸).

در زمینه بهبود شرایط کشت فولیکول‌ها تحقیقاتی انجام شده است. کاهش غلظت رادیکال‌های آزاد در محیط کشت می‌تواند راهی برای بهبود ظرفیت تکوینی فولیکول‌ها و اووسیت‌های کشت شده در

[1] αlpha Modification of Minimal Essential Medium

www.SID.ir

Archive of SID

in vitro و متعاقب آن داشتن جنین‌های با کیفیت بالا باشد. یکی از روش‌های مقابله با رادیکال‌های آزاد آنتی‌اکسیدان‌ها مانند اسیدآسکوربیک می‌باشد (۱۱-۹). بیشتر مطالعات به نقش اسیدآسکوربیک در تشکیل و پسروی جسم زرد پرداخته‌اند و مطالعات کمی در رابطه با عملکرد آن در رشد فولیکولی و میزان بقاء در طول کشت وجود دارد.

نتایج مطالعه‌ای نشان داد اضافه کردن اسیدآسکوربیک به محیط کشت فاقد سرم توانست به‌طور معنی‌داری سبب کاهش آپوپتوز شود اما در محیط حاوی سرم بر رشد فولیکولی و تولید استرادیول مؤثر نبود (۱۲). در مطالعه دیگری در محیط فاقد سرم درصد فولیکول‌های دست نخورده با اضافه کردن اسیدآسکوربیک بیشتر شد. در این روش کشت ارتباط منفی بین درصد رشد فولیکولی و فولیکول‌هایی که دست نخورده باقی می‌مانند وجود داشت (۱۳). اسیدآسکوربیک در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سبب کاهش آپوپتوز در فولیکول‌های بدوی جدا شده از تخمدان‌های تازه و انجمادی که به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت کشت شده بودند شد، اما این کاهش معنی‌دار نبود. همچنین این دوز اسیدآسکوربیک آپوپتوز را در سلول‌های استرومایی تخمدان‌های تازه و انجمادی اینکوبه شده به مدت ۲۴ ساعت کاهش داد اما بعد از ۴۸ ساعت این کاهش معنی‌دار نبود (۱۴). به‌نظر می‌رسد این دوز اسیدآسکوربیک برای کشت فولیکول‌های تخمدانی کافی نباشد.

درگیری چندین ژن پرو و آنتی‌آپوپتوزی مانند Bax و Bcl-2 در بقاء فولیکول‌های تخمدانی ثابت شده است (۱۷-۱۵).Bcl-2 یک پروتئین مهارکننده‌ی آپوپتوز است که در غشاءِ هسته و میتوکندری قرار دارد. بیان آن در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی مشاهده شده است (۱۵ و ۱۶). Bax پروتئین القاءکننده‌ی آپوپتوز است که مانع تمامیت میتوکندری شده و سبب تورم و پاره شدن غشاء خارجی آن و آزاد شدن سیتوکروم C از غشاء داخلی میتوکندری به سیتوزول می‌شود. Bax عمدتاً عمل پروآپوپتوزی خود را از طریق دایمر شدن با Bcl-2 اعمال می‌کند (۱۷). هدف از این مطالعه ارزیابی اثر غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسیدآسکوربیک بر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 و تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال جداشده از تخمدان انجماد شیشه‌ای و غیرانجمادی در محیط کشت بود.

مواد و روش‌کار

تهیه بافت تخمدان انجمادی و غیرانجمادی

تحقیق به روش تجربی بر روی ۳۰ سر موش سوری ماده با سن تقریبی ۶-۴ هفته نژاد NMRI انجام گرفت. موش‌ها به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند. تخمدان‌ها به‌طور تصادفی در دو گروه انجمادی (V) و غیرانجمادی (NV) قرار گرفتند. در گروه انجمادی از روش انجماد شیشه‌ای استفاده شد (۱۸). به‌طور خلاصه تخمدان‌ها پس از برداشتن بافت‌های اطراف در محلول انجمادی حاوی ۴۰ درصد اتیلن‌گلیکول، ۳۰ درصد فایکول ۷۰ و نیم مول ساکاروز (EGFS40) به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس به‌مدت یک هفته در نیتروژن مایع ذخیره و ذوب سریع انجام شد. جهت ذوب از غلظت‌های نزولی ساکاروز استفاده شد.

جداسازی فولیکول‌ها

از تخمدان‌های گروه انجمادی و غیرانجمادی به روش مکانیکی و با استفاده از نوک سوزن ۲۹G سرنگ انسولین

www.SID.ir

Archive of SID

زیر بزرگنمایی ۲۵ استریومیکروسکوپ (Olympus, Japon)، فولیکول‌های پره‌آنترال با قطر ۱۴۰-۱۲۰ میکرون جدا شدند. فولیکول‌هایی انتخاب شدند که دارای تخمک مرکزی با ۳-۲ لایه سلول گرانولوزا در اطراف بودند. در محیط این فولیکول‌ها سلول‌های تکا و غشا پایه سلول‌های گرانولوزا قرار داشتند.

کشت فولیکول‌ها

جهت کشت فولیکول‌ها از محیط کشت α-MEM (Gibco, UK) حاوی ۵ درصد FBS ، ۱۰۰ میلی واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر rFSH (Serono, Switzerland)، ITS یک درصد (Gibco, UK)، ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر mrEGF (Sigma, Germany)، ۱۰۰ میلی‌واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین استفاده شد. هر فولیکول به‌طور جداگانه در قطره‌های ۲۰ میکرولیتری از محیط کشت به مدت ۱۰ روز زیر روغن، در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و رطوبت کشت داده شد. نیمی از محیط کشت یک روز در میان با محیط کشت تازه تعویض می‌شد. جهت بررسی اثر اسیدآسکوربیک بر روی رشد و بلوغ فولیکول‌ها، به‌طور تصادفی تعدادی از فولیکول‌های جداشده از هر گروه V و NV در محیط کشتی که ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسیدآسکوربیک (Sigma, A4544) اضافه شده بود، کشت داده شدند.

گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه شامل فولیکول‌های جدا شده از تخمدان انجمادی و کشت‌شده در محیط حاوی اسیدآسکوربیک (VA)، فولیکول‌های جدا شده از تخمدان انجمادی و کشت فاقد اسیدآسکوربیک (VNA)، فولیکول‌های جدا شده از تخمدان غیرانجمادی و کشت شده در محیط حاوی اسیدآسکوربیک (NVA)، فولیکول‌های جدا شده از تخمدان غیرانجمادی و کشت فاقد اسیدآسکوربیک (NVNA) بودند.

ارزیابی رشد و بقای فولیکول‌ها در طول کشت

ازآنجا که در این مطالعه فولیکول‌ها به روش غیرکروی کشت داده شدند، تنها تا روز چهارم کشت امکان ارزیابی قطر فولیکول‌ها وجود داشت. بدین‌ترتیب قطر کامل فولیکول‌ها در روزهای ۲ و ۴ کشت با استفاده از میکرومتر مدرج میکروسکوپ معکوس (Olympus, Japon) و با تعیین میانگین دو قطر عمودی محاسبه شد. میزان بقای فولیکول‌ها در میانه و انتهای کشت یعنی روزهای ۵ و ۱۰ کشت در چهار گروه بررسی شد. از دست دادن اووسیت، تیره رنگ شدن فولیکول و توقف رشد به‌عنوان فولیکول غیر زنده در نظر گرفته شد. همچنین در پایان دوره کشت تشکیل حفره آنتروم زیر میکروسکوپ ارزیابی شد.

بررسی بیان Bax و Bcl-2 به روش RT-PCR نیمه کمی

بیان ژن آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 و پروآپوپتوزی Bax در میانه کشت یعنی روز پنجم در فولیکول‌های چهار گروه (VA، VNA، NVA و NVNA) به روش RT-PCR نیمه‌کمی[2] انجام شد. ابتدا استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasy Minikit (Qiagen, USA Cat. No.74104) و مطابق با دستورالعمل آن انجام شد. RNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی با دو روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. پس از اطمینان از خلوص RNA، ساخت cDNA از روی آن به‌وسیله کیت (Fermentas, Lot: 00014995) و بر اساس دستورالعمل آن انجام گرفت. cDNA حاصل روی یخ

[2] Semi- quantitative Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction

www.SID.ir

Archive of SID

قرار داده شد و تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این پژوهش جهت انجام واکنش PCR از کیت(Taq DNA Polymerase Roche Germany; Cat. No. 1 596 594) استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده ژن Bax و Bcl-2 و اندازه و شماره دست‌یابی آنها در Genbank به این ترتیب است:

- [F:5′CGGCGAATTGGAGATGAACTG 3′,R5′GCAAAGTAGAAGAGGGCAAC C 3′ (NM 007527: 160bp)]
- [F:5′ ACCGTCGTGACTTCGCAGAG 3′R5′GGTGTGCAGATGCCGGTTCA 3′ (NM 00177410: 240bp)]

همچنین از ژن بتا- دومیکروگلوبولین(β2m)[3] به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. شرایط PCR به این‌صورت بود که دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، Annealing در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، امتداد رشته دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵۰ ثانیه و امتداد نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصول به‌دست آمده با ژل آگاروز ۱/۵ درصد انجام شد. جهت مشخص نمودن محل باندهای ظاهر شده بر روی ژل از ladder (100bp, Fermentas, Lot: 00014815) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به‌دست آمده با استفاده از نسخه ۱۳ نرم‌افزار SPSS (Inc, Chicago, IL SPSS) و با استفاده از آزمون‌های کولموگوروف-اسمیرنوف[4]، تحلیل واریانس یک‌سویه و سپس آزمون Tukey، کروسکال والیس[5] وسپس من-ویتنی[6] و کای‌دو تجزیه و تحلیل شد. P کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد. جهت مقایسه نیمه‌کمی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 پس از اسکن ژل‌ها، شدت هر باند با استفاده از نرم‌افزار Utivec (Total Lab, UK) نسخه ۱۰ محاسبه گردید. واکنشRT-PCR با شرایط یکسان حداقل ۳ بار تکرار شد. در نهایت مقدار نسبی بیان هر ژن، به‌وسیله محاسبه میانگین نسبت شدت باند مربوط به آن به شدت باند β2m مربوطه تعیین شد و نتایج با استفاده از آزمون Post-hoc LSD تحت تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

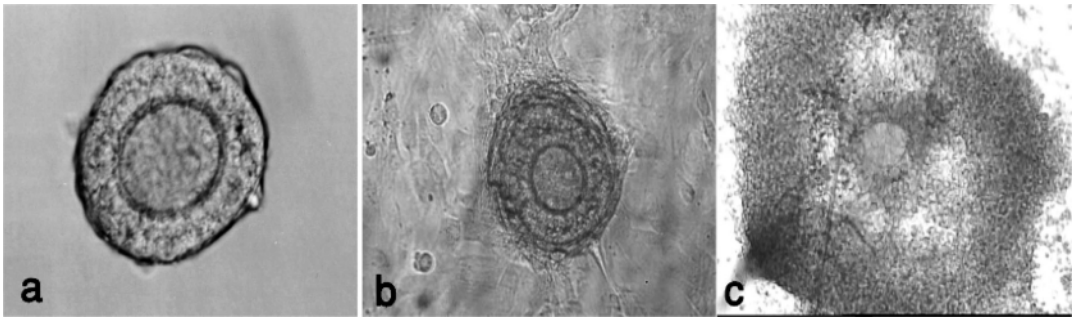
شکل شناسی فولیکول‌ها در روزهای کشت

فولیکول‌های جداشده در مرحله پره‌آنترال حاوی اووسیت در مرحله وزیکول زاینده[7] بودند که به‌وسیله ۳-۲ لایه سلول‌های گرانولوزا درون غشای پایه احاطه شده بودند. اطراف فولیکول به‌وسیله سلول‌های تکای پهن پوشیده شده بود. در روز دوم کشت، فولیکول‌ها در اثر جدا شدن سلول‌های تکا و چسبیدن این سلول‌ها به کف ظرف کشت بی‌حرکت شدند. سلول‌های گرانولوزا پس از تکثیر و پاره‌کردن غشای پایه گرانولوزا، به سمت اطراف فولیکول گسترش پیدا کرده و از روز چهارم به بعد فولیکول شکل نامنظمی نشان داد به‌طوری که باعث شد تغییرات قطر تنها تا روز چهارم کشت قابل بررسی باشد. از روز هشتم به بعد در تعدادی از فولیکول‌ها حفراتی در اطراف تخمک پدید آمد که همانند حفرات آنتروم در فولیکول‌های *in vivo* بود (شکل ۱).

[3] Beta-2 Microglobolin
[4] Kolmogorv-Smirnov Test
[5] Kruskal Wallis
[6] Mann-Whitney
[7] Germinal Vesicle

www.SID.ir

Archive of SID

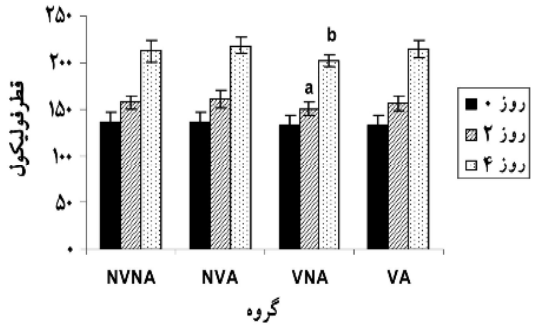


شکل ۱) کشت فولیکول‌های جدا شده از تخمدان انجماد شیشه‌ای و ذوب شده

a: فولیکول پره‌آنترال جداشده به روش مکانیکی از تخمدان انجماد شیشه‌ای شده (بزرگنمایی ۲۰۰×). b: روز دوم کشت در گروه VA، سلول‌های تکا لایه‌ای را در زیر فولیکول ایجاد می‌کنند و فولیکول را به کف می‌چسباند (بزرگنمایی ۱۰۰×). c: روز دهم کشت در گروه VA، حفراتی در اطراف تخمک پدید می‌آید که همانند حفرات آنتروم در شرایط *in vivo* است (بزرگنمایی ۱۰۰×).

قطر فولیکول‌ها در طول کشت

قطر فولیکول‌ها در همه گروه‌ها در روز صفر، دوم و چهارم کشت اندازه‌گیری و مقایسه شد. ازآنجایی‌که فولیکول‌ها از روز چهارم به بعد شکل کروی خود را از دست دادند و ظاهری منتشر نشان دادند، اندازه‌گیری قطر از این روز به بعد امکان‌پذیر نبود. نتایج تغییرات قطر در نمودار ۱ آمده است. چنانکه نتایج نشان می‌دهد قطر فولیکول‌ها در همه گروه‌ها در طول روزهای کشت افزایش پیدا کرد. میانگین قطر فولیکول‌ها در روز صفر در گروه غیرانجمادی ۱۱/۵±۱۳۶/۹ و در گروه انجمادی۱۱/۳±۱۳۳/۲ میکرومتر بود که تفاوت معنی‌داری نداشت. قطر فولیکول‌ها در روز دوم در گروه‌های NVNA، NVA، VNA و VA به‌ترتیب ۷/۲±۱۵۸/۵، ۹/۶±۱۶۱/۹، ۶/۴±۱۵۱/۷ و ۷/۶± ۱۵۶/۹ میکرومتر و در روز چهارم به‌ترتیب ۱۱/۸± ۲۱۳/۱، ۸/۵±۲۱۸/۸، ۶/۲±۲۰۲/۹ و ۹/۲±۲۱۵/۹ میکرومتر بود. مقایسه گروه‌های انجمادی با غیرانجمادی نشان می‌دهد که قطر فولیکول‌ها در روز دوم کشت در گروه غیرانجمادی چه در حضور اسیدآسکوربیک (NVA) و چه در غیاب آن (NVNA) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه انجمادی بدون اسیدآسکوربیک بود (به‌ترتیب p=۰/۰۱۱ و p=۰/۰۰۱).



نمودار۱) میانگین قطر فولیکول‌های پره‌آنترال جداشده از تخمدان انجمادی و غیرانجمادی در محیط کشت حاوی اسید آسکوربیک و فاقد آن

a: اختلاف معنی‌دار با گروه NVNA (p=۰/۰۱۱) و NVA (p=۰/۰۰۱) در همان روز
b: اختلاف معنی‌دار با بقیه گروه‌ها در همان روز (p=۰/۰۰۱)

در روز چهارم کشت هم تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های غیرانجمادی با گروه انجمادی بدون اسیدآسکوربیک مشاهده شد (p=۰/۰۰۱). در هر دو گروه انجمادی و غیرانجمادی مقایسه قطر روز دوم در محیط کشت با و بدون اسیدآسکوربیک نشان می‌دهد که اگرچه قطر فولیکولی در محیط کشت حاوی اسیدآسکوربیک بیشتر از فاقد

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدآسکوربیک بود اما تفاوت معنی‌داری بین NVNA با NVA و VNA با VA مشاهده نشد. درصورتی‌که در روز چهارم کشت قطر فولیکول‌ها در گروه انجمادی با اسیدآسکوربیک بیشتر از گروه انجمادی و بدون اسیدآسکوربیک بود (p=۰/۰۰۱).

میزان بقا فولیکول‌ها در طول کشت

میزان بقا فولیکول‌های کشت شده در چهار گروه در روزهای پنجم و دهم کشت زیر میکروسکوپ معکوس بر اساس شکل‌شناسی فولیکول‌ها تعیین و مقایسه شد. آزاد شدن خودبخودی تخمک از فولیکول و یا تیره شدن فولیکول به‌عنوان فولیکول غیر زنده تلقی شد. در روز پنجم کشت میزان بقا فولیکول‌های کشت شده در گروه‌های NVNA، NVA، VNA و VA به‌ترتیب ۹۱/۷، ۹۳/۴، ۸۳/۰ و ۹۰/۴ درصد و در روز دهم کشت به‌ترتیب ۸۶/۷، ۸۹/۵، ۷۹/۲ و ۸۴/۶ درصد بود (جدول ۱). مقایسه درصد میزان بقا در روزهای پنجم و دهم کشت اختلاف معنی‌داری را در گروه‌های مختلف نشان نداد.

تشکیل حفره آنتروم

در همه گروه‌ها از روز هشتم کشت به بعد بین سلول‌های گرانولوزا حفراتی دیده شد که شبیه حفره آنتروم بود. درصد تشکیل حفره آنتروم در فولیکول‌های زنده در چهار گروه در روز دهم کشت یعنی پایان دوره کشت مقایسه شد. در گروه NVNA از ۵۲ فولیکول زنده در روز دهم کشت ۱۶ فولیکول معادل ۳۰/۸ درصد، در گروه NVA از ۶۸ فولیکول زنده ۲۱ فولیکول معادل ۳۰/۹ درصد، در گروه VNA از ۴۲ فولیکول زنده ۱۰ فولیکول معادل ۲۳/۸ درصد و در گروه VA از ۴۴ فولیکول زنده ۱۱ فولیکول معادل ۲۵/۰ درصد حفره شبه‌آنترال تشکیل دادند. اختلاف بین گروه‌ها از نظر تشکیل حفره آنترال از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول ۱).

جدول۱) تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال جداشده از تخمدان انجمادی و غیرانجمادی در محیط کشت حاوی اسیدآسکوربیک و فاقد آن

گروه‌ها	تعداد فولیکول	فولیکول زنده*		فولیکول با حفره آنتروم**
		روز۵ کشت	روز ۱۰ کشت	
NVNA	۶۰	۵۵ (۹۱/۷)	۵۲ (۸۶/۷)	۱۶ (۳۰/۸)
NVA	۷۶	۷۱(۹۳/۴)	۶۸ (۸۹/۵)	۲۱ (۳۰/۹)
VNA	۵۳	۴۴ (۸۳/۰)	۴۲ (۷۹/۲)	۱۰ (۲۳/۸)
VA	۵۲	۴۷ (۹۰/۴)	۴۴ (۸۴/۶)	۱۱ (۲۵/۰)

*تعداد (٪)

**تعداد (درصد نسبت به فولیکول‌های زنده در روز ۱۰ کشت)

بیان نیمه‌کمی رونوشت Bax و Bcl-2 در گروه‌های مورد بررسی

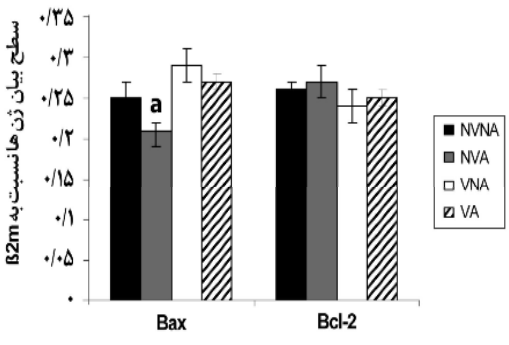
در این مطالعه بیان نیمه‌کمی ژن‌های وابسته به آپوپتوز Bax و Bcl-2 در فولیکول‌های چهار گروه در روز پنجم کشت ارزیابی و مقایسه شد. مشاهده باندهای ۱۶۰ و ۲۴۰ bp روی ژل نشان‌دهنده بیان این دو ژن در همه گروه‌های مورد بررسی می‌باشد (شکل۲). سطح بیان این دو ژن نسبت به β2m که در واقع نشان‌دهنده بیان نیمه-کمی آنها در گروه‌های مختلف مورد مطالعه می‌باشد، در نمودار ۲ نشان داده شده است. چنانکه مشاهده می‌شود حداکثر میزان بیان ژن Bax در فولیکول‌های گروه VNA و حداقل آن در NVA می‌باشد. تجزیه و تحلیل آماری

www.SID.ir

Archive of SID

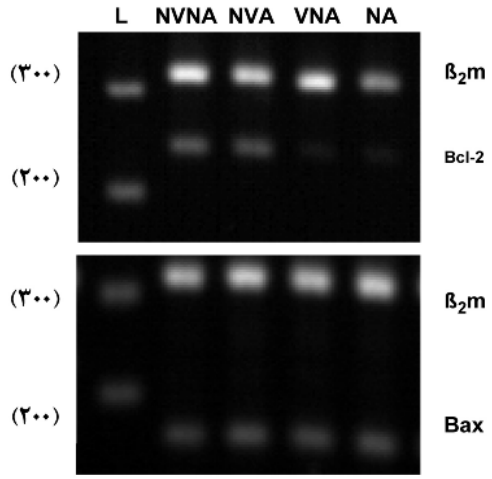
بیان نسبی Bax در گروه‌های مختلف مشخص کرد که تفاوت مشاهده شده بین گروه NVA با سایر گروه‌ها معنی‌دار (p=۰/۰۰۱) بود.

با مقایسه شدت باند Bcl-2 به β2m در گروه‌های مختلف مشخص شد که حداکثر میزان بیان این ژن در فولیکول‌های گروه AVN و حداقل آن در VNA مشاهده می‌شود. تجزیه و تحلیل آماریِ بیان نسبی Bcl-2 در گروه‌های مختلف، مشخص کرد که شدت بیان Bcl-2 در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت. از آنجا که نسبت بین پروتئین‌های سرکوب‌گر و آغازگر آپوپتوز در فعال کردن مسیرهای آپوپتوز اهمیت دارند، نسبت بیان نیمه‌کمی Bax به عنوان آغازگر آپوپتوز به بیان نیمه‌کمی Bcl-2 به‌عنوان سرکوب‌گر آپوپتوز محاسبه و در گروه‌های مختلف مقایسه گردید. در فولیکول‌های گروه NVNA و NVA این نسبت کمتر از یک می‌باشد که نشان‌دهنده بیان بیشترBcl-2 به‌عنوان یک سرکوب‌گر آپوپتوز نسبت به Bax به‌عنوان یک آغازگر آپوپتوز است. در فولیکول‌های گروه VNA و VA این نسب ت بیشتر از یک بود اما در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت.



نمودار ۲) بیان نیمه‌کمی ژن Bax و Bcl-2 در فولیکول‌های پره‌آنترال بزرگ در روز پنجم کشت در چهار گروه VA، VNA، NVA و NVNA

a : اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌ها (p=۰/۰۰۱)



شکل ۲) بیان نیمه‌کمی Bcl-2 و Bax در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

L نشان‌دهنده Ladder، NVNA نشان‌دهنده گروه غیرانجمادی و بدون اسیدآسکوربیک، NVA نشان‌دهنده گروه غیر انجمادی و با آسکوربیک، VNA نشان‌دهنده گروه انجمادی و بدون آسکوربیک، NA نشان‌دهنده گروه انجمادی و با آسکوربیک می‌باشد.

بحث

این مطالعه نشان داد که فولیکول‌های پره‌آنترال جداشده از تخمدان انجماد شیشه‌ای و غیرانجمادی می‌توانند در محیط کشت α-MEM حاوی اسیدآسکوربیک با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بخوبی رشد کرده و تشکیل حفره آنترال دهند. نتایج تحقیق حاضر افزایش قطر فولیکول‌ها را در همه گروه‌ها در طول دوره کشت نشان داد. بهرحال مقایسه گروه‌های انجمادی با غیرانجمادی در روز دوم و چهارم کشت نشان می‌دهد قطر فولیکول‌ها در هر دو گروه غیرانجمادی یعنی با و بدون اسیدآسکوربیک به طور معنی‌داری بیشتر از گروه انجمادی و بدون اسیدآسکوربیک است.

این نتایج نشان‌دهنده این است که در طول انجماد شیشه‌ای و ذوب تخمدان تغییراتی انجام می‌شود که سبب تأخیر در رشد و تکثیر سلول‌های فولیکولی می‌شود. فرایند انجماد می‌تواند سبب بروز

www.SID.ir

Archive of SID

استرس‌هایی بر روی سلول‌ها شود. این استرس‌ها می‌تواند شامل استرس اسموزی به‌علت آبگیری، سمیت ضد یخ و همچنین صدمه به غشا سلول باشد. انجماد می‌تواند از طریق افزایش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا سلول شده و به سلول آسیب برساند (۱۹). اسیدآسکوربیک آنتی‌اکسیدانی است که در مایع فولیکولی وجود دارد بنابراین می‌تواند نقش فیزیولوژیکی در تکوین تخمک و جنین داشته باشد. اسیدآسکوربیک محلول در آب و یک احیاکننده‌ی خوب و برداشت کننده مؤثر رادیکال‌های آزاد می‌باشد. رادیکال‌های آزاد در طول ایسکمی بافت تولید شده و می‌توانند سبب آپوپتوز شوند. اهمیت اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها در کشت سلول‌ها به منظور کاهش صدماتی که به‌طور طبیعی به علت تولید گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن[8] حاصل از فعالیت متابولیکی نرمال سلولی تولید می‌شود بررسی شده است. رادیکال‌های آزاد، مسئول پراکسیداسیون لیپیدی اسیدهای چرب غیراشباع غشا سلولی هستند که منجر به صدمه و مرگ سلولی می‌شوند و آنتی‌اکسیدان‌ها به منظور کاهش این تغییرات آسیب‌رسان استفاده شده‌اند (۲۰).

نتایج تحقیق نشان داد اضافه‌کردن اسیدآسکوربیک به محیط کشت فولیکول‌های گروه انجمادی سبب افزایش معنی‌دار در قطر فولیکولی‌ها در روز چهارم کشت نسبت به گروه انجمادی و بدون اسیدآسکوربیک شد. از طرف دیگر ازآنجاکه بین قطر فولیکول‌های گروه‌های غیرانجمادی با گروه انجمادی با اسیدآسکوربیک تفاوتی مشاهده نشد می‌توان گفت اضافه‌کردن اسیدآسکوربیک به محیط کشت توانسته است کاهش قطر فولیکول‌ها را در گروه انجمادی جبران نماید. در گروه‌های غیرانجمادی اضافه‌کردن اسیدآسکوربیک تأثیر معنی‌داری بر روی قطر فولیکولی نداشت. بیشترین میزان بقا در روز پنجم و دهم کشت مربوط به گروه NVA و کمترین میزان بقا مربوط به گروه VNA بود. اگرچه تفاوت میزان بقا در گروه‌های انجمادی و غیرانجمادی، با و بدون اسیدآسکوربیک معنی‌دار نبود اما یافته‌ها نشان‌دهنده این است که میزان بقا فولیکول‌ها در گروه انجمادی کمتر از گروه غیرانجمادی است و اضافه کردن اسیدآسکوربیک به محیط کشت می‌تواند سبب افزایش میزان بقا فولیکول‌ها شود.

انجماد شیشه‌ای نوعی روش انجمادی است که سلول‌ها در غلظت بالای ضد یخ و سرعت زیاد منجمد می‌شوند و در نتیجه مرحله تشکیل کریستال یخ روی نمی‌دهد و صدمات وارد شده به بافت به حداقل می‌رسد (۲۱). کشت و بلوغ فولیکول‌های تخمدانی یکی از راه‌های برگرداندن قدرت باروری بعد از انجماد و ذوب تخمدان است. در طول کشت *in vitro* سلول‌ها تحت غلظت بالاتر O_2 نسبت به *in vivo* حفظ می‌شوند و رادیکال‌های آزاد در سلول‌های هوازی به‌طور ممتد تولید می‌شوند. سطوح بالای رادیکال‌های آزاد سبب صدمه به سلول و از دست دادن عملکرد آن می‌شود (۲۱). در شرایط *in vivo* سلول‌ها به‌وسیله سیستم‌های دفاعی و یا آنتی‌اکسیدان‌ها محافظت می‌شوند (۱۱ و ۲۲). در طول کشت و بلوغ فولیکول‌ها، تکوین فولیکولی ممکن است به‌وسیله رادیکال‌های آزاد تحت تأثیر قرار گیرد و به همین علت محققین اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها را به محیط کشت بررسی کرده‌اند (۲۳ و ۲۴).

در مطالعه حاضر مشاهده شد که mRNA آنتی‌ژن

[8] Reactive Oxygen Species (ROS)

www.SID.ir

Archive of SID

Bcl-2 در تمام گروه‌های مورد بررسی بیان می‌شود و تفاوت معنی‌داری در سطح بیان این ژن مشاهد نشد. در مورد Bax مشاهده شد که بیان آن به‌طور معنی‌دار در فولیکول‌های گروه غیرانجمادی و حاوی اسیدآسکوربیک کمتر از گروه‌های دیگر بود. ازآنجاکه بیان این دو ژن در هر دو گروه انجمادی (با و بدون اسیدآسکوربیک) با گروه غیرانجمادی و بدون اسیدآسکوربیک تفاوت معنی‌داری نداشت، شاید بتوان گفت انجماد شیشه‌ای بیان mRNA آنتی‌ژن Bax و Bcl-2 را تغییر نداده بود. اما با توجه به اینکه آنتی‌ژن Bax در فولیکول‌های گروه غیرانجمادی و حاوی اسیدآسکوربیک کمتر از سایر گروه‌ها بود، می‌توان احتمال داد که اضافه کردن اسیدآسکوربیک بیان ژن Bax را که یک ژن آغازگر آپوپتوز است کاهش می‌دهد.

با توجه به اینکه مسیرهای آپوپتوز در سلول از طریق تعادل در بیان انواع مختلف ژن‌ها به‌خصوص Bax و Bcl-2 تنظیم می‌گردد، مقایسه نسبت بیان Bax و Bcl-2 می‌تواند الگوی آپوپتوزی را در این سلول‌ها مشخص نماید. سطح Bcl-2 در این مطالعه در گروه‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری نداشت اما کاهش بیان Bax به عنوان یک پروتئین سرکوب‌گر آپوپتوز در گروه غیرانجمادی با اسیدآسکوربیک نسبت به سایر گروه‌ها می‌تواند بیانگر این احتمالی باشد که مسیرهای آپوپتوز در این گروه‌ها غیرفعال شده است. بر همین اساس در این پژوهش نسبت بیان نیمه‌کمی Bax به Bcl-2 در گروه‌های مختلف مقایسه گردید. این مقایسه نشان داد که اگر چه این نسبت در گروه‌های غیرانجمادی کمتر از یک و در گروه‌های انجمادی بیشتر از یک می‌باشد اما تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهند. هوسین (Hussein) و همکاران به ارزیابی اثر زمان ایسکمی بر روی بیان پروتئین‌های Bcl-2 و p53 در بافت تخمدان انجمادی و غیرانجمادی خوک پرداختند. در پایان تحقیق، آنها اعلام کردند که آپوپتوز در آترزی فولیکولی نقش دارد؛ انجماد اثر کمی بر روی بیان پروتئین‌های Bcl-2 و p53 دارد و این سیگنال‌های آپوپتوزی را تغییر نمی‌دهد (۱۶).

کیتاگاوا (Kitagawa) و همکاران اثر غلظت اکسیژن و آنتی‌اکسیدان‌ها را بر تکوین *in vitro* جنین خوک بررسی کردند و گزارش نمودند که غلظت اکسیژن پایین (۵ درصد) و آنتی‌اکسیدان‌هایی چون ویتامینE و ß مرکاپتواتانول سطح H_2O_2 را کاهش می‌دهد و تکوین جنین را بهبود داده و قطعه‌قطعه شدن DNA را کاهش می‌دهد (۱۰). پائولالوپز (Paula-Lopes) و همکاران نشان دادند که سلنیوم و ویتامین E در گاوها سبب بهبود باروری و شیردهی می‌شوند و این سیستم آنتی‌اکسیدانی از طریق گلوتاتیون پراکسیداز که وابسته به سلنیوم است صورت می‌گیرد (۲۵).

کیم (Kim) و همکاران صدمات ایسکمی را در بافت قشری تخمدان تازه و انجمادی با و بدون آنتی‌اکسیدان اسیدآسکوربیک با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در طول ۴۸ ساعت کشت بررسی کردند. با افزایش زمان کشت میزان آپوپتوز فولیکول‌های بدوی در تخمدان تازه و انجمادی افزایش نشان داد و اسیدآسکوربیک با غلظت بکاررفته نتوانست سبب بهبود میزان بقا فولیکول‌ها در هر دو گروه تازه و انجمادی شود (۱۴). در تحقیق حاضر از غلظت بیشتر اسیدآسکوربیک (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد. به‌علاوه به جای کشت قطعات بافتی تخمدان، فولیکول‌های جداشده از تخمدان کشت داده شدند. نتایج نشان داد که غلظت بیشتر اسیدآسکوربیک می‌تواند میزان بقا و رشد فولیکول‌های کشت داده شده از

www.SID.ir

Archive of SID

تخمدان انجماد شیشه‌ای و غیرانجمادی را بهبود بخشد.

مارتینز (Martins) و همکاران اثر محیط کشت α-MEM تکمیل شده با آب نارگیل را بر روی شکل و فعالیت فولیکول‌های بدوی بز بررسی کردند. آب نارگیل حاوی اسیدآسکوربیک است که احتمالاً می‌تواند در بهبود شرایط کشت مؤثر باشد. بر اساس نتایج تحقیق آنها فولیکول‌های بدوی بز در محیط کشت α-MEM توانست در شرایط *in vitro* رشد کند و اضافه‌کردن آب نارگیل با غلظت ۵ یا ۱۰ درصد نتوانست سبب بهبود زنده ماندن و یا رشد فولیکولی شود (۲۶).

لیماورد (Lima-Verde) و همکاران اثر آنتی‌اکسیدان‌های آلفا توکوفرول و ترناتین را بر روی مورفولوژی و فعالیت فولیکول‌های پره‌آنترال بز در کشت *in vitro* بررسی کردند. اضافه کردن غلظت‌های تست‌شده این آنتی‌اکسیدان‌ها (۵، ۱۰و ۱۸) نتوانست سبب بهبود شرایط کشت شود (۲۷). شاید اختلاف بین نتایج تحقیقات مختلف به‌علت نوع و غلظت آنتی‌اکسیدان بکار رفته و همچنین ماده‌ای که به‌عنوان حلال آنتی‌اکسیدان بکار می‌رود باشد. همچنین گونه‌های مختلف و روش بکار رفته می‌توانند سبب این اختلاف شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است در غلظت بالا بعد از یک دوره خاص به‌عنوان پرواکسیداسیون عمل کنند. برای مثال آلفا توکوفرول در یک دوره زمانی کوتاه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند؛ ولی به سرعت با گونه‌های اکسیژن واکنش داده و رادیکال‌های آزاد را تشکیل می‌دهد (۲۸). به همین علت غلظت آنتی‌اکسیدان و زمان اضافه کردن آن به محیط کشت می‌تواند مهم باشد.

بر اساس نتایج این تحقیق غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسیدآسکوربیک در فولیکول‌های جداشده از تخمدان غیرانجمادی تأثیری بر روی رشد، بقا و تشکیل حفره آنتروم در شرایط *in vitro* نداشت اما در گروه انجمادی در کاهش اثرات منفی انجماد شیشه‌ای تخمدان بر روی میزان رشد فولیکولی در *in vitro* مؤثر بود. ازآنجاکه هدف نهایی کشت فولیکول‌ها، بدست آوردن تخمک‌های رسیده است بررسی نقش اسیدآسکوربیک در کیفیت تخمک در شرایط *in vitro* به‌خصوص پس از انجماد تخمدان لازم بنظر می‌رسد. همچنین در این تحقیق بیان نیمه‌کمی ژن‌های Bcl-2 و Bax در سطح mRNA بررسی شد. با توجه به‌اینکه عملکرد این ژن‌ها وقتی مشخص می‌شود که پروتئین آنها تغییر یابد، بررسی و مقایسه پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز فولیکولی در گروه‌های مورد بررسی پیشنهاد می‌شود.

References:

1.Smitz JE, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. Reproduction 2002; 123: 185-202.

2.Newton H, Illingworth P. In-vitro growth of the murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. Hum Reprod 2001; 16: 423-9.

3.Mazoochi T, Salehnia M, Pourbeiranvand Sh, et al. Analysis of apoptosis and expression of genes related to apoptosis in cultures of follicles derived from vitrifies and non-vitrified ovaries. Mol Hum Reprod 2009; 15: 155-64.

4.Haidari K, Salehnia M, Rezazaheh Valoujerdi M. The effects of different concentration of leukemia inhibitory factor on the development of isolated preantral follicle from fresh and vitrified mouse ovaries. Iran Biomed J 2006; 10: 185-90.

5.Picton HM, Harris SE, Muruvi W, et al. The in vitro growth and maturation of follicles. Reproduction 2008; 136: 703-15.

6.Bishonga C, Takahashi Y, Katagiri S, et al. In vitro growth of mouse ovarian preantral follicles and the capacity of their oocytes to develop to blastocyst stage. J Vet Med Sci 2001; 63: 619-24.

7.Demeestere I, Delbaere A, Gervy C, et al.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of preantral follicle isolation technique on in-vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. Hum Reprod 2002; 17: 2152-9.
8.Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. Hum Reprod 1996; 11: 2656-66.
9.Sugino N. Reactive oxygen species in ovarian physiology. Reprod Mol Biol 2005; 4: 31-44.
10.Kitagawa Y, Suzukib K, Yonedaa A, et al. Effect of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. Theriogenology 2004; 62: 1186-97.
11.Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA. The effect of different concentrations of sodium selenite on the in vitro maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. J Assist Reprod Genet 2008; 25: 483-8.
12.Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, et al. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. Reproduction 2001; 121: 89-96.
13.Thomas FH, Leask R, Srsen V, et al. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. Reproduction 2001; 122: 487-95.
14.Kim SS, Yang HW, kang HG, et al. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. Fertil Steril 2004; 82: 679-85.
15.Choi D, Hwang S, Lee E, et al. Expression of mitochondria dependent apoptosis genes (p53, Bax, Bcl-2) in rat granulosa cells during follicular development. J Soc Gynecol Investig 2004; 11:311-7.
16.Hussein MR, Bedaiwy MA, Falcone T. Analysis of apoptotic cell death, Bcl-2, and p53 protein expression in freshly fixed and cryopreserved ovarian tissue after exposure to warm ischemia. Fertil Steril 2006; 85: 1082-92.
17.Greenfeld CR, Pepling ME, Babus JK, et al. Bax regulates follicular endowment in mice. Reproduction 2007; 133: 865-76.
18.Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, et al. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. Fertil Steril 2008; 90: 1480-6.
19.Lane M, Maybach JM, Gardner DK. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. Hum Reprod 2002; 17: 2686-93.
20.Tao Y, Zhou B, Xia G, et al. Exposure to L-ascorbic acid or α-tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase Π and prevents cumulus cells from fragmentation. Reprod Domest Anim 2004; 39: 52-7.
21.Chwa M, Atilano SR, Reddy V, et al. Exposure to L-ascorbic acid and apoptosis in human keratoconus fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006; 47: 1902-10.
22.Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, et al. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of woman undergoing IVF: relationship to outcome. Hum Reprod 2003; 18: 2270-4.
23.Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, et al. Enhancement of development competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O- α-glucoside during in vitro maturation. Biol Reprod 2001; 65: 1800-6.
24. Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, et al. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. J Assist Reprod Genet 2007; 24: 91-7.
25.Paula-Lopes FF, Al-katanani YM, Majewski AC, et al. Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows of heat-shocked Embryol. J Dairy Sci 2003; 86: 2343-51.
26.Martin FS, Van den Hurk R, Santos RR, et al. Development of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. Anim Reprod 2005; 2: 106-13.
27.Lima-Verde LB, Matos MHT, Bruno JB, et al. Effect of α-tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles in vitro cultured. Arq Bras Med Vet Zootec 2009; 61: 57-65.
28.Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. Life Sci 2006; 78: 2088-98.

www.SID.ir