Archive of SID

مقاله پژوهشی

مطالعه اثر آنتی اکسیدانتی هایپوتائورین در کاهش آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در رشد جنین‌های موش سوری حاصل از لقاح آزمایشگاهی

دکتر عباس احمدی[1*]، دکتر رجبعلی صدرخانلو[2]

تاریخ دریافت 98/3/52، تاریخ پذیرش 98/7/53

چکیده

پیش زمینه و هدف: در بدن مکانیسم‌های متعددی در برابر ROS وجود دارد اما در شرایط آزمایشگاهی این سیستم دفاعی وجود ندارد و تولید رادیکال‌های آزاد نیز بیشتر است.هدف از این مطالعه بررسی مورفولوژیکی آسیب‌های حاصل از استرس اکسیداتیو و اثرات آنتی‌اکسیدانتی هایپوتائورین در دو شرایط طبیعی و تنش اکسیداتیو بر روند رشد رویان‌های موش سوری در محیط کشت است.

مواد و روش کار: بعد از انجام لقاح، زیگوت‌ها در محیط HTF حاوی BSA ٤ mg/ml در گروه‌های مختلف کشت داده شدند. برای بررسی اثر استرس اکسیداتیو، زیگوت‌ها را به‌مدت یک ساعت در غلظت‌های مختلف H_2O_2 کشت داده شدند و برای مطالعه اثر هایپوتائورین در شرایط استرس اکسیداتیو زیگوت‌ها بعد از کشت در غلظت ۰۱ میکرومول H_2O_2 در غلظت‌های مختلف هایپوتائورین کشت داده شدند و اثر هایپوتائورین برروند رشد جنین‌ها با افزودن غلظت‌های مختلف آن به محیط کشت بدون تنش‌اکسیداتیو بررسی شد.

یافته‌ها: رشد جنین‌ها پس از قرار گرفتن کوتاه مدت در معرض H_2O_2 به شدت کاهش یافت که در غلظت‌های بالا مشخص‌تر بود. هایپوتائورین تاحدودی آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو را مهار و باعث بهبود روند رشد جنینی، کیفیت جنین‌ها، مورفولوژی جنین‌ها و افزایش میزان شکافتگی جنین‌های کشت داده شده گردید ($P<0.05$).

بحث و نتیجه گیری: برای مقابله با اثرات سوء ROS در سیستم کشت جنینی از آنتی‌اکسیدان‌های گوناگونی می‌توان استفاده کرد. این مطالعه نشان داد که استرس اکسیداتیو باعث آسیب‌های جنینی و کاهش روند رشد جنینی و افزودن هایپوتائورین باعث بهبود روند رشد جنینی می‌شود. براساس یافته‌های این مطالعه افزودن آنتی‌اکسیدانت‌هایی نظیر هایپوتائورین به محیط کشت‌های جنینی توصیه می‌شود.

کلید واژه‌ها: ROS، زیگوت، توقف جنینی، هایپوتائورین، موش سوری

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و یکم، شماره چهارم، ص 377-303، آذر و دی 7698

آدرس مکاتبه ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، بخش علوم تشریح، صندوق پستی ۱۰۱۱-۵۱۰۵۵، تلفن: ۰٤۱٤۵۹٤ ۱۱۰٤

E-mail: abbasahmadi60@yahoo.com

مقدمه

استرس اکسیداتیو در نتیجه‌ی عدم تعادل در بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مقابل ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول ایجاد می‌شود که منجر به تولید انواع رادیکال‌های آزاد شامل آنیون سوپراکسید (O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و مشتقات غیررادیکالی از اکسیژن مانند هیدروژن پراکسید (H_2O_2) می‌شود. این رادیکال‌های آزاد به شدت ناپایدار بوده و به‌طور سریع و غیر اختصاصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان داده و منجر به ایجاد و گسترش انواع آسیب‌های سلولی ازجمله پراکسیداسیون غشاء پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و توکلئوتیک، آپوپتوز و نکروز می‌شود که در نهایت منجر به کاهش

[1] رزیدنت علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

[2] استاد بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

www.SID.ir

Archive of SID

قدرت زیست‌پذیری[1] و تکوین جنین‌ها در محیط کشت می‌گردد (1-3). Bediawy و همکارانش ارتباط بین جنین انسان با سطح ROS[2] را در محیط کشت بررسی کردند و نشان دادند که سطح بالای ROS در روز اول کشت همراه با کاهش شکافتگی و افزایش فرگمانتاسیون جنینی و کاهش در تعداد بلاستوسیست و در نهایت کاهش توان باروری می‌شود. محققان مذکور همچنین گزارش نمودند که افزایش میزان ROS در مایع فولیکولار به عنوان یک مارکر پیش‌بینی کننده میزان موفقیت لقاح در محیط آزمایشگاهی است (4). Yoneda و همکارانش اثرات افزایش غلظت اکسیژن و H_2O_2 را بر جنین گزارش کرده و نشان دادند که کاهش سطح H_2O_2 در شرایط محیط کشت موجب بهبود کیفیت جنین در مرحله بلاستوسیست می‌شود (5،6،9). کاملاً مشخص شده است که ROS از جمله پراکسید هیدروژن، آنیون سوپراکساید و رادیکال‌های هیدروکسیل در تمامی حالت‌های پاتولوژیک به مقدار زیادی تولیدمی‌شوند. این نظریه وجود دارد که ROS نقش مهمی را در بعضی از اختلالات عملکردی تولید مثلی ایفا می‌نماید و شواهدی بر اندازه‌گیری اثر ROS بر عملکرد تولیدمثلی تر گزارش شده است (7).

اختلالات تولیدمثلی در هر دو جنس نر و ماده که به‌وسیله استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شوند گزارش شده‌اند و تاثیر سطح ROS روی زیگوت‌ها و یا در رشد ابتدایی جنین مشخص شده است. استرس اکسیداتیو می‌تواند مسئول پاتولوژی توکسیسیتی جنینی در هیدروسالپنکس باشد (8) رادیکال‌های آزاد اکسیژن در محیط کشت می‌تواند رشد جنینی، میزان آبستنی کلینیکی و سطح باروری را تحت‌تاثیر قرار دهد. در هر دو برنامه IVF و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم[3] (ICSI)، بالا بردن غلظت ROS در محیط کشت در روز اول نشان داده شد که با کاهش میزان آبستنی ارتباط دارد (9).

با رعایت این مسئله، در برنامه‌های لقاح آزمایشگاهی - انتقال جنین انسان، این نظریه وجود دارد که در طی غلظت بالای اکسیژن در سیستم کشت آزمایشگاهی تعداد جنین‌های با کیفیت رشد خوب کم خواهد بود (10-9). علاوه بر این، ارتباط مستقیم بین غلظت بالای پراکسیدهیدروژن و بالا رفتن درجه فراگمانتاسیون با آپوپتوز در جنین‌های موش نشان داده شده است (10، 19). Wang و همکارانش گزارش کردند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت تکوین بلاستوسیست را در جنین‌های موش بهبود می‌بخشد (13). Catt و همکارانش نشان دادند که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط کشت موجب بهبود نسبت باروری و افزایش لانه‌گزینی می‌شوند (9).

اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد توسط سیستم آنتی‌اکسیدان درون سلولی کنترل و یا مهار می‌گردد و در بدن دو نوع آنتی‌اکسیدان وجود دارد: 1) آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی 2) آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی.

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی به عنوان آنتی اکسیدان‌های طبیعی بوده و قادرند ROS را خنثی کرده و ساختار سلولی را از صدمه ناشی از آن محافظت کنند و شامل سوپراکسید دیسموناز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی در واقع آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک یا مکمل‌های غذایی هستند و شامل ویتامین C، ویتامین A، سلنیوم، روی، گلوتاتیون،تائورین و هایپوتائورین، کاروتن و بتاکاروتن است (2-12، 3،6، 14). ولی با این وجود به نظر می‌رسد که در شرایط کشت آزمایشگاهی جنین‌های پستانداران، میزان تولید این رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این جنین‌ها می‌باشد، لذا به منظور غلبه بر این عدم تعادل اکسیدانی، انواع آنتی‌اکسیدان‌های با منشاء خارجی پیش‌بینی و ارائه گردیده است (2،01). از سوی دیگر به نظر می‌رسد توان دفاع آنتی‌اکسیدان جنین‌های آزمایشگاهی در مقاطع مختلف تکوین تا مرحله‌ی بلاستوسیست متفاوت باشد. گروهی از محققان معتقدند که ظرفیت اصلی آنتی‌اکسیدانی جنین در مراحل اولیه تقسیمات زیگوت وابسته به ذخیره mRNA مادری به ارث رسیده درون اووسیت می‌باشد و تدریجاً در مرحله فعالیت ژنوم جنینی[4] یا ZGA است که ژنوم جنین قادر به فعالیت متقابل در مقابل اکسیدان‌های تولید شده درون سلول و یا اکسیدان‌های محیط کشت می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد که نیاز خاص جنین به آنتی‌اکسیدان‌های خارجی در مقاطع قبل و بعد از ZGA متفاوت باشد (04،9). هایپوتائورین رادیکال‌های هیدروکسیل را خنثی می‌نماید و از پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم جلوگیری می‌کند (14). این فعالیت آنتی‌اکسیدانیو در غلظتهای پایین هم اثر می‌کند (11). در این مسیر، هایپوتائورین می‌تواند در مایعات تولیدمثلی نقش فعال آنتی‌اکسیدانی را برای گامت‌ها و جنین‌ها داشته باشد (02،12). گزارش شده است که هایپوتائورین اثرات مثبتی بر روند رشد جنین در هامستر(29) خوک(23) و انسان(24) داشته است.

با توجه به مطالب فوق در این تحقیق تاثیر افزودن هایپوتائورین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت غیرآنزیمی به محیط کشت در ارتباط با مهار ROS در دو شرایط تنش اکسیداتیو و

[1] Viability
[2] Reactive Oxygen Species
[3] Intra cytoplasmic Sperm Injection
[4] Zygote genome activation

www.SID.ir

Archive of SID

غیراکسیدانتو مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار

برای انجام این مطالعه از موش‌های سوری نژاد NMRI ماده بارور جوان ۱۱-۱۲ هفته‌ای و نر ۱۹-۴۰ هفته استفاده شد که در شرایط استاندارد با دمای ۲±۲۹ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۱-۳۱ درصد و با سیکل نوری، ۰۴ ساعت روشنایی و ۰۱ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. آب و غذا به‌صورت آزاد در دسترس بود.

این مطالعه بر روی جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی صورت گرفت که نیاز به تحریک تخمک‌گذاری دارد و به شرح زیر صورت گرفت:

تزریق ۱/۵ واحد (IU) هورمون PMSG[1] (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۱/۱ میلی‌لیتر، و ۴۴-۴۲ ساعت بعد تزریق ۱/۵ واحد هورمون hCG[2] (IU) (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۱/۱ میلی‌لیتر به روش داخل صفاقی صورت گرفت. عمل تخمک‌گذاری معمولا ۱۹- ۰۱ ساعت بعد از تزریق hCG صورت می‌گیرد.

لقاح آزمایشگاهی: ابتدا برای تهیه اسپرم، موش نر را به روش جابجایی گردن کشته و بعد از جدا کردن بافت‌های همبندی اطراف دم اپیدیدیم را همراه با مقداری از کانال دفران از بیضه جدا کرده و در داخل پتریدیش ۲ سانتی‌متری حاوی محیط کشت HTF[3] حاوی 4 mg/ml BSA[4] (Sigma, USA) که قبلاً جهت تعادل در داخل انکوباتور قرار داده شده بود قرار داده و بعد از ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم و فشار در کانال دفران برای خروج اسپرم‌ها در داخل انکوباتور CO2 گذاشته شد. بعد از ۱/۵ ساعت اسپرم‌ها خارج و در محیط پخش شدند، سپس اسپرم‌ها را شستشو داده و با استفاده از روش شناورسازی[5] اسپرم‌های متحرک را جدا نموده و جهت ظرفیت‌یابی، اسپرم‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور CO2 با دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۵۲).

تخمک‌گیری و لقاح داخل آزمایشگاهی: ۱۹- ۰۱ ساعت پس از تزریق hCG (صبح روز بعد) بعد از کشتن حیوان به روش جابجایی گردن، لوله‌های رحمی را جدا کرده و در داخل محیط کشت ۳۱ درجه از قبل آماده شده قرار داده و با استفاده از فن Dissecting تخمک‌ها را خارج نموده و پس از شستشو تخمک‌ها را به قطرات محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF حاوی 4 mg/ml BSA منتقل کرده و سپس اسپرم‌ها را به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، اضافه شد. عمل لقاح حدود ۵-۶ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم صورت می‌گیرد و بدین ترتیب زیگوت بدست آمد (۵۲).

گروه‌های آزمایشی در ادامه تحقیق زیگوت‌های شستشو داده شده حاصل از لقاح آزمایشگاهی به طور تصادفی در گروه‌های مختلف آزمایشی تقسیم گردید که به تعداد ۹۱ جنین در داخل قطرات ۰۱۱ میکرولیتری در زیر روغن معدنی[6] کشت داده شدند. جهت ایجاد استرس اکسیداتیو در زیگوت‌ها با افزودن غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید (H_2O_2) (ساخت شرکت Sigma، آمریکا) به محیط کشت و انکوباسیون به مدت یک ساعت استفاده شد و بعد زیگوت‌ها به قطرات کشت گروه‌های مختلف منتقل شدند و در مراحل بعدی ارزیابی جنین‌ها صورت گرفت.

گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه

- گروه کنترل که زیگوت‌ها تنها در محیط کشت HTF حاوی ۴mg/ml BSA کشت داده شدند

- گروه‌هایی که زیگوت‌ها جهت ایجاد تنش اکسیداتیو به مدت یک ساعت در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف پراکسیدهیدروژن (۲۵، ۵۰۱ و ۵۱ میکرومول) کشت داده شدند

- گروه‌هایی که به محیط کشت غلظت‌های مختلف هایپوتائورین (ساخت شرکت Sigma،آمریکا)، (۰/۵/۰/۹/۱ /۰۵/۰ و ۰۱ میکرومول) اضافه شد.

- گروه‌هایی که زیگوت‌ها ابتدا جهت ایجاد تنش اکسیداتیو در آن‌ها به مدت ۰ ساعت در محیط کشت حاوی ۰۱ µM پراکسیدهیدروژن کشت داده شده و در مرحله بعدی به محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف هایپوتائورین (۰/۵/۰/۹/۱ /۰۵/۰ و ۰۱ میکرومول) منتقل شدند

ارزیابی رشد جنین‌ها

برای ارزیابی تاثیر تنش اکسیداتیو واثر آنتی‌اکسیدانتی مواد مذکور در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست مراحل رشد جنینی مورد ارزیابی قرار گرفت، بررسی میزان شکافتگی ۹۴ ساعت بعد از کشت صورت گرفته و در زیگوت‌های موجود در هر گروه، جنین‌ها از نظر میزان فراگمانتاسیون و میزان طی مراحل رشد جنینی یا تعداد جنین‌های متوقف شده و تیپ‌بندی جنین‌های متوقف شده با توجه به فاکتورهای مختلفی نظیر لیز شدن جنین‌ها و نکروتیک بودن آن‌ها و فراگمانتاسیون و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمیک مقایسه گردیدند. تیپ‌بندی جنین‌های متوقف شده به شرح ذیل بود: تیپ I

[1] Pregnant Mare Serum Gonadotropine (Folligon)
[2] Human Chorionic Gonadotropine (Folligon)
[3] Human Tubal Fluid
[4] Bovine Serum Albumin
[5] Swim up
[6] Mineral Oil

www.SID.ir

Archive of SID

جنین‌های با لیز، فراگمانته شدن و نکروتیک بودن کامل، تیپ II جنین‌های با لیز و فراگمنته شدن در تعدادی از بلاستومرها، تیپIII جنین‌های با تعداد کمی بلاستومرهای لیز و فراگمانته و ویزیکول سیتوپلاسمیک (۱۵).

کیفیت جنین‌ها و تعداد جنین‌های رشد کرده، درصد شکافتگی، میزان جنین‌های متوقف شده و درصد بلاستوسیست‌های ایجاد شده در طی ۹۱۰ ساعت در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای بررسی کیفیت رشد جنینی ومیزان شکافتگی[1] بلاستوسیست‌های بدست آمده در گروه های مختلف شمارش تعداد سلولی به ازای هر جنین با استفاده از روش air dry technique of Tarkowski صورت پذیرفت (۱۲).

آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم افزار Minitab و روش 2Proportion با $P<0.05$ مورد آنالیز قرار گرفت و نتایج به‌صورت درصد در نمودارها و جدول مربوطه آورده شد و مقایسه تمایز و تعداد سلول‌های موجود به ازای هر جنین بین گروه‌های مختلف توسط نرم افزار SPSS شماره ۲۰ و روش آماری One way ANOVA و تست تعقیبی Tukey با $P<0.05$ مورد مقایسه قرار گرفته و میانگین و انحراف معیار آن‌ها بدست آمده و در نمودار مربوطه آورده شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از افزودن غلظت‌های مختلف هایپوتائورین به محیط کشت در شرایط عادی و بدون تنش اکسیداتیو و مقایسه کیفیت رشد جنین‌ها با گروه کنترل نشان داد، افزودن هایپوتائورین به محیط کشت باعث افزایش کیفیت رشد جنین‌ها و مورفولوژی آن‌ها شد (تصویر C-1). بررسی درصد جنین‌های دو سلولی ایجاد شده در مقایسه با گروه کنترل نشان داد در حضور هایپوتائورین در محیط کشت درصد جنین‌های دوسلولی در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۰). مقایسه درصد بلاستوسیست‌ها نشان داد، افزودن هایپوتائورین به محیط کشت جنین‌ها باعث افزایش قابل توجه و کاملاً معنی‌دار درصد بلاستوسیست‌ها در مقایسه با گروه کنترل شده است و این افزایش در غلظت‌های ۰ و ۰۱ میکرومول بالا و از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بود (نمودار ۱). همچنین مطالعه تعداد سلول‌ها به ازای هر جنین نشان داد افزودن هایپوتائورین سبب افزایش کاملاً معنی‌دار تعداد سلول‌ها به ازای هر جنین در مقایسه با گروه کنترل می‌شود که این نشان دهنده تاثیر افزودن هایپوتائورین به‌عنوان یک آنتی اکسیدانت به محیط کشت جنین‌ها بر روی افزایش کیفیت رشد جنین‌ها و شکافتگی بوده است (نمودار ۲).

همچنین مقایسه درصد جنین‌های متوقف شده نشان داد که افزودن غلظت‌های مختلف هایپوتائورین باعث کاهش کاملاً معنی‌دار تعداد جنین‌های متوقف شده در مقایسه با گروه کنترل می‌شود و تیپ جنین‌های متوقف شده در حضور هایپوتائورین اکثراً از نوع III یا لیز و فراگمانتاسیون کم در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد (جدول ۱).

نتایج حاصل از قرار دادن جنین‌ها در معرض غلظت‌های مختلف H_2O_2 سبب ایجاد توقف در جنین‌ها در مرحله یک سلولی و دو سلولی شد که این توقف در غلظت‌های پایین (۵ و ۰۱ میکرومول) اکثراً از نوع II و یا III با میزان لیز و فراگمانتاسیون کم بودند (تصویر E-1). در غلظت‌های بالای H_2O_2 (۹۵ و ۵۱ میکرومول) میزان بالای توقف جنینی مشاهده شد که اکثراً از نوعI و تعدادی نیز از نوع II با میزان لیز و فراگمانتاسیون بالا با رشد بسیار کم بودند، به‌طوری که در غلظت ۵۱ میکرومول اکثریت بالای جنین‌ها در مرحله یک سلولی متوقف شده و لیز و فراگمانته بودند (تصویر D-1) و تنها درصد خیلی کمی از آن‌ها تا مراحل اولیه تقسیم پیشرفت داشته و به مراحل بالاتر تقسیم و رشد جنینی پیش نرفته بودند.

مقایسه درصد جنین‌های دو سلولی ایجاد شده که نشان دهنده شروع شکافتگی است نشان داد در گروه‌هایی که تنش اکسیداتیو توسط افزودن غلظت‌های مختلف H_2O_2 ایجاد شده بود کاهش کاملاً معنی‌داری را با $P< 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل نشان داد و این کاهش در گروه‌های با غلظت‌های بالای H_2O_2 کاملاً محسوس بود بطوری که در غلظت ۹۵ میکرومول تنها ۹/۴۴درصد و در غلظت ۵۱ میکرومول تنها ۹/۵۳ درصد جنین‌ها تا مرحله دوسلولی و بالاتر پیش رفته بودند (نمودار 1). مقایسه درصد بلاستوسیست‌ها با گروه کنترل نشان داد پس از قرار گرفتن جنین‌ها در معرض استرس اکسیداتیو درصد بلاستوسیست‌ها به میزان قابل توجه و کاملاً معنی‌داری کاهش پیدا کرده بود. به‌خصوص در غلظت‌های بالا که این کاهش بسیار بالا بود، به‌طوری که در غلظت ۵۱ میکرومول هیچ‌گونه بلاستوسیستی ایجاد نشده بود(نمودار2) و بلاستوسیست‌های ایجاد شده در غلظت‌های پایین‌تر H_2O_2 نیز از لحاظ مورفولوژی طبیعی نبودند(تصویر E-1).

نتایج حاصل از شمارش سلولی جنین‌ها نشان داد که میانگین تعداد سلول‌ها به ازای هر جنین در گروه‌هایی که جنین‌ها در معرض غلظت‌های مختلف H_2O_2 قرار گرفته بودند کاهش

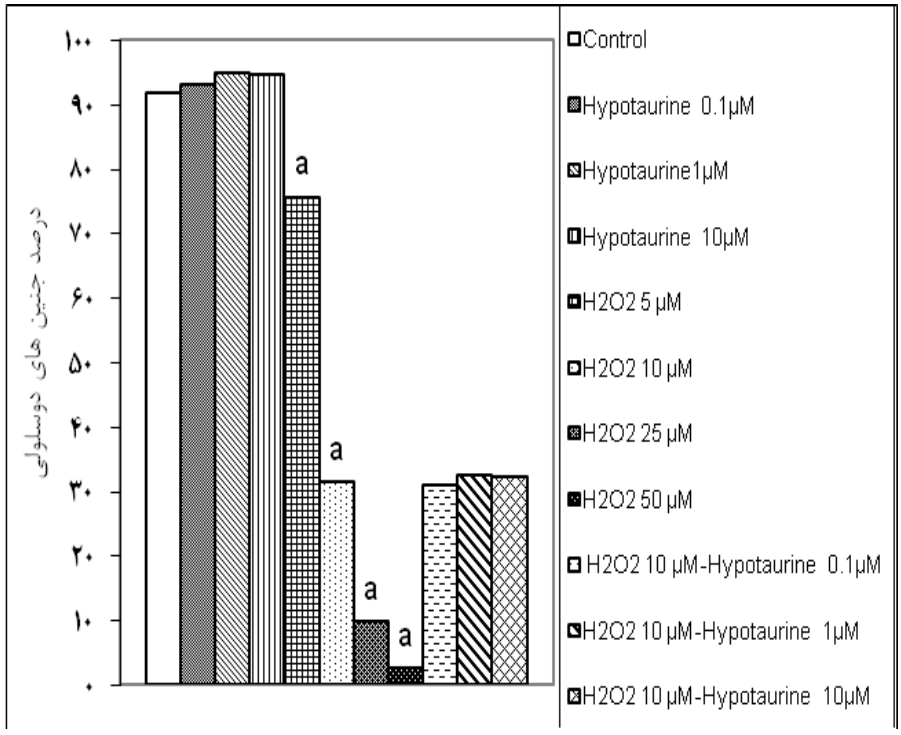
[1] Cleavage rate

www.SID.ir

Archive of SID

معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌داد و این کاهش در غلظت‌های بالای H_2O_2 بیشتر بود (نمودار۲).

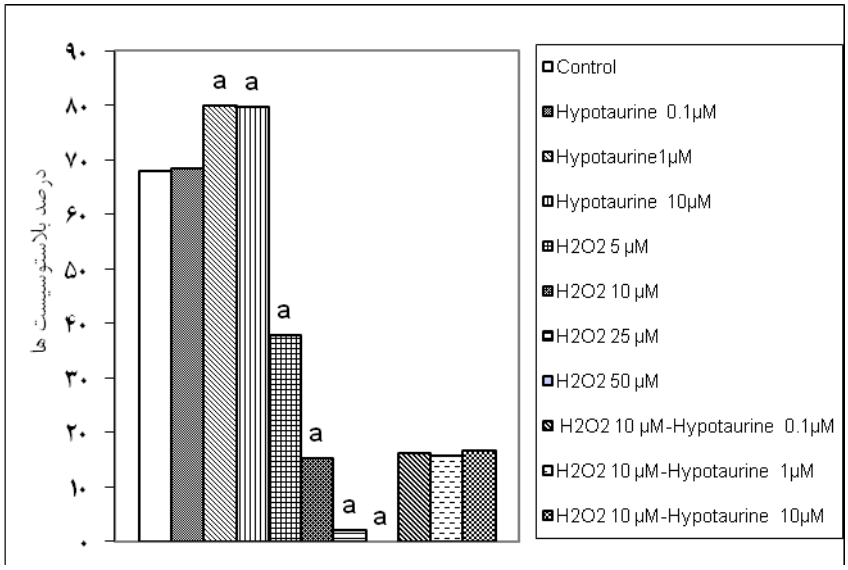
مطالعه اثر هایپوتائورین در شرایط تنش اکسیداتیو با قرار دادن آن‌ها به مدت یک ساعت در معرض ۰.۱ میکرومول H_2O_2 در محیط کشت و در ادامه، کشت آن‌ها در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف هایپوتائورین نشان داد که هایپوتائورین به‌خصوص در غلظت ۰.۱ میکرومول تا حدودی موجب مهار آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو گردیده و باعث افزایش درصد جنین‌های دوسلولی، در مقایسه با گروه تنش اکسیداتیو شده است ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود(نمودار ۱). مقایسه درصد بلاستوسیست‌ها نشان داد هایپوتائورین باعث افزایش درصد بلاستوسیت‌ها در شرایط تنش اکسیداتیو می‌شود که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۲). مقایسه تعداد سلول‌ها به ازای هر جنین نشان داد، هایپوتائورین در غلظت‌های ۰ و ۰.۱ میکرومول باعث افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌ها به ازای هر جنین در شرایط تنش اکسیداتیو شده است (نمودار۳) و نشان می‌دهد که هایپوتائورین باعث بهبود کیفیت رشد و میزان شکافتگی در جنین‌های کشت داده شده در شرایط تنش اکسیداتیو می‌شود. بررسی جنین‌های متوقف شده نشان داد، هایپوتائورین باعث کاهش درصد جنین‌های متوقف شده گردید ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. مطالعه نوع جنین‌های متوقف شده براساس میزان لیز و فرگمانتاسیون آن‌ها نشان داد، میزان لیز و فراگمانتاسیون جنین‌های متوقف شده در شرایط تنش اکسیداتیو در حضور هایپوتائورین کاهش معنی‌داری را داشت(جدول ۱). بررسی اثر هایپوتائورین بر مورفولوژی بلاستوسیست‌ها نشان داد افزودن هایپوتائورین در شرایط تنش اکسیداتیو سبب بهبود مورفولوژی بلاستوسیست‌های ایجاد شده با میزان لیز و فرگمانتاسیون و واکوئله شدن کم شد(تصویر F-1).



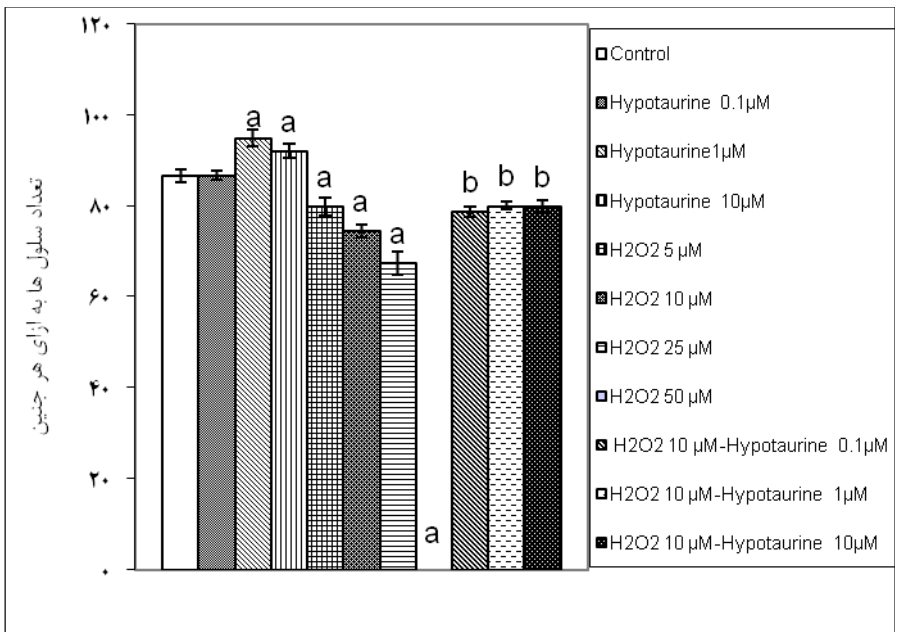
نمودار شماره (۲): مقایسه درصد جنین‌های دوسلولی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (درصد نسبت به تعداد کل جنین‌ها)، معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a و در مقایسه با گروه تنش اکسیداتیو حاوی غلظت ۰.۱ میکرومول H_2O_2 با b (که تفاوت معنی‌داری وجود ندارد) نشان داده شده است ($P<0.05$)

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره (۵): مقایسه درصد بلاستوسیست‌ها در گروه‌های مختلف مورد مطالعه(درصد نسبت به تعداد کل جنین‌ها)، معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a و در مقایسه با گروه تنش اکسیداتیو حاوی غلظت ۰۱ میکرومول H_2O_2 با b (که تفاوت معنی‌داری وجود ندارد) نشان داده شده است($P<0.05$)



نمودار شماره (۵): مقایسه تعداد سلول‌ها به ازای هر جنین (میزان شکافتگی و رشد جنینی) در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (میانگین±انحراف معیار)، معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a و در مقایسه با گروه تنش اکسیداتیو حاوی غلظت ۰۱ میکرومول H_2O_2 با b نشان داده شده است($P<0.05$)

www.SID.ir

Archive of SID

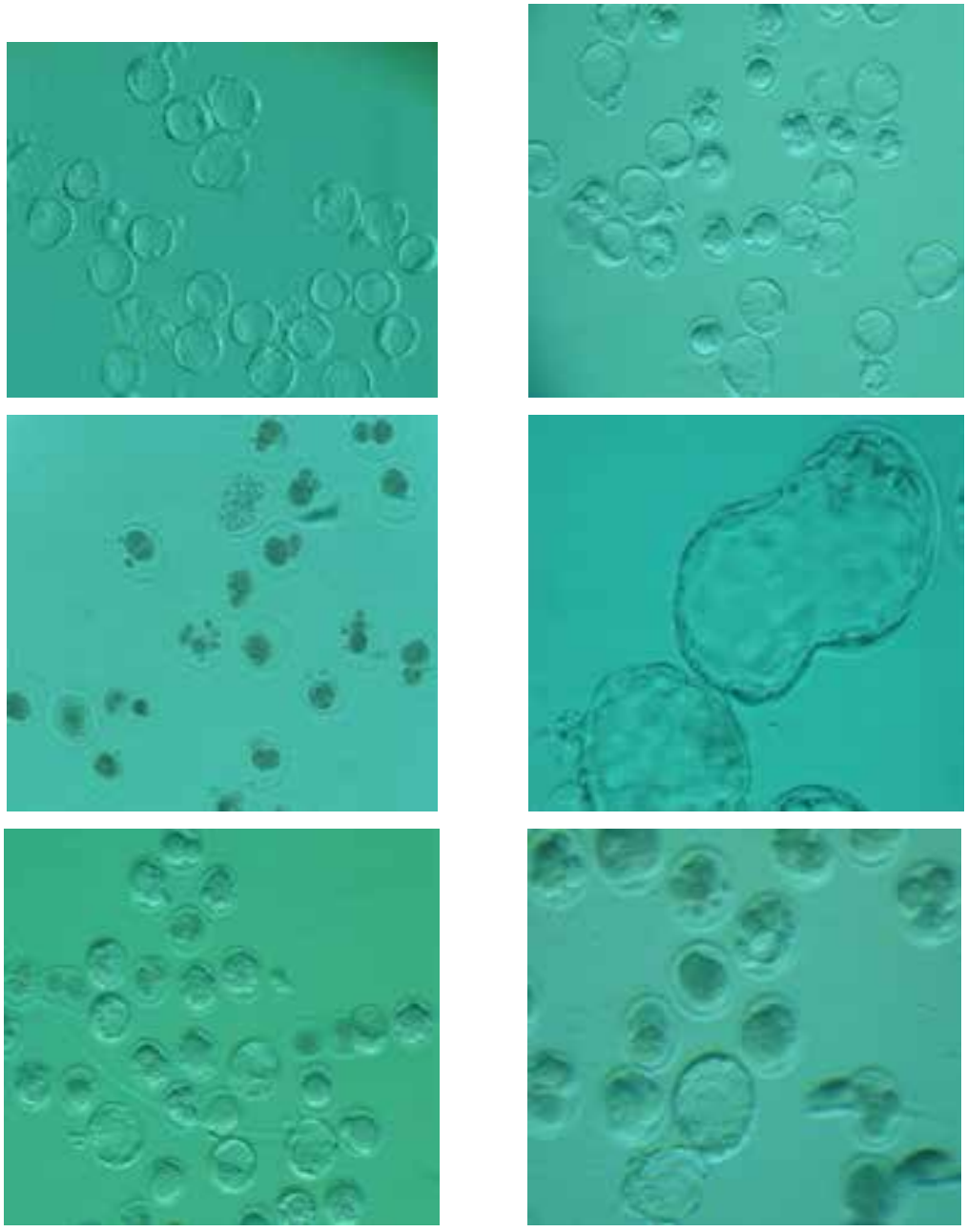
جدول شماره (۲): مقایسه گروه‌های مختلف از نظر درصد و نوع توقف جنینی ($P<0.05$)، معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a و در مقایسه با گروه تنش اکسیداتیو حاوی غلظت ۰۱ میکرومول H_2O_2 با b نشان داده شده است

	تیپ I	تیپ II	تیپ III	تعداد کل جنین‌های متوقف شده	تعداد کل جنین‌ها در هر گروه
کنترل تعداد (٪)	٤(٨/١٤)	٠٠ (٠/٥٣)	٣٩(٨٠/٩٠)	٤١ (٣٩/١)	٠٤٢
هایپوتائورین ١/١ µM	٥ (٨/٩٩)	٠١ (٥/٤٥)	٣١ (٨٩/٤١)	٥٤ (٣٠/٥٤)	٠١٠
هایپوتائورین ٠ µM	٠ (٠/٥١) a	٩ (١/٠٥) a	٣٣(١٤ /٩٢) a	٣٥(٨١/١٠) a	٠١٤
هایپوتائورین ٠١ µM	٣ (١/٤١)	٩ (١/٨١) a	٩١ (١١ /٣) a	٣٤ (٨١/٣٢) a	٠٢١
H_2O_2 5 µM	٩٤ (١٢ /١٤) a	٥٥(٣٤/٤٢)a	٠١ (٩/٩١) a	٤١ (٩٩/٨٣)a	٠٤٣
H_2O_2 10 µM	(٥٤/١٤) a ٠١١	٣١ (٨٠/٥٠)a	١ (٥/٨٣)a	٠٤٢ (٤٤/٤٤)a	٠١٩
H_2O_2 25 µM	(٤١/٠٣)a ٠٣٤	٠٤ (٩/٠٣)a	١a	٠٥٩ (٩٤ /٠٢)a	٠٥٥
$H_2O_250\mu M$	(٩١ /٤١)a ٠٥٤	٤ (٨/٥٣)a	١a	٠٥٤ (١١)a	٠٥٤
١/١ µM هایپوتائورین + H_2O_210 µM	١١ (٥٣/٥١)	٣١ (٨٣/٨٠)	٠٩ (٦/١٤)	٠٤٠ (٤٩/٤٢)	٠٢٤
٠ µM هایپوتائورین + H_2O_210 µM	١١ (٥٢/٣١)	٣٢ (٨١/٩٣)	٠٩ (٩/٩٤)	٠٤ ٥ (٤٤/٣١)	٠١٩
٠١ µM هایپوتائورین + H_2O_210 µM	٤٤ (٥١)b	٤٠ (٨٤/٤١)	٠٥ (٤/٩٣)	٠٤ ١ (٤٣/٣٣)	٠٢٤

تمامی داده‌ها مثل گروه کنترل به‌صورت تعداد (درصد نسبت به کل جنین‌ها در هر گروه) آورده شده است

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر 1- A- گروه کنترل تمایز درصدی از جنین‌ها به بلاستوسیست بعد از **۹۱۰** ساعت انکوباسیون و درصدی از جنین‌ها که در مراحل مختلف رشد متوقف شده اند، B- گروه حاوی هایپوتائورین که در آن درصد بالایی از جنین‌هابه بلاستوسیست اکسپند و هچ شده تمایز یافته‌اند، C- بلاستوسیست در مرحله هچ شدن را نشان می‌دهد، D- گروهی که به محیط کشت **۵۱** میکرومول H_2O_2 اضافه شده بود و نشان می‌دهد که تمامی جنین‌ها در مراحل اولیه رشد متوقف شده و درجات بالایی از لیز و فراگمانتاسیون را نشان می‌دهند، E- گروهی که به محیط کشت **۱۰** میکرومول H_2O_2 اضافه شده بود و نشان می‌دهد که تعداد کمی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده‌اند و بلاستوسیست‌های ایجاد شده از لحاظ مورفولوژی مناسب نمی‌باشند و سایر جنین‌ها در مراحل اولیه رشد متوقف شده و دچار لیز و فرا گمانتاسیون شده هستند، F- گروه هایپوتائورین در شرایط تنش اکسیداتیو که نشان می‌دهد هایپوتائورین تاحدودی توانسته آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو را مهار نماید که تعدادی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست تمایز یافته‌اند و سایر جنین‌ها به این مرحله نرسیده‌اند ولی با این وجود میزان لیز و فراگمانتاسیون که در جنین‌ها دیده می‌شود به مراتب کم‌تر است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

استرس اکسیداتیو به معنای افزایش در سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن بدن است که از میزان دفاع آنتی‌اکسیدانتی بدن تجاوز می‌کند(31) و در مواردی از مشکلات مختلف تولیدمثلی نظیر آندومتریوز، فولیکولوژنز و بلوغ غیر طبیعی تخمک، مایع هیدروسالپینگسی[1]، نکروزواسپرمیا[2] و آستنواسپرمیا[3] دخالت دارد (2،94).

نتایج تحقیق نصر اصفهانی و همکاران بیان‌گر این نکته کلیدی بود که جنین‌های موش کشت داده شده در مقطع خاص ایست تکوین حاوی بیشترین میزان ROS درون سلولی هستند. در واقع برای اولین بار ارتباط بین ایست تکوینی و مقادیر ROS مشخص گردید و نشان داده شد که ترکیب مواد موجود در محیط کشت از جمله گلوکز، EDTA، گلوتاتیون و نیز اکسیژن محیط بر میزان ROS درون سلولی و شدت بروز ایست تکاملی موثر خواهد بود و همچنین نشان دادند که افزایش ROS مطابق با ایست تکوین جنین‌های موش دو سلولی در آزمایشگاه می‌باشد (31). افزایش در میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر روی غشاء سلول، DNA و میتوکندری‌ها موثر است و به نظر می‌رسد این تاثیر به‌عنوان واسطه‌ای باشد تا آبشار آپوپتوزی را از تنظیم خارج کند(3). شواهد فراوان نشان می‌دهد که سطوح بالای H_2O_2 بسته به غلظت آن سبب آپوپتوز و نکروز در گونه‌های مختلف سلول‌های سوماتیک می‌شود(33-31).

نتایج این مطالعه نشان داد که توان رشد جنین در مراحل اولیه پیش از لانه‌گزینی پس از قرار گرفتن کوتاه مدت در معرض رادیکال‌های آزاد اکسیژن به شدت کاهش یافته است. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر با نتایج حاصل از سایر مطالعات صورت گرفته در این زمینه مطابقت دارد. همچنین مشخص شد که دزهای بالای رادیکال‌های آزاد اکسیژن در محیط کشت تاثیرات بیشتری را سبب می‌شوند و از یک حد آستانه غلظت به بالا تاثیر کامل بوده و مانع رشد جنین و یا سبب حالت‌های غیر طبیعی شدید می‌شود که نشانگر وابسته به غلظت بودن رشد جنین در ارتباط با رادیکال‌های آزاد می‌باشد. به‌طوری که در این مطالعه مشاهده شد که قرار دادن جنین‌ها به مدت یک ساعت قبل از کشت در محیط حاوی غلظت‌های مختلف H_2O_2 باعث ایجاد آسیب در جنین‌های پیش از لانه‌گزینی گردیده است به‌طوری که جنین‌هایی که در معرض غلظت **51** میکرومول H_2O_2 قرار گرفتند اکثریت جنین‌ها فاقد قدرت شکافتگی و رشد بودند و تنها درصد خیلی کمی از آن‌ها تا مراحل اولیه رشد جنینی پیش رفته و دچار لیز و فراگمانتاسیون شده بودند(تصویر D-1). ولی در غلظت‌های پایین H_2O_2 (**5** و **01** میکرومول) تاثیرات کم‌تر بوده و باعث کاهش شکافتگی و رشد جنین‌ها و کاهش کیفیت جنین‌ها و مورفولوژی آن‌ها شد. هر چند که درصدی از این جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست پیش رفتند ولی در مقایسه با گروه کنترل این درصد خیلی پایین بوده و بلاستوسیست‌های حاصله از نظر مورفولوژی نیز حالت غیرطبیعی را نشان دادند (تصویر E-1).

برخی از دانشمندان گزارش نموده‌اند که توقف جنین‌ها در فاز G2/M همزمان با افزایش در سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد (34،35). بنابراین می‌توان میزان شکافتگی و کیفیت جنین‌های تولید شده در شرایط داخل آزمایشگاهی را با افزودن پاک کننده‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن به محیط کشت جنین افزایش داد. از سوی دیگر با توجه به اثرات مهاری ROS بر تکوین اولیه جنینی تاکنون آنتی‌اکسیدان‌های گوناگونی در محیط کشت بررسی شده است.

اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد توسط سیستم آنتی‌اکسیدان درون سلولی مانند گلوتاتیون، اسید آسکوربیک و آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز(SOD)، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) کنترل و یا مهار می‌گردد (3). با این وجود به نظر می‌رسد که در شرایط کشت آزمایشگاهی جنین‌های پستانداران، میزان تولید این رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این جنین‌ها می‌باشد. لذا به منظور غلبه بر این عدم تعادل اکسیدانی انواع آنتی‌اکسیدان‌های با منشا خارجی پیش بینی و ارائه گردیده‌اند (1). از سوی دیگر به نظر می‌رسد که توان دفاع آنتی‌اکسیدانی جنین‌های آزمایشگاهی در مقاطع مختلف تکوین تا مرحله‌ی بلاستوسیست متفاوت باشد. گروهی از محققان معتقدند که ظرفیت اصلی آنتی‌اکسیدانی جنین‌ها در مراحل اولیه تقسیمات زیگوت وابسته به ذخیره mRNA مادری به ارث رسیده درون اووسیت می‌باشد و تدریجا در مرحله فعالیت ژنوم جنینی است که ژنوم جنین قادر به فعالیت متقابل در مقابل اکسیدان‌های تولید شده درون سلول و یا محیط کشت می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد که نیاز خاص جنین به آنتی‌اکسیدان‌های خارجی در مقاطع قبل و بعد از ZGA متفاوت باشد (32).

مکانیسم‌های دفاعی متعددی در جنین و محیط پیرامونی احاطه کننده آن وجود دارد. در بدن[4] به نظر می‌رسد اووسیت‌ها و جنین‌ها در برابر استرس اکسیداتیو به‌واسطه پاک‌کننده‌های اکسیژنی موجود در مایعات فولیکولی و اویدوکت محافظت

[1] Hydrosalpingeal fluid
[2] necrozoospermia
[3] Astenospermia
[4] in vivo

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شوند. مقادیر بالای تائورین و هایپوتائورین در گامت‌ها و در محیط اطراف جنین تمام گونه‌های مورد آزمایش مشاهده شده است (۳۱). این ترکیبات به‌وسیله سلول‌های اپی‌تلیال اویدوکتی سنتز می‌شود(۳۲). هایپوتائورین رادیکال‌های هیدروکسیل را خنثی می‌نماید و از پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم جلوگیری می‌کند(٤١).

بنابراین به نظر می‌رسد که افزودن آنتی‌اکسیدانت‌ها به محیط کشت جنین در مراحل مختلف رشد بخصوص در قبل و بعد از بیان ژنوم جنینی (ZGA) که بیشترین میزان تولید ROS را در جنین همراه دارد برای افزایش کیفیت جنین و بهبود رشد جنین در شرایط داخل آزمایشگاهی مناسب باشد که مطالعه اخیر تا حدودی نشان داد که افزودن آنتی اکسیدانت هایپوتائورین در شرایط طبیعی بدون شرایط تنش اکسیداتیو باعث بهبود و افزایش کیفیت جنین، افزایش درصد جنین‌های دو سلولی که بیانگر شروع شکافتگی در جنین است، افزایش درصد بلاستوسیست و افزایش تعداد سلول‌ها در جنین‌ها بعد از کشت در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف هایپوتائورین می‌شود که نشان می‌دهد افزودن هایپوتائورین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت به محیط کشت جنین می‌تواند بسیار مفید باشد. همچنین نتایج حاصل از افزودن هایپوتائورین به محیط در شرایط تنش اکسیداتیو در جنین‌هایی که قبل از کشت به مدت یک ساعت در داخل محیط کشت حاوی ۱۰ میکرومول H_2O_2 کشت داده شده بودند نشان داد که تا حدودی هایپوتائورین می‌تواند بر روی کیفیت و روند رشد جنین‌ها در شرایط تنش اکسیداتیو موثر باشد ولی این تاثیرات در شرایط عادی و بدون تنش اکسیداتیو مشخص‌تر و معنی‌دارتر بوده است. بنابراین افزودن هایپوتائورین جهت بهبود روند رشد جنین و جلوگیری از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن به محیط کشت‌های جنینی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمام کسانی که در انجام این تحقیق ما را یاری نموده‌اند بویژه جناب آقای آراز رابری و خانم‌ها سحر غفاری، سمیرا ابراهیم‌زاده و کیانا کارگر کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Abdoon ASS, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T. Influence of oocyte quality, culture media and gonadotropins on cleavage rate and development of in vitro fertilized buffalo embryos. Anim Reprod Sci 2001; 65: 215-23.
2. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update 2001; 7:175-89.
3. Chaudiere J, Ferrari-Illiou R. Intracellular antioxidant from chemical to biochemical mechanism. Food Chem 1999; 37:949-62.
4. Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma KR. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. Hum Reprod 2002; 17: 426-31.
5. Yoneda A, Suzuki K, Mori T, Veda J, Watanabe T. Effect of delipidation and oxygen concentration on in vitro development of porcine embryos. J Reprod Dev 2004; 50: 287-95.
6. Carbone MC, Tatone C, Delle SD, Marci R, Caserta D, Colonna R, et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular characterization and age-dependent changes. Mol Hum Reprod 2003; 9: 639-43.
7. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. Mol Reprod Dev 1993; 35: 302-15.
8. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. Int J Fertil Womens Med 2000; 45(5): 314-20.
9. Bedaiwy MA, Falcone T, Maher SM, Abdel AN, Sharma KR, Worley SE, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. Fertil Steril 2004; 82:593-600.

www.SID.ir

Archive of SID

10. Goto Y, Noda Y, Narimoto K. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. Free Radic Biol Med 1992; 13(1): 47-53.
11. Goyanes VJ, Ron-Crozo A, Costas E. Morphometric categorization of the human oocyte and early conceptus. Hum Reprod 1990; 5: 69-75.
12. Catt JW, Henman M. Toxic effect of oxygen on human embryo development. Hum Reprod 2000; 15: 199-206.
13. Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. Fertil Steril 2002; 78: 1272-7.
14. Cassanoa E, Tostoa L, Balestrieria M, Zicarellib L, Abresciaa P. Antioxidant defense in the follicular fluid of water buffalo. Cell Physiol Biochem 1999; 9:106-16.
15. Cetica Pintos LN, Dlvit GC, Beconi MT. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. IUBMB Life 2001; 51:57-64.
16. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrin 2005; 3:28.
17. Ali AA, Biledaeu JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes various during in vitro maturation fertilization.and development. Theriogenology 2003; 59:939-49.
18. Alvarez JG, Storey BT. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbet spermatozoa and protect against loss of motility. Biol Reprod 1983; 29: 548-55.
19. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. Biochem J 1988; 256: 251-5.
20. Ogasawara M, Nakamura T, Koyama I. Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role. Chem Pham Bull 1993; 41: 2172-5.
21. Van Winkle LJ, Dickinson HR. Differences in amino acid content of preimplantation mouse embryos that develop in vitro vs. in vivo. In vitro effects of 5 amino acids that are abundant in oviductal secretions. Biol Reprod 1995;52:96-104.
22. Barnett DK, Bavistar BD. Hypotaurine requirement for in vitro development of golpden hamster one cell embryos into morulae and blastocysts, and production of term offspring from in vitro-fertilized ova. Biol Reprod 1992; 47: 297-304.
23. Reed ML, Illera MJ, Petters RW. In vitro culture of pig embryos. Theriogenology 1992; 37: 95-109.
24. Devreker F, Hardy K. Effects of glutamine and Taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryo in vitro. Biol Reprod 1997; 57:921-8.
25. Hedrich H. The laboraty mouse: handbook of experimental animals. 2nd Ed. New York: Academic Press; 2006.
26. Tarkowski AK. An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics (Basel) 1966; 5: 394-400.
27. Agarwald A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril 2003; 79: 829-43.
28. Goto Y, Noda Y, Mori T. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. Free Radic Biol Med 1993; 15: 69-75.
29. Nasr-Esfahani MH, Johnson MH. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. Development 1991; 113: 551-60.
30. Forrest VJ, Kang YH, McClain DE, Robinson DH, Ramakrishnan N. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. Free Radical Biol Med 1994; 16: 675-84.
31. Tada-Oikawa S, Oikawa S, Kawanishi M, Yamada M, Kawanishi S. Generation of hydrogen peroxide precedes loss of mitochondrial

www.SID.ir

Archive of SID

membrane potential during DNA alkylation induced apoptosis. FEBS Lett 1999; 442: 65-9.

32. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian system. FEBS Lett 1991; 281: 9-19.
33. Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJA. Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. Arch Biochem Biophys 1995; 318: 231-40.
34. Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of catalase and thioredoxin addition to sperm incubation medium before in vitro fertilization on sperm capacity to support embryo development. Fertil Steril 1996; 66(6): 1012-17.
35. Nasr-Esfahani MH, Johnson MH. The origin of the reactive oxygen species in mouse culture in vitro. Development 1991; 113: 551-60.
36. Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. Anim Reprod Sci 2004; 82: 13-20.
37. Guérin P, Ménézo Y. Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. Zygote 1995; 3: 333-43.
38. Guerin, P, Gillaud, J, menezo Y, 1995. Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro. Hum. Reprod. 10, 866-872.

www.SID.ir