

Effect of Ethanol on Maturation and Development of Immature Mouse Oocytes

**Eimani H., Ph.D. *, Tahaei L.S., M.Sc., Parivar K., Ph.D., Rezazadeh M., Ph.D.,
Kazemi S., Ph.D., Shahverdi A., M.Sc., Eftekhari P., Ph.D.**

** P.O.Box: 19395- 4644, Embryology Department, Royan Institute, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: To study the effect of ethanol on resumption of meiosis, maturation and development of immature mouse oocytes in vitro.

Materials and Methods: Immature oocytes were dissected from ovary of NMRI strain mouse (6-8 weeks old) and divided into control and experimental groups. The absolute ethanol was imposed to oocytes at doses of 0 (Control), 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4% (v/v) in maturation culture medium (MEM α + 100 mIU/ml rFSH + 7.5 IU/ml hCG + 5% FCS). After 24 hours the matured oocytes were fertilized with spermatozoa in T6 medium and cultured for 5 days. Maturation and embryo formation observed by invert microscope and the results were considered as categorical variables with Chi- Square tests.

Results: The percentage of resumption of meiosis and Metaphase II (MII) in control and the four experimental groups were 76.18%, 84.81%, 83.10%, 74.54%, 78.93% and 60.98%, 71.79%, 68.17%, 60.08%, 64.52%, respectively. The percentage of the oocytes remained at the Germinal Vesicle (GV) stage were higher in 0.2 % (v/v) ethanol than the other groups (23.8%, 15.1%, 16.8%, 25.4%, 21%). The rate of resumption of meiosis and maturation mouse oocytes between control and experimental groups in 0.05 % (v/v) ethanol ($P<0.001$) and 0.1 % (v/v) ethanol ($P<0.05$) were significantly different. At 2-cell stage the rate of embryo formation between control and experimental groups in 0.2 and 0.4 % (v/v) ethanol were significantly different ($P<0.001$).

Conclusions: The present study indicates that 0.05% (v/v) ethanol as solvent during in vitro culture media has positive effects on in vitro maturation of immature mouse oocytes, but same effects on embryonic development has not been detected. In conclusion it has not an inhibitory effect on embryonic development.

Key words: Ethanol, Oocytes, Mouse, In vitro Maturation

تأثیر اتانل بر بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش و تکوین جنینهای حاصل از آن

✉ حسین ایمانی Ph.D.***، لیلا السادات طاهایی M.Sc.***، کاظم پریور Ph.D.***، مجتبی رضازاده Ph.D.***، سعید کاظمی آشتیانی Ph.D.*، عبدالحسین شاهرودی M.Sc.*، پویک افتخاری Ph.D.*

* گروه جنین شناسی پژوهشکده رویان

** گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله

*** گروه زیست شناسی جانوری دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

**** گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: آبان ماه ۸۵، تاریخ پذیرش: دی ماه ۸۵

چکیده

هدف: بررسی تأثیر اتانل بر از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش و تکوین جنینهای حاصل از آن
مواد و روشها: تخمکهای نارس موشهای ماده نژاد NMRI در سن ۶ تا ۸ هفته‌ای از تخمدانها استخراج شد و در گروههای آزمون و گروه کنترل قرار داده شدند. اتانل مطلق در دُزهای صفر (کنترل)، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد (v/v) به محیط کشت MEM- α (Eagle's Minimum Essential Medium) حاوی hCG ۷/۵IU/ml، FSH ۱۰۰ mIU/ml و FCS (Fetal Calf Serum) ۵ درصد اضافه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت تخمکهایی که به مرحله متافاز MII (Metaphase II; MII) رسیده بودند جدا و با اسپرم در محیط T6 لقاح داده شدند و به مدت ۵ روز کشت شدند. فرایند بلوغ و تشکیل جنین توسط میکروسکوپ معکوس مشاهده و نتایج حاصل با آزمون آماری Chi-Square بررسی شد.

یافته‌ها: در گروه کنترل و چهار گروه آزمایشی درصد از سرگیری میوز به ترتیب (۷۶/۱۸، ۸۴/۸۱، ۸۳/۱۰، ۷۴/۵۴، ۷۸/۹۳) و بلوغ تخمک (۶۰/۹۸، ۷۱/۷۹، ۶۸/۱۷، ۶۰/۰۸، ۶۴/۵۲) بود. میزان بلوغ و از سرگیری میوز در گروههای آزمایشی ۰/۰۵ درصد ($p < 0.001$) و ۰/۱ درصد (v/v) اتانل نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. درصد شکل‌گیری جنینهای ۲ سلولی در گروههای آزمون ۰/۲ و ۰/۴ درصد (v/v) اتانل نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که به‌کارگیری اتانل در دُز ۰/۰۵ درصد (v/v) به عنوان حلال بر بلوغ تخمکهای نارس موش تأثیر مثبت دارد اما بر تکوین جنینی تأثیر مشابه دیده نشد. در نتیجه استفاده از این دُز بر تکوین جنینی تأثیر منفی ندارد.

کلید واژه‌ها: بلوغ آزمایشگاهی، موش، تخمک، اتانل

✉ آدرس مکاتبه: تهران، گروه جنین‌شناسی، پژوهشکده رویان،

صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵

E-mail: Eimanih@yahoo.com

مجله علوم تشریح ایران، سال چهارم، شماره ۱۷، زمستان ۸۵، ۳۷۶-۳۶۷

مقدمه

تمام تخمکها از دوران جنینی در پروفاز تقسیم میوز یک متوقف شده‌اند و نارس هستند. با قرارگرفتن این تخمکها در محیط کشت، روند تقسیم مجدداً فعال می‌شود و پس از طی ساعاتی میوز از سر گرفته می‌شود و با رسیدن به مرحله متافاز II بلوغ یافته، قابلیت باروری پیدا می‌کنند [۱]. بلوغ تخمک شامل یک سلسله جریانات پیچیده از فسفوریلاسیون و دیپلاریزاسیون است [۲ و ۳]. کلید اصلی کنترل کننده اتفاقات پی درپی و پیوسته وقایع میوز با دو پروتئین کیناز مهم MAP^۱ و MPF^۲ است. MPF کیناز یک فاکتور سیتوپلاسمی است که هم در سلول‌های میوزی و هم در سلول‌های میتوزی یافت می‌شود. ظاهراً MPF کیناز، تراکم کروموزوم و شکست پوشش هسته را تنظیم می‌کند و به نظر می‌رسد که تشکیل MPF کیناز، مستقل از فعالیت هسته‌ای باشد [۴]. MAP کینازها در تخمکهای مرحله ژرمینال وزیکل وجود دارند که فعالیت قابل توجه شان در بلوغ تخمکهای متافاز MI^۳ ردیابی شده و تا مرحله متافاز II حفظ شده است. نقش آبشاری MAP کیناز، در بلوغ تخمک در خوکه‌ها گزارش شده است. [۵] MPF و MAP کینازها سبب خورد شدن حباب زاینده (GVBD)^۴ تخمکهای گاو [۶]، بز [۷] و خوک [۵] می‌شوند. بلوغ تخمک نارس مستلزم بلوغ هسته و بلوغ سیتوپلاسمی است [۸]. فرآیند بلوغ سیتوپلاسم، به‌عنوان یک پدیده مستقل اتفاق می‌افتد که در آن میزان RNA ذخیره شده و پروتئینها افزایش یافته و میزان cAMP داخل سیتوپلاسمی سلول کاهش می‌یابد. افزایش یا حفظ سطوح بالای cAMP در تخمکها مانع از سرگیری میوز می‌شود. cAMP در داخل تخمک PKA (Protein Kinase A) را فعال می‌کند. PKA

پروتئینهای ضروری برای GVBD را فسفریله می‌کند. فسفریلاسیون مداوم پروتئینها توقف تخمک در میوز را حفظ می‌کند. از سرگیری میوز با کاهش سطوح داخل سلولی cAMP به‌واسطه فسفودی استراز cAMP آغاز می‌شود. فسفودی استراز cAMP ارتباط بین سایونیت‌های کاتالیک پروتئین کیناز A را با سایونیت‌های تنظیمی آن برقرار کرده و اجازه نمی‌دهد PKA عمل فسفوریلاسیون را انجام دهد. پروتئینهای تخمک دفسفوریله شده و میوز دوباره از سر گرفته می‌شود [۹]. وجود کلسیم نیز برای ادامه دادن و تکمیل میوز در تخمکهای در حال بلوغ در محیط کشت ضروری است. فعالیت کلسیم درون تخمک از طریق مسیر فسفوانوزیتول (IP3) آغاز می‌شود و GVBD توسط کلسیم میانجیگری می‌شود، IP3 متابولیزه شدن ذخیره‌های کلسیم داخل تخمکی را تحریک می‌کند. کلسیم آزاد، فسفودی استراز cAMP را فعال می‌کند در نتیجه غلظت cAMP کاهش می‌یابد و GVBD آغاز می‌شود [۴]. در روشهای آزمایشگاهی کشت جنین از اتانل به عنوان یک حلال برای ترکیبات دارویی با حلالیت پایین یا غیرقابل حل در آب همچون رتینوئیدها استفاده می‌شود که تأثیر تحریکی پایینی روی تخمکهای گاوی نشان می‌دهد [۱۰]. افزودن اتانل و سایر الکل‌ها در یک دوره و زمان خاص و در پروتکل‌های انجماد جنین و تخمک، در غلظتهای بسیار بالایی به‌کار می‌رود (۲۵-۱۲ درصد) [۱۱]. این احتمال وجود دارد که اتانل روی تنظیم کنندگان متصل به غشاء از طریق فعالیت کانالهای کلسیم - پتاسیم مانند G پروتئینها [۱۲]، پروتئین کینازها یا فسفاتازها [۱۳]، حالت ردوکس [۱۴]، لیپیدها [۱۵] و فسفولیپیدهای غشایی [۱۶] تحت تأثیر قرار دهد و به این ترتیب بر بلوغ تخمک تأثیر بگذارد. اگرچه به‌طور معمول استفاده از دزهای بالای اتانل بر تکوین جنین مضر است، توجه کمی به این مطلب شده است که غلظتهای کم موجود در محیط کشت می‌تواند به‌عنوان یک

1. Mitogen Activated Protein
2. Maturation Promoting Factor
3. Metaphase I
4. Germinal Vesicle Breakdown

و rFSH ۱۰۰ ml IU/ml، قرار داده شدند.

گروه آزمون یک: ۵۰۷ تخمک نارس در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، hCG ۷/۵ IU/ml و ۱۰۰ ml IU/ml rFSH ۰/۰۵ درصد (v/v) اتانل قرار داده شدند. گروه آزمون دو: ۵۰۹ تخمک نارس در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، hCG ۷/۵ IU/ml و ۱۰۰ ml IU/ml rFSH ۰/۱ درصد (v/v) اتانل قرار داده شدند. گروه آزمون سه: ۴۹۱ تخمک نارس در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، hCG ۷/۵ IU/ml و ۱۰۰ ml IU/ml rFSH ۰/۲ درصد (v/v) اتانل قرار داده شدند. گروه آزمون چهار: ۴۵۱ تخمک نارس در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، hCG ۷/۵ IU/ml و ۱۰۰ ml IU/ml rFSH ۰/۴ درصد (v/v) اتانل قرار داده شدند.

تخمکهای هر گروه به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO₂ ۵ درصد قرار داده شدند و سپس با میکروسکوپ معکوس، مراحل بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز در تمام گروهها بررسی شد. تخمکهای بدون تغییر شکل در هسته را به‌عنوان GV، تخمکهای با هسته شکسته شده به‌عنوان GVBD با نشانه شروع تقسیم میوز و تخمکهای بالغ یا MII شناسایی شدند.

لقاح و تکوین تخمکهای بالغ شده

ابتدا موشهای نژاد NMRI به‌روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند دم اپیدیدیم آنها جدا و به قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت T6 حاوی ۱۵ میکروگرم سرم آلبومین گاوی (BSA, Sigma, A-3311) ^۲ در هر میلی‌لیتر منتقل شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO₂ ۵ درصد انکوبه شدند. با انتقال اسپرمهای فعال و سالم از کناره قطره (در هر میلی‌لیتر

ناقل برای فاکتور رشد معین، هورمون‌ها و یا ظرفیت دهنده میوزی باشد [۱۷]. در این مطالعه تأثیر الکل اتانل (به‌عنوان حلال) در چند دُز مختلف بر روند بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز تخمکهای نارس موش و تکوین جنینهای حاصل از لقاح آن بررسی شد.

مواد و روشها

تهیه تخمکهای نارس

در این تحقیق از موشهای نژاد NMRI در سن ۶ تا ۸ هفته‌ای تهیه شده از انستیتو پاستور (ایران) استفاده شد. موشهای ماده به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شده و تخمدان آنها در شرایط استریل از بدن خارج و پس از انتقال به درون قطرات ۲۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM- α , Sigma, M- (Eagle 0644) MEM- α (Gibco, 10270-106) حاوی FCS ۵ درصد، چربیهای اضافی اطراف تخمدان حذف و سپس به درون قطرات ۳۰۰ میکرولیتری انتقال داده شد. تخمدانها با استفاده از سرنگهای انسولین تشریح شده (Dissect) و تخمکهای نارس حاوی ژرمینال وزیکول همراه با سلولهای گرانولوزا جدا شد. سپس با روش پیپت کردن سلولهای گرانولوزای اطراف آن برداشته شد. (حباب زاینده) تخمکهای نارس هسته‌دار (Germinal Vesicle; GV) با سیتوپلاسم روشن، قشر شفاف (ZP; Zona Pelucida) یکنواخت با فضای پیش زرده‌ای (Perivitelline) مناسب مطابق گروههای زیر انتخاب شدند.

بلوغ تخمک

گروه کنترل: ۴۸۷ تخمک نارس از موشهای طبیعی گرفته شده و در محیط MEM- α حاوی FCS ۵ درصد، hCG ۷/۵ IU/ml

2. Bovine Serum Albumin

1. Fetal Calf Serum

تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرمهای موش نر مجاور شدند. در گروه آزمون دو، از ۵۰۹ عدد تخمک نارس پس از گذشت ۲۴ ساعت در ۱۶/۸ درصد آنها هیچ نشانی از علائم بلوغ دیده نشد. از سرگیری میوز در ۸۳/۱۰ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که از این میزان در ۱۴/۹ درصد آنها هسته شکسته شد و ۶۷/۱ درصد تخمکها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه کنترل اختلاف معنی داری داشت ($p < 0/05$) ولی با گروه آزمون یک در بلوغ و از سرگیری میوز تفاوت معنی دار مشاهده نشد. ۲۴۲ عدد تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرمهای موش نر مجاور شدند.

در گروه آزمون سه، از ۴۹۱ تخمک نارس پس از گذشت ۲۴ ساعت ۲۵/۴۵ درصد آنها هیچ نشانی از علائم بلوغ دیده نشد. از سرگیری میوز در ۷۴/۴ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که از این میزان در ۱۴/۴۶ درصد آنها هسته شکسته شد و ۶۰/۰۸ درصد تخمکها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند که از نظر آماری در بلوغ و از سرگیری میوز با گروه کنترل و آزمون چهار و دو اختلاف معنی داری نداشت. همچنین در بلوغ و از سرگیری میوز نسبت به گروه آزمون یک، اختلاف معنی داری داشت ($p < 0/001$). ۲۱۵ عدد تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرمهای موش نر مجاور شدند.

در گروه آزمون چهار، از ۴۵۱ تخمک نارس پس از گذشت ۲۴ ساعت در ۲۱/۰۶ درصد آنها هیچ نشانی از علائم بلوغ دیده نشد. از سرگیری میوز در ۷۸/۹ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که از این میزان در ۱۴/۴۱ درصد آنها هسته شکسته شد و ۶۴/۵۲ درصد تخمکها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه کنترل، آزمون یک، دو و سه اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در از سرگیری میوز با هیچ یک از گروهها اختلاف معنی داری مشاهده نشد. ۲۱۹ عدد تخمک بالغ در آزمایشگاه با اسپرمهای موش مجاور شدند. (به جدول شماره ۱ و ۲ و شکل‌های ۱ و ۲ مراجعه شود.)

$10^6 \times 2 - 1$ عدد اسپرم) به داخل قطرات T6 حاوی ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر BSA، تخمکهای بالغ شده نیز به قطره منتقل شدند. تخمکها پس از ۶-۴ ساعت از محیط فعلی به قطره‌های محیط T6 حاوی ۴ میلی گرم بر میلی لیتر BSA منتقل شدند. وضعیت تخمکها پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت به وسیله میکروسکوپ معکوس برای ثبت مراحل تکوین جنین مشاهده و نتایج حاصل با آزمون آماری Chi-Square بررسی شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۴۴۵ تخمک نارس و سالم از تخمدان موشهای نژاد NMRI جدا شده و به طور کاملاً تصادفی به یک گروه کنترل و چهار گروه آزمایشی اختصاص داده شد.

در گروه کنترل، ۴۸۷ تخمک قرار داشت که پس از گذشت ۲۴ ساعت در ۲۳/۸ درصد آنها نشانی از علائم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۷۶/۱۸ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که از این میزان ۱۵/۱۹ درصد آنها دارای هسته شکسته و ۶۱ درصد تخمکها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند. تعداد ۲۱۰ عدد از تخمکهای بالغ شده گروه کنترل در آزمایشگاه با اسپرمهای موش نر همان نژاد مجاور شدند که از این میزان لقاح و وضعیت تکامل تخمکهای بارور شده در جدول آمده است. میزان بلوغ و از سرگیری میوز بین گروه کنترل و گروههای آزمون مورد بررسی قرار گرفت که از این قرار است:

در گروه آزمون یک، از ۵۰۷ عدد تخمک نارس پس از گذشت ۲۴ ساعت در ۱۵/۱ درصد آنها هیچ نشانی از علائم بلوغ دیده نشد. از سرگیری میوز در ۸۴/۸۱ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که از این میزان در ۱۳ درصد آنها هسته شکسته شد و ۷۱/۷ درصد تخمکها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه کنترل در از سرگیری میوز و بلوغ تفاوت معنی داری داشت ($p < 0/001$). ۲۵۵ عدد



شکل ۲. مقایسه بلوغ تخمک در گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی، گروه کنترل بدون اتانل، گروه آزمون ۱) ۰/۰۵ درصد اتانل، گروه آزمون ۲) ۰/۱ درصد اتانل، گروه آزمون ۳) ۰/۲ درصد اتانل، گروه آزمون ۴) ۰/۴ درصد اتانل، اختلاف بین گروه آزمون ۲ و کنترل معنی‌دار است (* = p<0.05)، اختلاف بین گروه‌های آزمون یک و کنترل و گروه‌های یک و سه معنی‌دار است (***) (p<0.001).

شکل ۱. مقایسه از سرگیری میوز در گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی، گروه کنترل بدون اتانل، گروه آزمون ۱) ۰/۰۵ درصد اتانل، گروه آزمون ۲) ۰/۱ درصد اتانل، گروه آزمون ۳) ۰/۲ درصد اتانل، گروه آزمون ۴) ۰/۴ درصد اتانل، اختلاف بین گروه آزمون ۲ و کنترل معنی‌دار است (* = p<0.05)، اختلاف بین گروه‌های آزمون یک و کنترل و گروه‌های یک و سه معنی‌دار است (***) (p<0.001).

جدول ۱. مقایسه بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش در محیط MEM-α حاوی ۷/۵IU/ml hCG، ۱mIU/ml

پس از ۲۴ ساعت کشت				تعداد تخمک نارس	تعداد اتانل درصد (v/v)	روند بلوغ گروهها
تعداد MII+ GVBD (%)	تعداد MII (%)	تعداد GVBD (%)	تعداد GV (%)			
۳۷۱	۲۹۷	۷۴	۱۱۶			کنترل
(۷۶/۱۸)	(۶۱)	(۱۵/۲)	(۲۳/۸)		۴۸۷	آزمون ۱
^{a***} ۴۳۰	^{a***} ۳۶۴	۶۶	۷۷	۰/۰۵	۵۰۷	آزمون ۲
(۸۴/۸۱)	(۷۱/۷)	(۱۳)	(۱۵/۱)	۰/۱	۵۰۹	آزمون ۳
^{a*} ۴۲۳	^{a*} ۳۴۷	۷۶	۸۶	۰/۲	۴۹۱	آزمون ۴
(۸۳/۱۰)	(۶۸/۱)	(۱۴/۹)	(۱۶/۸)	۰/۴	۴۵۱	
^{b***} ۳۶۶	^{b***} ۲۹۵	۷۱	۱۲۵			
(۷۴/۵۴)	(۶۰/۰۸)	(۱۴/۴۶)	(۲۵/۴۵)			
۳۵۶	۲۹۱	۶۵	۹۵			
(۷۸/۹۳)	(۶۴/۵۲)	(۱۴/۴۱)	(۲۱/۰۶)			

rFSH ۱۰۰ و FCS ۵ درصد، گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی اتانل با درصد های مختلف (v/v)

GV: حباب زاینده (تخمک نارس هسته‌دار)، GVBD: حباب زاینده خورد شده، MII: تخمک در مرحله متافاز II، MII + GVBD: از سرگیری میوز، اختلاف با گروه کنترل معنی‌دار است، b: اختلاف بین گروه آزمون ۱ با ۳ معنی‌دار است

*: p<0.05 ، ***: p<0.001

جدول ۲: مقایسه تکوین آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش در محیط T6، گروه کنترل و گروههای آزمایشی اتانل با درصدهای مختلف (v/v)

گروهها		کنترل	آزمون ۱	آزمون ۲	آزمون ۳	آزمون ۴
تعداد MII مجاور شده با اسپرم		۲۱۰ (%)	۲۵۵ (%)	۲۴۲ (%)	۲۱۵ (%)	۲۱۹ (%)
۲۴ ساعت	۲ سلولی	۱۴۱ (۶۷/۱۴)	۱۵۲ (۶۰)	۱۴۹ (۶۱/۵۷)	۱۸۷ ^{a***} (۴۰/۴۶)	۹۹ ^{a**} (۴۵/۲۰)
پس از لقاح	جنینهای متوقف شده	۶۹ (۳۲/۸۵)	۱۰۳ (۴۰/۳۹)	۹۳ (۳۸/۴۲)	۱۲۸ (۵۹/۵۳)	۱۲۰ (۵۴/۷۹)
۴۸ ساعت	۴ سلولی	۴۹ (۲۳/۳۳)	۶۰ (۲۳/۵۲)	۶۰ (۲۴/۷۹)	۳۳ ^{a*} (۱۵/۳۴)	۳۷ ^{a*} (۱۶/۸۹)
پس از لقاح	جنینهای متوقف و دژنره شده	۱۶۱ (۷۶/۶۶)	۱۹۵ (۷۶/۴۷)	۱۸۲ (۷۵/۲۰)	۱۸۲ (۸۴/۶۵)	۱۸۲ (۸۳/۱۰)
۷۲ ساعت	۸ سلولی	۲۸ (۱۳/۳۳)	۳۶ (۱۴/۱۱)	۳۳ (۱۳/۶۳)	۲۳ (۱۰/۶۹)	۲۷ (۱۲/۳۲)
پس از لقاح	جنینهای متوقف و دژنره شده	۱۸۲ (۸۶/۶۶)	۲۱۹ (۸۵/۸۸)	۲۰۹ (۸۶/۳۶)	۱۹۲ (۸۹/۳۰)	۱۹۲ (۸۷/۶۷)
۹۶ ساعت	مورولا	۱۹ (۹/۰۴)	۲۳ (۹/۰۱)	۲۲ (۹/۰۹)	۲۰ (۹/۳۰)	۱۳ (۵/۹۳)
پس از لقاح	جنینهای متوقف و دژنره شده	۱۹۱ (۹۰/۹۵)	۲۳۲ (۹۰/۹۸)	۲۲۰ (۹۰/۹۰)	۱۹۵ (۹۰/۶۹)	۲۰۵ (۹۳/۶۰)
۱۲۰ ساعت	بلاستوسیست	۱۹ (۹/۰۴)	۲۳ (۹/۰۱)	۱۸ (۷/۴۳)	۱۶ (۷/۴۴)	۱۶ (۷/۳۰)
پس از لقاح	جنینهای متوقف و دژنره شده	۱۹۱ (۹۰/۹۵)	۲۳۲ (۹۰/۹۸)	۲۲۴ (۹۲/۵۶)	۱۹۹ (۹۲/۵۵)	۲۰۳ (۹۲/۶۹)

MII: تخمک در مرحله متافاز II. a: اختلاف با گروه کنترل معنی دار است

***: p<0.001; **: p<0.01; *: p<0.05

بحث

تکوین جنینی نیز می شود. به طوری که محیط حاوی اتانل ۱ و ۲ درصد تأثیر منفی در بلوغ هسته ای تخمکهای گاوی را پس از گذشت ۲۴ ساعت نشان می دهد [۱۸]. به نظر می رسد به کارگیری غلظتهای مختلف اتانل در مراحل مختلف جنینی رفتار متفاوتی را از خود بروز می دهد که این تأثیرات وابسته به دژ مصرفی می باشد. اتانل به عنوان یک داروی توانمند با خاصیت آمفوفیلیک است که می تواند به خوبی هیدروفوبیکها

در این مطالعه تأثیر اتانل به عنوان حلال با غلظتهای مختلف، صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، و ۰/۴ درصد در بلوغ آزمایشگاهی تخمک نارس موش بررسی شد. تأثیر اتانل بر روی بلوغ و تکوین جنینی باید در یک طیف فیزیولوژیکی تخمین زده شود چرا که غلظت بالای آن نه تنها در پیشرفت میوز و بلوغ تخمکها تأثیر مثبت ندارد بلکه باعث کاهش رشد در مرحله

با باز شدن کانال کلسیمی آندوپلاسمی وارد و پتاسیم خارج می‌شود [۴]. فعالیت کانالهای کلسیمی سلول یا کلسیم درون سلولی بالا رفته، افزایش می‌یابد [۲۵]. احتمال می‌رود که اتانل کانالهای کلسیم وابسته به پتاسیم را به وسیله افزایش حساسیت کانال به ولتاژ یا کلسیم درون سلولی فعال کند [۲۶ و ۲۷]. اتانل می‌تواند فعالیت کانالهای یونی هسته را به وسیله اثر متقابل گلیسین و رسپتورهای گاما آمینوبوتیک اسید A تنظیم کند [۲۸-۲۹]. از طرفی باعث تغییر مورفولوژی میتوکندری کبد و سلولهای پانکراس به وسیله بازآرایی غشاءهای بینابینی یا القای میتوکندریهای غول‌پیکر می‌شود [۳۰].

علیرغم اینکه مطالعه حاضر براساس مورفولوژی هسته تخمک و تکوین جنینی است، به نظر می‌رسد که استفاده از اتانل در دژ پایین، از طریق کانالهای وابسته به کلسیم و پروتئینهای غشایی اعمال اثر می‌کند. نتایج حاصل از این پژوهش ثابت می‌کند که اتانل با غلظت ۰/۰۵ درصد بر از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمک نارس موش و تکوین جنینهای حاصل، تأثیر منفی ندارد.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های طرح حاضر از بودجه طرح بلوغ تخمک معاونت پژوهشی پژوهشکده رویان تأمین شده است. برخورد فرض می‌داریم که تشکر خود را از آقایان دکتر بهاروند، فاخری و پاکزاد و خانمها حسنی و دالمن به خاطر همکاری صمیمانه در تمام مراحل انجام تحقیق و سرکار خانم نبوی جهت انجام امور آنالیز آماری اعلام داریم.

References

1. **Bavister BD.** Oocyte maturation and in vitro fertilization in the Smokey. In Stouffer. RL (ed). The Primary Ovary. Plenum Press, New York, 1987; pp119-37.
2. **Levesque JT, Sirard MA.** Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and

و هیدروفیلیکها، واکنش دهد. اتانل خاصیت فیزیوشیمی غشاهای بیولوژیکی را تغییر می‌دهد، که این تغییر روی باندهای غشایی بوده و سبب فعالیت آنزیمهای متصل شونده به غشاء می‌شود و میزان cAMP را تغییر می‌دهد [۱۹]. P42MAP کیناز، P38MAP کیناز و JN کیناز، یک خانواده از پروتئین کینازهای سرین/ترونین هستند که فعالیتشان بخشی از پاسخ اولیه به انواعی از تحریکات ضروری در رشد سلول، تغییر شکل، تمایز و مرگ سلولی است [۲۰]. MAP کیناز پیام بلوغ را از سیتوپلاسم به هسته تخمک میانجیگری می‌کند و شروع مجدد میوز را القاء می‌نماید. اتانل حاد فعالیت P42/44 MAP کیناز، P38 MAP کیناز و JN کیناز را به وسیله آگونیستهای مختلف در سلولهای کبدی رت کشت شده تمدید می‌کند، در حالی که مصرف اتانل مزمن به طور قابل توجهی مانع فعالیت P42/44MAP کیناز، P38MAP کیناز و JN کیناز القاء شده به وسیله هیپاکتومی جزئی یا به وسیله آگونیستهای مختلف می‌شود [۲۱]. اتانل برای تمدید فعالیت القاء شده آگونیست P42/44MAP کیناز به وسیله یک مکانیسم وابسته به G پروتئین میانجیگری می‌شود [۲۲]. و تعدادی از آنزیمها را به وسیله مکانیسم وابسته به G پروتئین فعال می‌کند. اگرچه طبیعت تأثیر اتانل روی عملکرد G پروتئین به خوبی درک نشده است، ولی عقیده بر این است که اتانل می‌تواند عملکرد و بیان G پروتئین را تحت تأثیر قرار دهد [۲۳]. اتانل حاد می‌تواند به هم ریختگیهایی در ترکیب، ترتیب و اجزاء غشاء القاء کند [۲۴]. کلسیم از دیگر ارکان تکمیل میوز در تخمکهای در حال بلوغ است که به واسطه وجود G پروتئینهای غشایی و از طریق مسیر IP3

cytoplasmic maturation of bovine oocytes. Mol Reprod Dev 1995; 42: 114-21.

3. **Levesque JT, Sirard MA.** Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. Biol Reprod 1996; 55: 1427-36.
4. **Asem Anwar MD.** In vitro maturation of oocytes a

- Review artial 2002; 1-70.
5. **Inoue M, Naito K, Kakayama T, Sato E.** Mitogen activated protein kinase translocates in to germinal vesicle and induces germinal vesicle break down in porcine oocytes. *Biol Reprod* 1998; 58: 130-6.
 6. **Fissore RA, He CI, Vande Woude GF.** Potential role of mitogen activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 1996; 55: 1261-70.
 7. **Dedieu T, Gall L, Crozet N, Sevellec C, Ruffine S.** Mitogen activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 351-8.
 8. **Corturindt r, Smitz J, Vansteirteghem.** A morphological and functioned study of the effect of slow freezing followed by complete in vitro maturation of primary mouse ovarian follicle. *Hum Reprod II* 1996; 12, 2648-55.
 9. **Van Blerkom J, Bell H:** Regulation of development in the fully grown mouse oocyte: Chromosomal mediated temporal and spatial differentiation of the cytoplasm and the plasma membrane. *J Exbyo Exp Morph* 1998; 93: 213-38.
 10. **Hidalgo CO, Diez C.** Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured in vitro with 9-cis- retinoic acid. *Reproduction* 2003; 125, 416-9.
 11. **Vajta G, Holm P, Kuwayama H, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H:** A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS verification. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-8.
 12. **Mullikin-Kilpatrick D, Mehta ND, Hildebrandt JD, Tveistman SN.** Gin is involved in ethanol inhibition of L-type calcium channels in undifferentiated but not differentiated PC-12 cells. *Mol Pharmacology* 1995; 47: 997-1005.
 13. **Reinhardt PH, Chung S, Martin BL, Brautingan DL, Levitan IL.** Modulation of calcium – activated potassium channels from rat brain by protein kinase A and phosphates 2A. *J Neurosci*; 1991; 11: 1627-35.
 14. **Lee S, Park M, So I, Earn YE.** NADH and NAD modulates Ca^{++} - activated K^{+} channels in small pulmonary smooth muscle cells of the rabbit. *Plungers Arch* 1994; 427: 378-80.
 15. **Abadji V, Raines DE, Dalton LA, Miller KW.** Lipid-protein interactions and protein dynamics in vesicles containing the nicotine acetylcholine receptor: A study with ethanol. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1194: 25-34.
 16. **Barry JA, Gawrich K.** Direct NMR evidence for ethanol binding to lipid water interface of phospholipids bilayers. *Biochemistry* 1994; 33: 8082-8.
 17. **Avery B, Hay – Schmidt A, Hyttel P, Greve T.** Embryo development, oocyte morphology and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethyl aminopurine prior to in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 1998; 50: 334-44.
 18. **Avery B, Greve T.** Effects of ethanol and dimethyl sulphoxide on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine cumulus – oocyte complexes 2002; 55: 438-45.
 19. **Klemm WR.** Biological water and its role in the effects of alcohol. *Alcohol* 1998; 15: 249-67.
 20. **Wood D, Parry D, Cheruniski H, Bosch E, Lees E, McMahon M.** Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of raf activity with arrest by p 21^{cip1}.
 21. **Chen, J, Ishac, EJ N, Dent P, Kunos G, Gao, B.** Effects of ethanol on mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase cascades in normal and regenerating liver. *Biochem. J.* 1998; 334, 669-76.
 22. **Della Rocca GJ, biesen TV, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ.** Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. *J. Biological Chemistry*, 1997; 272:No.31, 19125-19132.
 23. **Klinker JF, Lichtenberg B, Damm H, Rommel spachir H.** Activation of pertussis toxin-sensitive G-proteins in membranes of SH-SY5Y human neuroblastoma cells and bovine transducin by ethanol. *Neurosci Lett.* 1996 Jul 26;213(1):25-8
 24. **Wang DC, Taraschi T, Rubin E, Janes N.** Configuration entropy is the driving force of ethanol action on membrane architecture. *Biochimica et biophysica acta.* 1993; 1145: 141-8.
 25. **Latorre R, Oberhauser A, Labarco P, Alvarez O.** Varieties of calcium activated potassium channels. *Annul Rev physiology* 1989; 51: 385-99.
 26. **Wang G, Thorn P, Lemos JR.** A novel large conductance ca_{++} activated potassium channel and current in nerve terminals of the rat neurohypophysis. *J Physiology* 1992; 457: 47-74.
 27. **Dopico A, Anatharam V, Treistman SN.** Ethanol increases the activity of Ca^{++} dependent K^{+} (mslo) channels. Functional interaction with cytosolic Ca^{++} . *J Pharm Exp Ther* 1998; 284: 258-68.

- 28. Mascia MP, Mihic SJ, Valenzuela CF, Schofield PR, Harris RA.** A single amino acid determines differences in ethanol actions on strychnine – sensitive glycine receptors. *Mol Pharmacol.* 1996; 50: 402-6.
- 29. Ye Q, Koltchine V, Mihic SG, Mascia MP, Wick MJ, Finn SE, Harrison NL, Harris RA.** Enhancement of glycine receptor function by ethanol is inversely correlated with molecular volume at position alpha 267. *J Biol Chem*1998; 273: 3314-9.
- 30. Tandler B, Horne WI, Brittenham GM, Tsukamoto H.** Giant mitochondria induced in rat pancreatic exocrine cell by ethanol and iron. *Anat Rec*1996; 245: 65-75.