

## بررسی اثر سیستم‌آمین بر تکوین آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو

رحیم بهشتی<sup>1\*</sup>، جمشید قیاسی قلعه‌کندی<sup>2</sup>، آمنه محمدی‌روشنده<sup>3</sup>

1- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، گروه علوم دامی، شبستر، ایران.  
2- دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه علوم تشریحی، همدان، ایران.  
3- دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه علوم تشریحی، همدان، ایران.

### چکیده

در این مطالعه تأثیر استفاده از سیستم‌آمین بر تکوین آزمایشگاهی اووسیت گاو مورد آزمایش قرار گرفت. تخمدان‌های گاو از کشتارگاه صنعتی تبریز جمع‌آوری و در محلول کلرید سدیم 0/9 درصد حاوی 100 واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر پنی-سیلین G پتاسیم و 100 میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین سولفات در دمای 30-35 سانتی‌گراد ظرف 2-4 ساعت به آزمایشگاه کشت انتقال یافتند. مجموعه اووسیت-کومولوس‌ها در محیط کشت TCM-199 دارای 10 درصد سرم جنینی گاو، 0/23 میلی مولار سدیم پیرووات، 25 میلی مول بیکربنات سدیم، 100 واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین-استرپتومایسین، 1 میکروگرم در میلی‌لیتر استرادیول 17 بتا، 0/5 میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون محرک فولیکول، 100 واحد در میلی‌لیتر گونادوتروپین کورونیک انسان و سطوح صفر (گروه شاهد)، 0/5 و 1 میلی‌مولار سیستم‌آمین به مدت 24 ساعت کشت داده شدند. میزان بلوغ اووسیت‌ها در محیط دارای سطح 0/1 میلی‌مول آنتی‌اکسیدان سیستم‌آمین بالاتر از گروه کنترل بود (به ترتیب 46/66 در مقابل 33/33 درصد). میزان بلوغ اووسیت‌ها در محیط دارای سطح 0/5 میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان (56/55٪) نسبت به گروه کنترل (33/33٪) بالاتر بود ( $P \leq 0/05$ ). میزان اووسیت‌های تکوین نیافته در تیمار سیستم‌آمین 1 میلی مولار در پایین‌ترین حد بود ( $P \leq 0/05$ ). در کل نتایج این تحقیق حاکی از این بود که استفاده از آنتی‌اکسیدان در محیط کشت آزمایشگاهی، می‌تواند میزان بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو را بهبود دهد.

واژگان کلیدی: اووسیت گاو، سیستم‌آمین، تکوین آزمایشگاهی، آنتی‌اکسیدان

تاریخ دریافت: 90/7/18 تاریخ پذیرش: 91/1/30

### مقدمه

در قرن 21 انقلابی در استفاده از پروسه‌های بیوتکنولوژیک در حیوانات اهلی رخ داده است. امروزه تولید آزمایشگاهی رویان (*In vitro embryo production*) به‌عنوان ابزاری در جهت حل مشکلات ناباروری، افزایش سوددهی صنایع پرورش دام و جلوگیری از انقراض نسل جانداران در معرض خطر بکار می‌رود و به‌طور قطع استفاده موفقیت‌آمیز تکنولوژی تولیدمثل کمکی وابسته به تکنولوژی‌های تولیدمثل پایه‌ای مانند بلوغ آزمایشگاهی اووسیت (*In vitro maturation*) IVM، لقاح

\*1- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، گروه دامپزشکی، شبستر، ایران. Rahimbeheshti@yahoo.com

میلی متر اسپیره شده و با استفاده از استریومیکروسکوپ بر اساس مورفولوژی کومولوس طبقه‌بندی شدند. تنها اووسیت‌هایی که حداقل سه لایه متراکم سلول‌های کومولوسی در اطراف آن‌ها بوده و اووپلاسم یکنواخت داشته باشند انتخاب گردیدند.

#### • تکوین آزمایشگاهی اووسیت

مجموعه اووسیت - کومولوس‌ها پنج بار بوسیله محیط TCM-199 هپس دار شسته شده، سپس به محیط کشت TCM-199 انتقال داده شدند. این محیط توسط 10 درصد سرم جنینی گاو، 0/23 میلی مولار سدیم پیرووات، 25 میلی مول بیکربنات سدیم، 100 واحد در میلی لیتر پنی سیلین - استرپتومایسین، 1 میکروگرم در میلی لیتر استرادیول 17 بتا، 0/5 میکروگرم در میلی لیتر هورمون محرک فولیکول، 100 واحد در میلی لیتر گونادوتروپین کوریونیک انسان و سطوح 0/1، 0/5 و یک میلی مولار سیستمین تکمیل شد. برای این منظور اووسیت‌ها در قطره‌های 100 میکرولیتری (20 اووسیت در هر قطره) از محیط مناسب پوشش داده شده با روغن معدنی در دمای 38/5 درجه سانتی‌گراد و اتمسفر حاوی 5٪ دی‌اکسید کربن و حداکثر رطوبت کشت داده شدند (3).

#### • ارزیابی اووسیت‌ها بعد از IVM

قطرات کشت به منظور ثبت تعداد اووسیت‌هایی که به مرحله MII رسیده بودند (بر اساس مشاهده گویچه قطبی)، 17-24 ساعت بعد از کشت مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از استریومیکروسکوپ تعداد تخمک‌های MII شمارش شده و ثبت شدند.

#### • تجزیه و تحلیل آماری

میزان رشد رویانی در مراحل مختلف به درصد تعیین شده، برای بررسی تفاوت مابین درصدها از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه استفاده شد. پس از مشخص شدن آماره F توسط آزمون تجزیه واریانس، مقایسه میانگین در گروه‌های تجربی و

سیستمین از ترکیبات تیولی است که در صورت حضور در محیط کشت موجب القاء تولید گلوکوتایون می‌شود. اما اثر این مواد بر رشد تخمک‌ها یا جنین‌ها بسته به نوع تخمک، نژاد، میزان دوز مصرفی و محیط کشت بکار برده شده متفاوت می‌باشد (4). در سال 2003، گاسپارینی و همکاران از 50 میکرومولار ویا 0/3 میلی مولار سیستمین و سیستمین در محیط TCM استفاده نموده و مشاهده کردند که میزان گلوکوتایون داخل سیتوپلاسمی به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود. در تمام گروه‌های آزمایشی میزان تسهیم بالاتر از گروه شاهد بود (6). در مطالعه‌ای کوبایاشی و همکاران (2006) اثر 100 میکرومولار سیستمین و 100 میکرومولار بتامرکاپتوتانل بر IVF و IVF اووسیت‌های کوچک‌هندی تفاوت معنی‌دار در درصد تکوین و لقاح آزمایشگاهی اووسیت‌ها ما بین گروه‌ها وجود ندارد (9).

هدف از این مطالعه بررسی اثر حضور سیستمین در محیط TCM-199 بر میزان تکوین آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو هولشتاین بود.

#### مواد و روش کار

##### • جمع‌آوری تخمدان

تخمدان‌های گاو از کشتارگاه صنعتی تبریز جمع‌آوری و در بافر فسفات‌ه در دمای 35-30 سانتی‌گراد ظرف 3 ساعت به آزمایشگاه کشت بافت انتقال یافتند. پس از حذف بافت‌های زائد، تخمدان‌ها چندین بار با سرم فیزیولوژی حاوی 100000 واحد در لیتر پنی‌سیلین و 100 میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین شستشو داده شدند.

##### • جمع‌آوری اووسیت‌ها

کمپلکس اووسیت و سلول‌های کومولوسی (Cumulus oophorus complex) به‌وسیله سرنگ 10 میلی لیتری متصل به سرسوزن گیج 18 از فولیکول‌هایی به اندازه 2-8

میزان بلوغ اووسیت‌ها در محیط دارای سطح 0/5 میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان (55/56٪) نسبت به گروه کنترل (33/33٪) بالاتر می‌باشد ( $P \leq 0/05$ ). همان‌طور که در جدول 1-4 قابل مشاهده است، تفاوت موجود در درصد اووسیت‌های تکوین نیافته مابین این دو گروه نیز معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0/05$ ). نتایج تکوین آزمایشگاهی اووسیت‌ها در محیط کشت TCM 199 بعنوان کنترل و این محیط به‌همراه سیستمین 1 میلی‌مولار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در میزان تکوین اووسیت‌ها و درصد اووسیت‌های بالغ نشده مابین این دو گروه می‌باشد ( $P \leq 0/05$ ).

شاهد با آزمون دانکن (Duncan)، در سطح معنی‌دار ( $P \leq 0/05$ ) انجام گردید.

## نتایج

میزان رشد اووسیت‌ها آسپیره شده در محیط TCM 199 بعلاوه سطوح متفاوت سیستمین در جدول 1-4 خلاصه شده است. همان‌طور که در جدول زیر مشاهده می‌شود میزان بلوغ اووسیت‌ها در محیط دارای سطح 0/1 میلی‌مول آنتی-اکسیدان سیستمین بالاتر از گروه کنترل بوده، اما این تفاوت معنی‌دار نبود. از طرفی میزان اووسیت‌های تکوین نیافته در گروه کنترل بالاتر از گروه دارای 0/5 و 1 میلی‌مولار آنتی-اکسیدان می‌باشد ( $P \leq 0/05$ ).

جدول 1-4: درصد تکوین آزمایشگاهی اووسیت‌ها در محیط کشت TCM 199 بعلاوه سیستمین

اووسیت دژنره (%)	اووسیت تکوین نیافته (%)	اووسیت تکوین یافته (%)	محیط کشت دارای
5(11/11)	19(42/22) <sup>ab</sup>	21(46/66) <sup>bc</sup>	سیستمین 0/1 میلی‌مولار
6(13/33)	14(31/11) <sup>bc</sup>	25(55/56) <sup>ab</sup>	سیستمین 0/5 میلی‌مولار
2(4/44)	12(26/66) <sup>c</sup>	31(68/89) <sup>a</sup>	سیستمین 1 میلی‌مولار
7(15/56)	23(51/11) <sup>a</sup>	15(33/33) <sup>c</sup>	بدون سیستمین (کنترل)

a-c تفاوت مابین ستون‌ها معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0/05$ ).

از زمانی که موخری (1972) امکان بالغ شدن و لقاح آزمایشگاهی را در اووسیت‌های موش گزارش نمود، تلاش‌های زیادی بر روی اووسیت‌های گاو و خوک صورت گرفته است که در نهایت منجر به بدنی‌آمدن گوساله زنده از اووسیت‌هایی که در آزمایشگاه بالغ و بارور شده بودند گردید (8).

اکثر روش‌های مورد استفاده در تکنولوژی کمکی تولیدمثلی برای درمان ناباروری مستلزم کشت رویان‌های قبل‌لانه‌گزینی است (16). این روش مخصوصاً برای بسیاری از زنانی که قادر به بالغ کردن اووسیت در داخل بدن خود نیستند (بیماران با تخمدان پلی‌کیستیک) و زنان سرطانی که در معرض دوزهای بالای اشعه یا شیمی‌درمانی برای درمان

درصد تکوین آزمایشگاهی در تیمار سیستمین 1 میلی‌مولار در بالاترین حد بوده و نسبت به تیمارهای کنترل و سیستمین 0/1 میلی‌مولار تفاوت معنی‌دار وجود دارد ( $P \leq 0/05$ ). همچنین تفاوت مابین تیمار سیستمین 0/5 میلی‌مولار و گروه کنترل معنی‌دار بوده ( $P \leq 0/05$ )، اما تفاوت مابین این تیمار با تیمارهای سیستمین 1 و 0/1 میلی‌مولار معنی‌دار نمی‌باشد. میزان اووسیت‌های تکوین نیافته نیز در تیمار کنترل در بالاترین حد و در تیمار سیستمین 1 میلی‌مولار در پائین‌ترین حد می‌باشد ( $P \leq 0/05$ ).

## بحث

افزایش محتوای GSH اووسیت‌ها طی مرحله بلوغ یکی از آسان‌ترین راه‌ها برای افزایش شانس رشد رویان در پستانداران می‌باشد (12).

لوسیانو و همکاران (2006) پس از استفاده از 100 میکرومولار سیستامین بر میزان گلوکوتایون ناحیه‌ای اووسیت‌های رشد یافته در داخل یا خارج بدن گونه اسب مشاهده کردند، میزان گلوکوتایون در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌دار نشان نداد، اما میزان گلوکوتایون و درصد بلوغ در اووسیت‌های رشد یافته در داخل نسبت به خارج بدن به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. همچنین میزان گلوکوتایون در اووسیت‌های حباب زاینده (Germinal-vesicle) به‌طور معنی‌دار بالاتر از اووسیت‌های مرحله متافاز II بود. این تفاوت در نتایج با نتایج تحقیق ما شاید بدلیل تفاوت در گونه دام باشد (11).

یاموچی و ناگای (1999) گزارش نمودند که سیستامین (یک ترکیب تیولی با خاصیت احیاکنندگی) میزان GSH و تشکیل پیش‌هسته نر را حتی در اووسیت‌های بدون سلول‌های کومولوسی افزایش می‌دهد (18). نتایج تحقیقی که توسط چن و همکاران (2005) بر روی اثر 100 میکرومولار سیستامین بر میزان بلوغ اووسیت‌های موش انجام شد نشان داد که سیستامین به‌طور معنی‌داری میزان بلوغ اووسیت‌ها را افزایش داده است (1). در سال 2004 ویتاکر و همکاران ترکیبات گاما گلوتامیل مانند ال-سیستین، ال-سیستامین، ال-گلوتامات، ال-آلفا آمینو بوتیرات را در محیط کشت NCSU23 روی بقا جنین بررسی کردند. در این بررسی میزان پلی‌اسپرمی در گروه ال-آلفا آمینو بوتیرات و بتامراکپتواتانل نسبت به گروه کنترل در کمترین میزان خود بود و میزان بلاستوسیت در این گروه‌ها بالاتر از بقیه گروه‌ها بود (17).

در مطالعه‌ای مشاهده گردید که وجود 100 میکرومولار سیستامین در محیط کشت TCM-199 سبب افزایش غیر معنی‌دار اندازه دوک تقسیم نسبت به گروه کنترل گردید و در محیط دارای 200 میکرومولار سیستامین این افزایش معنی‌دار

قرار می‌گیرند و قبل از درمان تخمدان خود را جراحی می‌کنند، مفید می‌باشد (19).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سیستامین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان میزان تکوین اووسیت‌ها را به متافاز دو افزایش داد. اثر این ماده وابسته به دوز بود و در مقادیر متخلف، نتایج متفاوتی کسب گردید. احتمالاً سیستامین در محیط کشت TCM-199 (محیط غنی از سیستین)، سیستین را به سیستین احیا می‌کند.

همان‌طور که در بخش نتایج ذکر شده است درصد تکوین آزمایشگاهی در تیمار سیستامین 1 میلی‌مولار در بالاترین حد بوده و نسبت به تیمار کنترل تفاوت معنی‌دار وجود داشت ( $P \leq 0/05$ ). سطوح دیگر شامل 0/1 و 0/5 میلی‌مولار نیز سبب افزایش درصد بلوغ آزمایشگاهی در اووسیت‌های گاوی شدند؛ به‌طوری‌که تفاوت مابین تیمارهای سیستامین 0/5 میلی‌مولار و گروه کنترل معنی‌دار بوده ( $P \leq 0/05$ ) و سبب بهبود درصد بلوغ شدند ( $P \leq 0/05$ ). محیط کشت آزمایشگاهی یکی از عوامل بسیار مهم در تولید رویان‌هایی با توان رشد بهتر است که در تحقیقات کشاورزی بیومدیکال و بیوتکنولوژی دامی بکار می‌رود. بیوتکنولوژی رویانی از ضروریات بهبود ژنتیکی گله‌ها و تکنولوژی‌هایی مانند انتقال هسته سلول‌های سوماتیک می‌باشد (5).

عامل احیا کننده گلوکوتایون نقش‌های مهمی طی رشد اووسیت دارد و طی تکوین اووسیت میزان گلوکوتایون افزایش می‌یابد؛ میزان این افزایش در اووسیت‌های بالغ شده در بدن دام نسبت به شرایط آزمایشگاهی بالاتر می‌باشد. بر اساس گزارش هانگ و لی (2007) کاهش GSH در طی بلوغ آزمایشگاهی اووسیت گاوی منجر به متوقف شده کاهش تراکم پیش‌هسته نر در اووسیت می‌گردد (13). از طرفی دیماتوس و همکاران (2002) گزارش کرده‌اند که GSH یک نانوپروتئین سولفیدریلی مهم در سلول‌های پستانداران است نقش مهمی در حفاظت سلول از آسیب اکسیداتیو دارد (4). بنابراین در عمل

8. Hanada, A., Shioya, Y., Suzuki, T. (1986): Birth of calves after non-surgical transfer of bovine IVM/IVF oocytes. Proc of 78<sup>th</sup> meeting of the Jap Sot Zootech Sci. p: 18.
9. Kubayashi, M., Lee, E.S., Fukui, Y. (2006): Cysteamine or  $\beta$ -mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology. 65: 1191-9.
10. Lonergan, P., Flynn, M.O.K., Boland, P. (1998): Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. Theriogenology. 51: 1565-1576.
11. Luciano, A.M., Goudet, G., Perazzoli, F., Lahuec, C., Gerard, N. (2006): Glutathione content and glutathione peroxidase expression in in vivo and in vitro matured equine oocytes. Mol. Reprod. Dev. 73: 658-666.
12. Nagai, T. (1996): In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. Anim. Reprod.. Sci. 42: 153-163.
13. Hong, J., Lee, E. (2007): Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. Theriogenology. 68: 728-735.
14. Telfer, E.E., Binnie, J.P., Mc Caffery, F.H., Campbell, B.K. (2000): *In vitro* development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. Mol. Cell Endocrinol. 163: 117-23.
15. Van der Auwera, I., Pijnenborg, R., Konincke, P.R. (1999): The influence of *in vitro* culture versus stimulated and untreated oviductal environment on mouse embryo development and implantation. Hum. Reprod. 14(10): 2570-2574.
16. Walker, R.J., Hawk, H.W., Nel, N. (1992): Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale. J. Cell. Biochem. 49: 113-120.
17. Whitaker, B. D., and Knight, J. W. (2004): Exogenous  $\gamma$ -glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture and viability of porcine oocytes and embryos. Theriogenology 62: 311-322

بود که نشانه اثر مثبت این آنتی‌اکسیدان بر روی تشکیل دوک‌های تقسیم می‌باشد (1). در نهایت می‌توان نتیجه گرفت استفاده از ترکیبات تیولی مانع سیستم‌های تک‌تک‌ها آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو می‌تواند به بلوغ بهتر اووسیت‌ها کمک نماید.

### فهرست منابع

1. روشنده، آ.، 1385. بررسی اثر سیستم‌های بر اسکلت سلولی و میزان تک‌تک‌های جنین‌های دو سلولی حاصل از IVM تخمک موش در محیط‌های کشت مختلف. پایان نامه دکترای تخصصی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران.
2. Alvarez, J.G., Storey, B.T. (1998): Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids phospholipids of human spermatozoa. Mol. Reprod. 42: 334-346.
3. Balasubramanian, S., Rho, G.J. (2007): Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. Ani. Reprod. Sci. 98: 282-292.
4. De Matos, D.G., Gasparrini, B., Pasqualini, S.R., Thompson, J.G. (2002): Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. Theriogenology. 57: 1443-1451.
5. Faber, D.C., Ferrel, L.B., Metzger, J., Robl, J.M., Kasinathan, P. (2004): Agro-economic impact of cattle cloning. Cloning Stem Cells. 6: 198-207.
6. Gaspmini, B., Sayoud, H., Neglia, G., de Matos, D.G., Donnay, I., Zicarelli, L. (2003): Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. Theriogenology. 60: 943-952.
7. Gaurin, P., Mouatassim, S., Menezo, Y. (2001): Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum. Reprod. Update. 7: 175-89.

18. Yamauchi, N., Nagai, T. (1999): Male pronucleus formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. Biol. Reprod. 61: 828-833.
19. Zofia, Lubarda. (2005): The role of glutathione in mammalian gametes. Reprod. Biol. 5(1): 5-17.

Archive of SID