

## بررسی پروفایل بیان ژنهای MCT1 و MCT3 در اووسیت و جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش به صورت تازه و کشت داده شده

\*\*Ph.D.، طاهره اسماعیلپور<sup>\*</sup>؛ احمد حسینی<sup>M.Sc.</sup>؛ بهرام کاظمی<sup>Ph.D.</sup>؛ فاطمه چهره‌آسا<sup>M.Sc.</sup>؛ بیترکی<sup>Ph.D.</sup>

\* مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دانشگاه کوئینزلند، استرالیا

تاریخ وصول: اردیبهشت ماه ۸۴، تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۸۴

### چکیده

هدف: بررسی پروفایل بیان ژنهای MCT1 و MCT3 در اووسیت لقاح نیافته؛ اووسیت لقاح یافته و جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش به صورت *In vitro* و *In vivo*

مواد و روشها: اووسیتهای لقاح یافته؛ لقاح نیافته؛ جنینهای دو سلولی؛ مورولا و بلاستوسیست در ساعتهاي ۲۴؛ ۴۸؛ ۷۲؛ ۹۶ ساعت پس از تزریق hCG به داخل محیط کشت M2 جمع آوری و شستشو داده شدند. برای کشت جنینها؛ بعد از جمع آوری زیگوتها ۱۸ ساعت پس از تزریق hCG و برداشتن سلولهای کومولوس در محیط کشت KSOM؛ در دو گروه بدون گلوکز (KSOM-G) و با ۱mM گلوکز (SKSOM+G) کشت داده شدند. یک گروه از جنینهای G، ۶۵ ساعت پس از تزریق hCG به مدت ۲ ساعت در معرض ۲۷ میلی مولار گلوکز قرار گرفتند. این گروه تحت عنوان pulse glucose نامیده شدند. مورولا از هر سه گروه در ۹۰ ساعت بعد از تزریق hCG جمع آوری شد. mRNA از اووسیتهای لقاح نیافته (۸۰ عدد)، اووسیتهای لقاح یافته (۸۰ عدد)، جنینهای دو سلولی (۸۰ عدد)، مورولا (۱۱۷ عدد)، بلاستوسیست (۱۰۶ عدد)، جنینهای کشت داده شده در محیط کشت با گلوکز (۴۰ عدد)، بدون گلوکز (۴۰ عدد)، پالس PCR گلوکز (۴۰ عدد) توسط کیت RNeasy mini column استخراج شد. سپس نسخه برداری معکوس و PCR انجام گرفت. محصولات UV transiluminator روی ژل آکارز ۲ درصد الکتروفورز شد و توسط اتیدیوم برومید رنگ آمیزی و باند مربوط به DNA توسط دستگاه worklab مشاهده شد. با استفاده از نرم افزار worklab؛ دانسیته گروههای مورد نظر تعیین و با هم مقایسه شدند.

یافته‌ها: ژن MCT3 در هیچ‌کدام از مراحل اووسیت و جنینی چه به صورت تازه و چه به صورت کشت داده شده بیان نشده است. نسخه‌های ژن MCT1 در اووسیتهای لقاح نیافته؛ لقاح یافته؛ جنین دو سلولی؛ مورولا؛ بلاستوسیست؛ گروه پالس گلوکز (Pulse G) و در محیط کشت با گلوکز (Plus G) قابل مشاهده بود. اما این ژن در جنینهای کشت داده شده در محیط کشت بدون گلوکز (Minus G) بیان نشد. نسبت دانسیته DNA در جنین دو سلولی مینیمم و در بلاستوسیست ماکریم است.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داده است که ژن MCT1 که در انتقال پیروات و لاکتات در محیط کشت نقش بهسزایی دارد در اووسیت و جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش بیان می‌شود. حضور mRNA ژن MCT1 در جنینهای کشت داده شده با گلوکز یا در معرض گلوکز در مرحله دو تا چهار سلولی؛ پیشنهاد می‌کند که در معرض قرار گرفتن جنین به گلوکز در اثنای حرکت در اویداکت در حفظ بیان این ژن مهم است؛ این امر ممکن است در جهت جریان مداوم پیروات و لاکتات از غشای سیتوپلاسمی و تداوم متابولیسم باشد.

کلید واژه‌ها: انتقال دهنده‌های مونوکربوکسیلیک، جنین قبل از لانه‌گزینی موش، بیان ژن، RT-PCR

## مقدمه

متابولیکی بافتی است که در آن بیان شده‌اند [۱۸].

MCT1 در بیشتر بافت‌های بدن یافت می‌شود؛ در حالی که فقط در MCT3 Retinal Pigmented Epithelium (RPE) وجود دارد [۱۵، ۳۰ و ۳۳]. موقعیت منحصر به فرد MCT3 در مطابق با نقش آن در تنظیم سطح لاکتات در رتینای خارجی است و همراه با MCT1 از تجمع آب و تورم و در نتیجه جدا شدن شبکیه از RPE جلوگیری می‌کند [۱۵ و ۳۰]. طی مراحل اولیه کلیواژ جنینهای انسان و موش، پیروات و لاکتات و نه گلوكز، مهمترین منبع انرژی و بنابراین از اجزای مهم محیط کشت جنین هستند. در مراحل اولیه جنینی بخشی از پیروات اکسیده شده و به لاکتات تبدیل می‌شود. انتقال لاکتات در جنین مکانیسم خوبی را برای انتقال پروتون فراهم می‌کند و بنابراین در تنظیم pH سلولی و حفظ نسبت  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  در سیتوپلاسم نقش بهسازی دارد [۳] و بیشتر پروسه‌های داخل سلولی مانند سنتز پروتئین، عملکرد میتوکندری و تنظیم سیتواسکلتال به pH حساسند [۶].

علاوه بر فعالیت اکسیداتیوی؛ پیروات با واکنش با هیدروژن پراکسید و برداشت آمونیاک و تبدیل به آلانین از مراحل اولیه جنینی به عنوان radical scavenger عمل می‌کند [۳ و ۱۸].

مطالعات مشخص کرده است که جنینها در متابولیسم خود در حدود مرحله هشت سلولی، مورولا؛ دارای سوئیچی از مصرف پیروات به گلوكز هستند [۱۳]. این مسئله جالب است که در معرض قرار دادن جنین به گلوكز فقط طی تقسیمات اولیه کلیواژی؛ برای برطرف کردن نیاز آن به گلوكز طی مرحله انتقال از مورولا به بلاستوسیست کافی است. در محیط کشتی که فقط حاوی لاکتات و پیروات است، جنینها در مرحله مورولا به طور کامل متوقف می‌شوند و گلوكز جزء اساسی محیط کشت برای تکامل به مرحله بلاستوسیست است [۲].

پیامهای سیگنالی؛ بیان ژنهای؛ موقعیت و فعالیت مولکولهای انتقال دهنده منتهی به این سوئیچ؛ هنوز به صورت یک معمای باقی مانده است. این مطالعه به منظور روشن کردن جزء کوچکی از این معما و برای بررسی پروفایل بیان ژنهای MCT1 و MCT3 در اووسیت و جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش صورت گرفته است.

اسیدهای مونوکربوکسیلیک به ویژه اسید لاکتیک که محصول نهایی گلیکولیز است، در متابولیسم سلول نقش مهمی دارند [۱۵، ۲۱ و ۲۵]. بعضی از بافت‌های با میتوکندری کمتر مانند عضلات اسکلتی سفید، سلولهای قرمز خون و بعضی از سلولهای توموری تحت شرایط فیزیولوژیک، برای تهیه ATP خود از پروسه گلیکولیز استفاده می‌کنند و همه بافت‌های دیگر تحت شرایط هیپوکسی یا ایسکمیک این مسیر را انتخاب می‌نمایند. در این سلولها برای تداوم گلیکولیز، باید اسید لاکتیک تولید شده از سلول خارج شود؛ در غیر این صورت غلظت داخل سلولی آن زیاد شده، pH سلولی کاهش می‌یابد و این امر منجر به توقف گلیکولیز می‌شود [۱۵، ۲۱ و ۳۳]. بر عکس بعضی بافت‌های دیگر؛ اسید لاکتیک را به عنوان منبع سوخت اصلی مصرف می‌کنند. این مسئله در مورد کبد هم صادق است که طی Cori cycle از لاکتات به عنوان اصلی‌ترین ماده برای گلوكونوژنیز استفاده می‌کند [۳۳]. در pH سلولی، اسیدلاکتیک تولید شده به آنیون لاکتات تبدیل می‌شود و این مولکول باردار که با انتشار آزاد قادر به عبور از سلول نیست؛ به مکانیسم سلولی خاصی نیاز دارد که همان proton-linked monocarboxylate transporters هستند که در موجودات زنده از باکتری تا انسان وجود دارند [۱۵، ۷ و ۲۱].

گرچه MCTs بیشتر لاکتات را انتقال می‌دهند ولی برای انتقال تعدادی از مونوکربوکسیلات‌های دیگر مانند پیروات، کتون با دی استواتستات، بتا هیدروکسی بوتیرات و استات ضروری هستند و بنابراین نقش مهمی در متابولیسم پستانداران و ارتباط متابولیکی بین سلولها دارند [۱۱، ۱۵، ۲۱ و ۲۵]. مطالعات مشخص کرده است که بیان mRNA هر کدام از چهارده ایزوفرم MCT منحصر به بافت‌های خاصی است [۱۵ و ۳۳]. این مسئله مشخص شده است که همه اعضای خانواده MCT دارای ۱۰-۱۲ هلیکس داخل غشایی و دو ترمینال N و C داخل سلولی و یک لوپ بزرگ داخل سلولی بین قطعات ۷، M6، ۷ و ۱۲ لوپهای کوتاه بین دیگر سگمنتها هستند [۳۱].

در بین ایزوفرم‌های مختلف MCT؛ فقط چهار ایزوفرم اول تعیین جزئیات شده‌اند. خصوصیات آن‌ها در ارتباط با نیاز

## مواد و روشها

### جمع آوری اووسیتها و جنینها

اووسیتهای لقاح نیافته از موشهای ماده نژاد (bae سن ۶-۸ هفته‌ای) که به آن ۱۰ واحد PMSG (marine serum gonadotropin, Folligan, Intervet P/L hCG, Intervet Australia) تزریق شده بود به دست آمدند. برای به دست آوردن اووسیتهای لقاح نیافته، جنینهای دو سلوی، مورو لا و بلاستوسیست موشهای تزریق شده با هورمونهای فوق را بالا فاصله در قفس موش نر بالغ از همان نژاد قرار داده و روز بعد برای اطمینان از جفتگیری، پلاک واژینال کنترل شد. موشهای ماده را با روش cervical dislocation کشته، اووسیتهای لقاح نیافته و جنینهای فوق الذکر در ساعتهاي ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت پس از تزریق hCG از اویداکت و رحم به داخل محیط کشت فلاش و شستشو داده شدند. این محیط کشت M2 [۱۰] است که فاقد گلوكز بوده (M2-G) ولی حاوی ۰/۳۳ mM سدیم پیروات و ۴g/1BSA است.

در اووسیتهای لقاح نیافته و لقاح نیافته برای حذف سلوهای کومولوس از کمپلکس کومولوس - اووسیت از هیالورونیداز M2-G و سه محوله شستشو با ۵ mg/L درصد کشته شد.

برای کشت جنینها، زیگوتها ۱۸ ساعت پس از تزریق hCG جمع آوری شده، سلوهای کومولوس از اطراف آنها برداشته شده و در قطرات با نسبت ۱ embryo/ $\mu$ l در زیر oil mineral در ۳۷ درجه سانتی گراد و با استفاده از Cook, QLD Australia ۹۰ درصد CO<sub>2</sub> و ۵ O<sub>2</sub> درصد و N<sub>2</sub> درصد کشت داده شدند.

جنینهای فوق در محیط کشت KSOM [۸] در دو گروه بدون گلوكز (KSOM-G) و با ۱mM گلوكز (KSOM+G) کشت داده شدند. یک گروه از جنینهای KSOM-G ۶۵ ساعت پس از تزریق hCG (حدود مرحله ۲ تا ۴ سلوی) به مدت ۲ ساعت در معرض ۲۷ میلی مولار گلوكز قرار گرفتند. این گروه تحت عنوان pulse glucose نامیده شدند. مورو لا از هر سه گروه در ۹۰ ساعت بعد از تزریق hCG جمع آوری شدند.

## واکنش فسخه برداری معکوس

از اووسیتهای لقاح نیافته (۸۰ عدد)، اووسیتهای لقاح نیافته (۸۰ عدد)، جنینهای دو سلوی (۸۰ عدد)، مورو لا (۱۱۷ عدد) بلاستوسیست (۱۰۶ عدد)، جنینهای کشت داده شده در محیط کشت با گلوكز (۴۰ عدد)، بدون گلوكز (۴۰ عدد)، پالس گلوكز (۴۰ عدد) mRNA توسط کیت RNeasy mini column (شرکت کیاژن) استخراج شد. واکنش نسخه برداری معکوس با ۱ میکروگرم RNA، ۱ × RT buffer، ۱ × dNTP ۰/۵ mM، ۲۰ mM DTT، ۴۰ unit superscript RNasine، ۳ mM MgCl<sub>2</sub>، ۷۵ mM KCl تشکیل دهنده RT buffer × ۵ شامل Tris-HCl pH ۸/۳ بود. بدین صورت که برای اتصال پرایمر به mRNA، ترکیب این دو به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت ۷۲ درجه قرار داده شد. واکنش به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت ۴۲ درجه قرار گرفت و سپس superscript III به آن اضافه شد؛ برای سنتز cDNA به مدت یک ساعت در همان دما قرار داده شد. به منظور غیرفعال کردن آنزیم؛ واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت ۷۰ درجه قرار داده شد. برای حذف آلدگی احتمالی DNA آنزیم III از گروه کنترل حذف شد. از ژن β-actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

## واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction)

واکنش PCR شامل Taq DNA polymerase (معادل تعداد جنین به تفکیک در جدول ۱ آورده شده است) ۰/۵ mM dNTP، ۱/۷۵ mM MgCl<sub>2</sub>، ۱×PCR buffer [(۱۰ mM Tris-HCl، ۵۰ mM KCl، pH=۹/۰ ۱۰۰] at ۴۰ °C، ۰/۱% Triton®X-۱۰۰] پیکوگرم از پرایمر ژنهای ۲۰ MCT1 و MCT3 (جدول ۲) هستند که در حجم ۰ میکرولیتر انجام شد.

این واکنش در چند مرحله انجام گرفت؛ پرهدناتوراسیون در ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه، سپس دنا توراسیون ۹۴ درجه در یک دقیقه، annealing در حرارت ۵۷ درجه به مدت یک دقیقه و extension در ۷۲ درجه به مدت ۳۵ ثانیه در ۴۰ سیکل تکرار شد و مرحله extension نهایی در ۷۲ درجه برای ده دقیقه صورت گرفت.

جدول ۱. معادل تعداد اوسویت و جنین استفاده شده در RT-PCR

	UO	FO	2-C	Morulac	Blastocyst	+G	-G	PG
تعداد اوسویت و جنین استفاده شده در RT	۸۰	۸۰	۸۰	۱۱۷	۱۰۶	۴۰	۴۰	۴۰
معال تعداد اوسویت و جنین استفاده شده در PCR	۲/۶	۲/۶	۲/۶	۳/۹	۳/۵	۱/۳	۱/۳	۱/۳

UO: اوسویت لقاح نیافته، FO: اوسویت لقاح یافته، C: جنین دو سلولی، +G: جنین کشت داده شده در محیط با گلوكز،

PG: جنین کشت داده شده با شوک گلوكز

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده

پرایمر	توالی پرایمر پیشرو	توالی پرایمر پرسرو	طول پرایمر (جفت بار)	درجه حرارت آنلیتیک	عدد Accession در بانک زنی
MCT1	5'-GCCTGAGCAAGTCAAGCTGA-3'	5'-TCAGACCTCGGATCCAGTAC-3'	357	57	AFO58056
MCT3	5'-CATCTTCTACCTTGCTGGCT-3'	5'-CTGTGAACAGGGTCAAC-3'	411	55	AF019111
$\beta$ -actin	5'-cgtagggccgcctaggcacca-3'	5'-TTGGCCTAGGGTCAGGGGG-3'	243	57, 59	NM007393

شده قابل تعیین و دارای ۳۷۵ نوکلئوتید است (شکل ۱).

بیان ژن MCT1 در جنینهای کشت داده شده در محیط کشت بدون گلوكز (Minus G)، مشاهده نمی شود. اما در گروه پالس گلوكز (Pulse G) و در محیط کشت با گلوكز (Plus G) این ژن بیان می شود (شکل ۱).

نسبت دانستیه نوار DNA مربوط به محصول PCR ژن MCT1 در اوسویتهای لقاح نیافته، اوسویتهای لقاح یافته؛ جنین دو سلولی، مورو لا و بلاستوسیست به ترتیب ۲۹۶۲۳/۸۰؛ ۲۸۷۸۶/۱؛ ۴۰۴۸/۵۶؛ ۵۱۶۲/۵۶ و ۴۰۳۴/۸ است؛ یعنی میزان بیان این ژن در اوسویتها تقریباً مساوی است. در حالی که مرحله دو سلولی یعنی زمان فعال شدن ژنوم جنینی میزان بیان آن کم و در مراحل بعدی تکامل افزایش می یابد (نمودار ۱).

دانستیه نوار DNA مربوط به محصول PCR ژن MCT1 در جنینهای کشت داده شده در محیط کشت با گلوكز، بدون گلوكز و پالس گلوكز به ترتیب ۱/۱۲۰۶۶؛ ۰۹۰۹؛ ۰۵۵ و ۰۹۰/۱۵ و ۷۳۵۶/۱ است و با مقایسه آنها با دانستیه نوار DNA مربوط به محصول PCR ژن بتا - اکتین در محیطهای فوق می توان به تأثیر مثبت گلوكز بر میزان بیان این ژن دست یافت (نمودار ۲).

ژن MCT3 در هیچکدام از مراحل اوسویت و جنینی چه به صورت تازه و چه به صورت کشت داده شده بیان نشده است (شکل ۲).

## ژل الکتروفورزیس

محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و توسط اتیدیوم برومید رنگ آمیزی شد و نوار DNA حاصله توسط دستگاه UV Transluminator UV مشاهده شد.

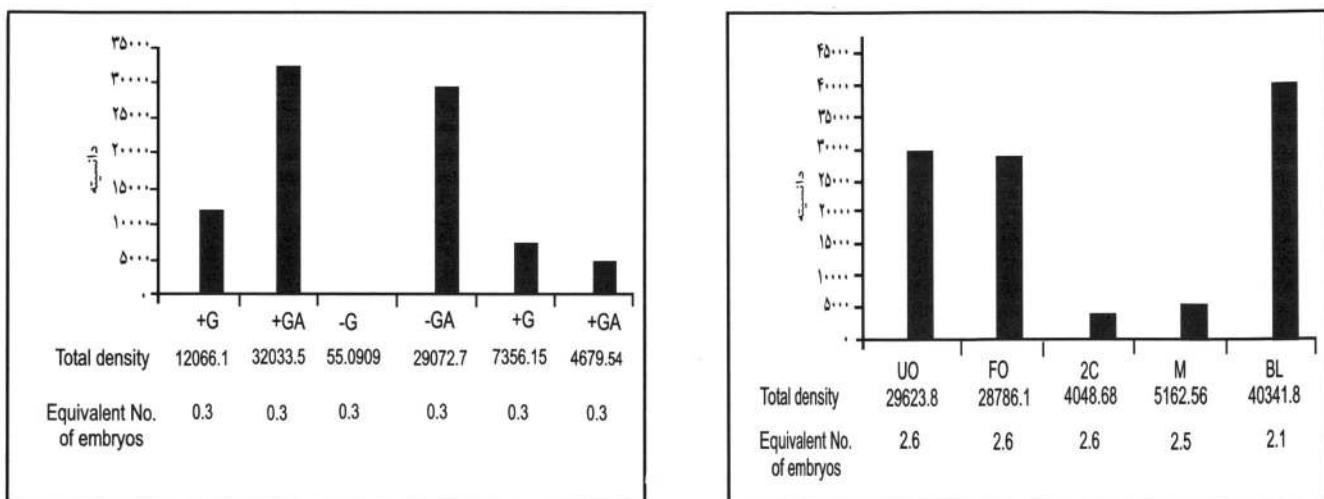
در هر واکنش، گروه کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شد. برای کنترل منفی RT، آنزیم superscript III حذف شد و برای PCR کنترل دوباره از  $\beta$ -actin استفاده شد. در کنترل منفی به جای cDNA، آب اضافه شد و به منظور کنترل مثبت به cDNA eye (Retinal Pigmented Epithelium) قرار گرفت.

## تعیین دانستیه محصول PCR

این کار با استفاده از نرم افزار worklab طراحی شده توسط شرکت UV I tech انگلستان و مربوط به دستگاه transluminator انجام گرفت.

## یافته ها

بیان ژنهای MCT1 و MCT3 در گروههای مورد استفاده در جدو ۳ نشان داده شده است. محصول PCR ژن MCT1 در اوسویتهای لقاح نیافته، لقاح یافته و تمامی مراحل جنینی ذکر



نمودار ۲. دانسیته نوار PCR DNA محصول ژنهای MCT1 و (A) در جنینهای کشت داده شده در محیط با گلوكز (+G)، بدون گلوكز (-G) و در حدود مرحله چهار سلولی در معرض پالس گلوكز قرار داده شده (+G)

نمودار ۱. دانسیته نوار PCR ژن MCT1 در اووسیت لقاح نیافته (UO)؛ اووسیت لقاح یافته (FO)؛ جنینهای دو سلولی (2C)؛ مورولا (M) و بلاستوسیست (BL) به صورت In vivo

جدول ۳. پروفایل بیان ژنهای MCT1 و MCT3 در اووسیت و جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش

	UO	FO	2-C	مورولا	بلاستوسیست	+G	-G	PG
MCT1	+	+	+	+	+	+	-	+
MCT3	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -actin	+	+	+	+	+	+	+	+

UO: اووسیت لقاح نیافته، FO: اووسیت لقاح یافته، 2C: جنین کشت داده شده در محیط با گلوكز، G: جنین کشت داده شده

در محیط بدون گلوكز، PG: جنین کشت داده شده با شوک گلوكز

### MCT1 در اکثر بافت‌های بدن به صورت گسترده حضور دارد

[۲۰ و ۲۲] و می‌تواند تبادل یک مونوکربوکسیلیک را با مونوکربوکسیلیک دیگر یا با یک پروتون در هر دو جهت غشای سلولی کاتالیز کند [۱۶].

پیروات و لاکتات از اجزای مهم محیط کشت هستند. فعال بودن آنزیم لاکتات دی هیدروژناز و حضور MCT1 در مراحل اولیه تکامل جنینی، تبدیل پیروات به لاکتات را تسهیل و در نتیجه مکانیسم خوبی را برای انتقال پروتون فراهم می‌کند و بنابراین در تنظیم pH سلولی و حفظ نسبت NAD<sup>+</sup>/NADH در سیتوپلاسم نقش به سزایی دارد [۱، ۳ و ۲۴].

پیروات برای اولین تقسیم کلیوژی جنین موش لازم است [۱ و ۲۴] بنابراین وجود mRNA ژن MCT1 در مراحل اولیه جنینی جای تعجب ندارد. نتایج به دست آمده این ژن در جنینهای تکامل یافته در In vivo با یافته‌های هروبل (Herubel)

### بهث

ژنهای MCT طی تکامل اووسیت و جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش به صورت افتراقی (differentially) بیان می‌شود [۱۸].

ژن MCT3 فقط در سطح قاعده‌ای - خارجی اپی‌تلیوم رنگیزهای شبکیه چشم (RPE) بیان می‌شود و پاسخگوی خروج لاکتات به عروق کوروئیدال است [۳۰ و ۳۳]. بیان این ژن در هیچ‌کدام از مراحل اووسیت و مراحل تکاملی جنین قبل از لانه‌گزینی موش مشاهده نشد که مطابق با یافته‌های هروبل (Herubel) و همکارانش است [۱۸]، اما هارдинگ (Harding) و همکارانش [۱۷] بیان این ژن را در جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش گزارش کردند. این مسئله قابل ذکر است که بعد از کلون کردن cDNA MCT3 مربوط به MCT3 واقعی از ۱۹۹۸ در سال مشخص شده MCT3 که قبلاً کلون شده، همان MCT4 کنونی است [۳۲].

مشاهدات هستند [۵]. فرض شده است که مهمترین دلیل برای ناتوانی جنین در استفاده از گلوکز به عنوان منبع سوخت قبل از مرحله compaction، محدودیت در پروسه انتقال گلوکز است [۲۸].

هرچند که یک پالس گلوکز در حدود مرحله دو سلولی از بلوکه شدن مورولا جلوگیری می‌کند اما در صد بلاستوسیستهای حاصل میزان هچینگ (Hatching) و تعداد سلولهای بلاستوسیست در این گروه پایین است [۲۶]. دانسته بیان ژن MCT1 در این گروه نیز در مقایسه با زیگوت‌های کشت داده شده در محیط با گلوکز پایین تر است (نمودار ۲).

نتایج این تحقیق نشان داده است که ژن MCT1 که در انتقال پیروات و لاکتان در محیط کشت نقش به سزاوی دارد در اووسیت و جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش بیان می‌شود. با مقایسه دانسته DNA در اووسیتها و جنینهای قبل از لانه‌گزینی به صورت *In vivo* کمترین میزان آن در جنین دو سلولی یعنی همگام با فعال شدن ژنوم جنینی و بیشترین مقدار در بلاستوسیست قابل مشاهده است.

حضور mRNA ژن MCT1 در جنینهای کشت داده شده با گلوکز یا در معرض گلوکز در مرحله دو تا چهار سلولی، پیشنهاد می‌کند که در معرض قرار گرفتن جنین به گلوکز در اثنای حرکت در اویداکت در حفظ بیان این ژن مهم است. این امر ممکن است در جهت جریان مداوم پیروات و لاکتان از غشای سیتوپلاسمی و تداوم متابولیسم باشد. زیگوت‌های کشت داده شده در محیط کشت بدون گلوکز کاهش در مصرف پیروات و گلوکز را نشان می‌دهند و در نهایت دژنره می‌شوند [۲۶ و ۲۷]. این داده‌ها تکمیل کننده گزارش‌های قبلی مبنی بر کنترل مشابه بیان ژن GluT3<sup>1</sup> توسط در معرض قرار گیری قبلی در برابر گلوکز است و این فرضیه را حمایت می‌کند که گلوکز به عنوان یک سیگنال تغذیه‌ای در مراحل اولیه کلیوژی عمل می‌کند و اجازه بیان آنزیمهای متابولیک مورد نیاز برای تکامل بعدی را می‌دهد [۲۸ و ۲۹].

تحقیق بیشتر در این زمینه برای درک احتیاجات متابولیکی جنینهای قبل از لانه‌گزینی و اصلاح محیط‌های کشت و موفقیت ART (Assisted Reproductive Technology) به عنوان یک وسیله علمی و پزشکی مفید نیاز است.

## تقدیر و تشکر

نگارندگان مقاله از همکاریهای دکتر م. پانتالئون (M. Pantaleon) و س. جانسون (S. Jonsen) بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه کوئینزلند کشور استرالیا به دلیل همکاریهای بسیاری و مشاوره علمی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

و هارдинگ (Harding) [۱۷] مطابقت دارد و ژن MCT1 در اووسیت لقادیر نیافته، اووسیت لقادیر یافته، جنینهای دو سلولی، مورولا، بلاستوسیست و جنینهای کشت داده شده در محیط با گلوکز، بدون گلوکز و پالس گلوکز بیان می‌شود. با مقایسه دانسته DNA در اووسیتها و جنینهای قبل از لانه‌گزینی به صورت *In vivo*؛ کمترین میزان آن در جنین دو سلولی یعنی همگام با فعال شدن ژنوم جنینی و بیشترین مقدار در بلاستوسیست قابل مشاهده است.

کشت جنینها از مرحله زیگوت در محیط فاقد گلوکز باعث عدم بیان mRNA ژن MCT1 می‌شود. بر عکس حضور mRNA ژن MCT1 در جنینهای کشت داده شده با گلوکز، یا در معرض گلوکز در مرحله دو تا چهار سلولی، پیشنهاد می‌کند که در معرض قرار گرفتن جنین به گلوکز در اثنای حرکت در اویداکت در حفظ بیان این ژن مهم است. این امر ممکن است در جهت جریان مداوم پیروات و لاکتان از غشای سیتوپلاسمی و تداوم متابولیسم باشد. زیگوت‌های کشت داده شده در محیط کشت بدون گلوکز کاهش در مصرف پیروات و گلوکز را نشان می‌دهند و در نهایت دژنره می‌شوند [۲۶ و ۲۷]. این داده‌ها تکمیل کننده گزارش‌های قبلی مبنی بر کنترل مشابه بیان ژن GluT3<sup>1</sup> توسط در معرض قرار گیری قبلی در برابر گلوکز است و این فرضیه را حمایت می‌کند که گلوکز به عنوان یک سیگنال تغذیه‌ای در مراحل اولیه کلیوژی عمل می‌کند و اجازه بیان آنزیمهای متابولیک مورد نیاز برای تکامل بعدی را می‌دهد [۲۸ و ۲۹].

جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش در اثنای مراحل اولیه تکامل، قبل از اینکه گلوکز به عنوان ماده انرژی زا توسط مورولا و بلاستوسیست انتخاب شود، ترجیحاً پیروات را مصرف می‌کنند [۲۶ و ۲۷]. شواهد حاکی از آن است که گلوکز در مراحل اولیه بیشتر در سنتز گلیکوزن و برای گلیکوزیله شدن پروتئینهای درگیر در متراکم شدن جنین استفاده می‌شود. بلوکه شدن گلیکولیز از اینکه گلوکز به عنوان یک منبع انرژی قرار گیرد، چلوگیری می‌کند [۲۴]. در این زمان گلوکز به عنوان عامل شرکت کننده در متابولیسم به حساب نمی‌آید؛ بلکه بیشتر نقش تنظیمی و تعدیلی را بازی می‌کند. پدیده‌های سطح سلولی یا پروسه‌های سیگنالی داخل سلولی دو توجیه قابل بیان برای این

1. Glucose transporter 3

## References

1. **Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP.** The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967; 58: 560-7.
2. **Brown JJ, Whittingham DG.** The roles of pyruvate & lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F1 hybrid mice in vitro. *Development* 1991; 112: 99-10.
3. **Butcher L, Coates A, Martin KL, Rutherford AG, Leese HJ.** Metabolism of pyruvate by the early human embryo. *Biol Reprod* 1998; 58: 1054-5.
4. **Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I.** An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1989; 86: 679-88.
5. **Chatot CL, Lewis-Williams J, Torres I, Ziomek CA.** One minute exposure of 4-cell mouse embryos to glucose overcomes morulae block in CZB medium. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 407-12.
6. **Dale B, Menezo X, Cohen J, Dimatteo L, Wilding M.** Intracellular PH regulation in the human oocyte. *Hum Reprod* 1998; 13: 964-70.
7. **Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Broer S.** The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 2000; 350: pt1 219-27.
8. **Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD.** Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod* 1994; 50: 1027-33.
9. **Friesemeier EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ.** Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 2003; 278: 40128-35. Abstract
10. **Fulton BP, Whittingham DG.** Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature* 1978; 273: 149-51
11. **Galic S, Schneider HP, Broer A, Deitmer JW, Broer S.** The loop between helix 4 and helix 5 in the monocarboxylate transporter MCT1 is important for substrate selection and protein stability. *Biochem J* 2003; 376: 413-22.
12. **Garcia CK, Brown MS, Pathok RK, Goldestein JL.** cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *J Biol Chem* 1995; 270: 1843-9.
13. **Gardner DK, Leese HJ.** Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured preimplantation mouse embryos. *Hum Reprod* 1986; 1: 25-7.
14. **Gibb CA, Poronnik P, Day ML, Cook DL.** Control of cytosolic PH in two-cell mouse embryos: role of H-lactate cotransporter and Na/H exchange. *Am Physiol Soc* 1997; C404-C19.
15. **Halestrap AP, Price NT.** The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 1999; 343: pt2 281-99.
16. **Halestrap AP, Meredith D.** The SLC16 gene family from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 2004; 447: 619-28.
17. **Harding EA, Day ML, Gibb CA, Janson MH, Cook DL.** The activity of the -H-monocarboxylate cotransporter during preimplantation development in the mouse. *Pflugers Arch* 1999; 438: 397-404.
18. **Herubel F, El Mouatassim SE, Guerin P, Frydman R, Menezo Y.** Genetic expression of monocarboxylate transporters during human and mouse oocyte maturation and early embryonic development. *Zygote* 2002; 10: 175-81.
19. **Hobbs JC, Kaye PL.** Glycine transport in mouse eggs and preimplantation embryos. *J Reprod Fert* 1985; 74: 77-86.
20. **Jackson VN, Price NT, Carpenter L, Halestrap AP.** Cloning of the monocarboxylate transporter isoform MCT2 from rat testis provides evidence that expression in tissues is species-specific and may involve post-transcriptional regulation. *Biochem J* 1997; 324 (Pt 2): 447-53.
21. **Juel C, Halestrap AP.** Lactate transport in skeletal muscle- role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol* 1999; 517.3: 633-42.
22. **Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MB, Barclay AN, Halestrap AP.** CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 2000; 19: 3896-904.
23. **Lane M, Gardner DK.** Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 2000; 62: 16-22.
24. **Leese HJ, Barton AM.** Pyruvate & glucose uptake by

- mouse ova preimplantation embryos *J Reprod Fertil* 1984; 72: 9-13.
25. Lin RY, Vera JC, Chaganti RS, Gold DW. Human monocarboxylate transporter 2(MCT2) is a highly affinity pyruvate transporter. *J Biol Chem* 1998; 273: 28959-65.
26. Martin KL, Leese HJ. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 436-43.
27. Martin KL, Leese HJ. Role of developmental factors in the switch from pyruvate to glucose as the major exogenous energy substrate in the preimplantation mouse embryo. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11: 425-33.
28. Pantaleon M, Kaye PL. Glucose transporters in preimplantation development. *Rev Reprod* 1998; 3: 77-8.
29. Pantaleon M, Harrey MB, Pascae WS, James DE, Kaye PL. Glucose transporter GLUT3: Ontogeny, targeting and role in the mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3795-800.
30. Philp NJ, Ochriotor JD, Rudog C, Muramatsu T, Linser. 2003 Loss of MCT1, MCT3 and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Invest Ophtalmol Vis Sci* 1997; 44: 1305-11.
31. Price NI, Jackson VN, Halestrap AP. 1998 Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem* 1997; 329: 321-8.
32. Wilson MC, Jackson VN, Heddle C, Price NT, Pilegaard H, Juel C, Bonen A, Montgomery I, Hutter OF, Halestrap AP. Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *J Biol Chem* 1998; 273: 15920-5.
33. Zhao C, Wilson CM, Schuit F, Halestrap AP, Rutter GA. Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas. *Diabets* 2001; 50: 361-6.



**شکل ۱.** پروفایل بیان ژن MCT1 در اووسیت و جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش با استفاده از RT-PCR  
ستون ۱) اووسیت لقاح نیافته، ستون ۲) اووسیت لقاح یافته، ستون ۳) جنین دوسلولی، ستون ۴) مورولا، ستون ۵) بلاستوسیست، ستونهای ۶ و ۷) مورولا در محیط کشت بدون گلوکز، ستونهای ۸ و ۹) مورولا در محیط کشت بدون گلوکز با پالس گلوکز در ۶۵ ساعت بعد از تزریق hCG، ستون ۱۰) کنترل مثبت، ستون ۱۱) کنترل منفی و (M) مارکر. محصولات MCT1 دارای اندازه ۳۷۵ bp و محصولات بتا-اکتین دارای ۲۴۰ bp بودند. ستونهای ۱۱، ۱۰، ۹) مربوط به بتا-اکتین هستند.

**شکل ۲.** پروفایل بیان ژن MCT3 در اووسیت و جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش با استفاده از RT-PCR

ستون ۱) اووسیت لقاح نیافته، ستون ۲) اووسیت لقاح یافته، ستون ۳) جنین دوسلولی، ستون ۴) مورولا، ستون ۵) بلاستوسیست، ستون ۶) مورولا در محیط کشت با گلوکز، ستون ۷) مورولا در محیط کشت بدون گلوکز، ستون ۸) مورولا در محیط کشت بدون گلوکز با پالس گلوکز در مرحله ۶ ساعت بعد از تزریق hCG، ستون ۹) کنترل مثبت، ستون ۱۰) کنترل منفی و (M) مارکر. محصولات MCT3 دارای اندازه ۴۱۱ bp بودند.

