مقاله تحقیقی

# تأثیر بتامرکاپتواتانل بر از سرگیری میوز، بلوغ و تکوین آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش

حسین ایمانی .Ph.D*، فاطمه حسنی .B.Sc**، سیدعلی حائری روحانی .Ph.D***، محمدحسین نصراصفهانی .Ph.D****
اعظم دالمن .B.Sc**، مجتبی رضازاده .Ph.D*****، سعید کاظمی آشتیانی .Ph.D******، عبدالحسین شاهوردی .M.Sc*****
حسین بهاروند .M.Sc******

* استادیار گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی بقیةا... و گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان
** دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران و
گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان
*** استاد گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران
**** استادیار پژوهشی گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان
***** استاد گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
****** استادیار پژوهشی گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: فروردین ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۸۳

## چکیده

**هدف:** مطالعه تأثیر بتامرکاپتواتانل بر از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش و تکوین جنینهای حاصل از آن
**مواد و روشها:** تخمکهای نارس از موشهای سوری نژاد NMRI (۶-۴ هفته‌ای) در شرایط استریل جدا شدند. تخمکهای حاصل در چهار گروه دسته‌بندی شدند. تخمکهای گروه کنترل در محیط MEM-$\alpha$ (Minimum Essential Medium Eagle) حاوی 5FCS درصد، گروه یک در محیط MEM-$\alpha$ حاوی 5FCS درصد و بتامرکاپتواتانل (۱۰۰ میکرومولار)، گروه دو در محیط MEM-$\alpha$ حاوی 5FCS درصد، ۷/۵IU hCG، ۱۰۰mIU rFSH و تخمکهای گروه سه در محیط MEM-$\alpha$ حاوی FCS ۵ درصد hCG، ۷/۵IU، mIU ۱۰۰rFSH و ۱۰۰ میکرومولار بتامرکاپتواتانل قرار داده شدند. تخمکها برای بلوغ به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با $Co_2$ ۵ درصد قرار گرفتند. تخمکهای بالغ شده (Metaphase II; MII) در کنار اسپرم موشهای نر همان نژاد قرار گرفتند.
**یافته‌ها:** از سرگیری میوز در گروههای آزمون یک و سه نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p=0.009$ و $p=0.001$). میزان از سرگیری میوز در گروه کنترل و گروههای آزمون یک و دو و سه به ترتیب ۷۴/۲۰، ۸۲/۷۱، ۸۴/۴۹ و ۸۵/۴۹ درصد بود. همچنین در بلوغ آزمایشگاهی گروههای آزمون یک و سه نسبت به گروه کنترل ($p=0.01$ و $p=0.007$) اختلاف معنی‌داری وجود داشت که به ترتیب ۵۹/۷۷، ۶۹/۴۹، ۵۲/۷۴، ۷۰/۲۲ درصد در گروههای کنترل و آزمون مشاهده شد. نرخ تشکیل جنین در روز چهارم در گروه آزمون یک نسبت به گروههای دیگر در همین روز بیشترین اختلاف را داشت و در گروهها به ترتیب ۵۴/۱۶، ۷۴، ۴۱ و ۴۳ درصد بود و گروه آزمون یک نسبت به گروه کنترل ($p=0.001$)، گروه دو ($p=0.000$) و گروه سه ($p=0.000$) اختلاف معنی‌داری را نشان داد.
**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بتامرکاپتواتانل (۱۰۰ میکرومولار) در از سرگیری میوز، شکسته شدن هسته و آزادشدن اولین جسمک قطبی، بلوغ آزمایشگاهی، لقاح و تکوین جنینها تأثیر دارد.
**کلیدواژه‌ها:** بلوغ آزمایشگاهی، تخمک نارس، موش، بتامرکاپتواتانل

آدرس مکاتبه: تهران، گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان
صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴ Email:info@Royaninstitute.org

## مقدمه

غلظت اکسیژن در رحم و لوله‌های رحمی، حدود ۸-۵ درصد است [۱]. رحم و لوله‌های رحمی حاوی مواد بسیاری هستند که تکوین جنین را پایدار می‌کند یا فاکتورهای توکسمی را از بین می‌برند. کشت جنین پستانداران در آزمایشگاه در محیط حاوی $Co_2$ پنج درصد انجام می‌گیرد. کشت جنین موش [۲و۳] گوسفند [۴]گاو [۸-۵] و انسان [۹ و ۱۰] در فشار کم اکسیژن (۵ درصد) نشان داده است که سرعت تکوین این جنینها نسبت به جنینهای در فشار $O_2$ بالاتر (۲۰ درصد) بالاتر است. غلظت بالای اکسیژن در طی کشت آزمایشگاهی، به دلیل افزایش انواع اکسیژن فعال (ROS: Reactive Oxygen Species) در سیتوپلاسم جنینهای درحال تکوین، توانایی تکوین را کاهش می‌دهد [۱۱ و ۱۲]. این ترکیبات شامل پراکسیدهیدروژن ($H_2O_2$)، آنیونهای سوپراکسید ($O_2^{\cdot}$) و رادیکالهای هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) هستند که برای غشاهای سلولی [۱۳] و DNA [۱۴] زیان‌آور بوده و باعث آپوپتوزیس می‌شوند [۱۵]. بدین منظور برای بهبود تکوین جنینهای کشت شده آزمایشگاه به محیط کشت آنها مواد ویژه‌ای برای کاهش ROS اضافه می‌کنند [۱۶] برای مثال اضافه کردن سوپراکسیدا دسموتاز [SOD] یا کاتالاز تکوین جنین اسب [۳ و ۱۷] و گاو [۱۸] را بهبود می‌بخشد. اضافه کردن سیستئین یا بتامرکاپتواتانل به محیط کشت جنینهای گاو به واسطهٔ سنتز گلوتاتیون همین نقش را ایفا می‌کنند[۱۹ و ۲۰]. ویتامین E هم آسیبهای غشای سلولی حاصل از ROS را سرکوب می‌کند و تکوین جنینهای گاو را در آزمایشگاه بهبود می‌بخشد [۲۱]. فشار اکسیداتیو نتیجه تعادل بین تولید ROS و مکانیسمهای دفاعی آنتی‌اکسیدانهای سلولی است. از نظر فیزیولوژیکی تولید ROS طی متابولیسم سلولی رخ می‌دهد. تحت شرایط فیزیولوژیک، فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری منبع اصلی داخل سلولی ROS است که ۲ درصد از اکسیژنهای تولید شده به طور ناقص احیا می‌شوند و تولید $O_2^{\cdot -}$ [۲۲] می‌کنند. فشار اکسیداتیو باعث بسیاری از آسیبها از جمله پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، اکسیداسیون آمینواسیدها و اسیدهای نوکلئیک، آپوپتوزیس و نکروز می‌شود [۲۳]. ROS داخل سلولی در سلولهای کشت داده شده در محیط آزمایشگاه نسبت به داخل بدن از غلظت بیشتری برخوردار است. در مراحل اولیه کلیواژ جنینهای موش نسبت به جنینهای داخل بدن حاوی مقادیر بالاتری از $H_2O_2$ و $O^{\circ -}$ هستند که احتمالاً باعث توقف اولیه تکوین جنینها می‌شود [۲۶-۲۴].

علاوه بر مکانیسمهای آنزیمی مانند SOD[1] و کاتالاز، مکانیسمهای غیرآنزیمی از قبیل گلوتاتیون (GSH)[2]، ویتامین‌های C و E، تحریک‌کننده‌های سنتز گلوتاتیون همچون ترکیبات تیولی (سیستئامین، بتامرکاپتواتانول] می‌توانند تأثیرات ROS را خنثی کنند[۲۳و۲۷و۲۸]. همچنین تأثیر مثبت آنتی‌اکسیدانهای غیرآنزیمی دیگر از قبیل تیورین (Taurine)، EDTA[3]، و هیپوتیورین (hypotaurine) و پیروات گزارش شده است [۲۱ و ۲۲].

ROS بسته به نوع سلول باعث مرگ سلولی به‌واسطهٔ نکروز و آپوپتوز می‌شود. مرگ سلولی به واسطه آپوپتوزیس یک پدیده فیزیولوژیکی است که طی پروسه‌های متعددی از جمله جنین‌زایی رخ می‌دهد. پدیدهٔ آپوپتوز جنینهای تولید شده در in vitro و in vivo به‌واسطهٔ محصولات ROS مایع بلاستوسل و سطح گلوتاتیون داخل سلولی ایجاد می‌شود[۳۱-۲۹]. بیرنه (Byrne) و همکاران نشان دادند که آپوپتوز جنینهای ۱۶-۹ سلولی گاوی به‌دلیل ROS است و از مرحله مورولا افزایش می‌یابد [۳۲].

بلوغ تخمک پستانداران مستلزم بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی است. تغییرات مولکولی بی‌شماری در بلوغ سیتوپلاسمی از جمله فسفریلاسیون پروتئین‌ها و فعال شدن راههای متابولیکی ویژه دخالت دارد [۳۳]. در تخمک گاو میزان گلوتاتیون بعد از IVM (in vitro maturation) نشانه‌ای برای بلوغ سیتولاسمی است [۳۴]. سنتز گلوتاتیون در طی بلوغ تخمک موش [۳۵]، هامستر [۳۶] و گاو [۳۷] گزارش شده است. بنابراین سطوح گلوتاتیون یافت شده در انتهای بلوغ تخمکها به عنوان یک شاخص بیوشیمیایی خوبی برای بقای (viability) تخمک است [۳۸]. از طرفی ترکیبات تیولی با وزن مولکولی کم از جمله سیستئامین و بتامرکاپتواتانل سنتز

1- Superoxide Dismutase 2- Glutathione

3- Ethylenediaminetetraacetic acid

گلوتاتیون داخل سلولی را افزایش می‌دهند و از این طریق سرعت تکوین جنین را بهبود می‌بخشند [۳۹]. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر بتامرکاپتواتانل بر روند بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش و تکوین جنینی است.

## مواد و روشها

### تهیه تخمکهای نارس

در این تحقیق از موشهای سوری نژاد NMRI ۶-۴ هفته‌ای تهیه شده از انستیتورازی کرج (ایران) استفاده شد. موشهای ماده با قطع نخاع کشته شده و تخمدان آنها در شرایط استریل خارج و پس از انتقال درون قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM-$\alpha$ حاوی FCS ۵ درصد، چربیهای اضافی اطراف تخمدان حذف و با استفاده از سرنگهای انسولین پاره (Dissect) شده و تخمکهای نارس و حاوی ژرمینال وزیکول همراه با سلولهای گرانولوزا جدا شد. سپس با روش پیپت کردن سلولهای گرانولوزای اطراف آن برداشته شد. تخمکهای نارس هسته‌دار (Germinal) با سیتوپلاسم روشن، قشر شفاف (ZP: Zona Pellucida) یکنواخت با فضای پیش زرده‌ای (pervettline) مناسب برای ۴ گروه انتخاب شدند.

### بلوغ تخمکها

گروه کنترل : ۳۴۵ تخمک نارس از موشهای طبیعی گرفته شده و در محیط MEM-$\alpha$ حاوی FCS۵ درصد قرار داده شد (گروه کنترل).

گروه آزمون یک : ۲۹۵ تخمک نارس در محیط MEM-$\alpha$ حاوی FCS ۵ درصد، ۱۰۰ میکرومولار بتامرکاپتواتانل قرار داده شد.

گروه آزمون دو: ۲۳۷ تخمک نارس در محیط MEM-$\alpha$ حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵IU hCG و ۱۰۰mIU rFSH قرار داده شد.

گروه آزمون سه: ۲۶۲ تخمک نارس در محیط MEM-$\alpha$ حاوی FCS ۵ درصد، ۷/۵IU hCG و ۱۰۰mIU rFSH و ۱۰۰ میکرومولار بتامرکاپتواتانل قرار داده شد.

تخمکهای هر گروه به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با $5Co_2$ 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 با عنوان تخمکهای GV یا نارس (Germinal Vesicle)، تخمکهای با هسته شکسته شده به عنوان GVB(Germinal Vesicle Breakdown) با نشانهٔ شروع تقسیم میوز و تخمکهای دارای جسم قطبی به عنوان تخمکهای بالغ یا MII(Metaphase II) شناسایی شد.

### لقاح و تکوین تخمکهای بالغ شده

ابتدا موشهای سوری نژاد NMRI به روش قطع نخاع کشته شد، دم اپیدیدیم آنها جدا و قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت T6 حاوی ۴ میکروگرم سرم آلبومینی گاوی (BSA: Bovin Serum Albumin) در هر میلی‌لیتر منتقل شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی $Co_2$ ۵ درصد انکوبه شد. با انتقال اسپرمهای فعال و سالم از کنار قطره (در هر میلی‌لیتر ۱×۱۰۵ عدد اسپرم) به داخل قطرات محیط T6 حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، BSA تخمکهای بالغ شده نیز به آنها منتقل شد. تخمکها پس از ۶-۴ ساعت از محیط فعلی به قطره‌های محیط T6 حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA منتقل شدند. وضعیت تخمکها پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به‌وسیله میکروسکوپ معکوس برای ثبت مراحل تکوین جنین بررسی شد و نتایج حاصل با آزمون آماری Chi-square بررسی شد.

## یافته‌ها

در این مطالعه ۱۱۳۹ تخمک نارس و سالم از تخمدان موشهای سوری جدا شد و به طور تصادفی به ۳ گروه آزمایشی و یک گروه کنترل تقسیم‌بندی شد. همانطور که در جدول ۱ آمده است. در گروه کنترل ۳۴۵ تخمک جدا شد که پس از ۲۴ ساعت، در ۲۵/۷۹ درصد آنها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. ازسرگیری میوز در ۷۴/۲۰ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که از این میزان هسته ۱۴/۲۹ درصد هسته آنها شکسته شد و ۵۹/۷۱ درصد تخمکها تا مرحله MII پیشرفته و

بالغ شدند. میزان بلوغ در گروه کنترل با گروههای آزمون یک و سه (p=0.01 و p=0.007) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت. ۱۴۴ عدد تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرمهای موش نر مجاور (Inseminate) شدند. میزان لقاح و وضعیت تکامل تخمکهای بارور شده در جدول ۱ آمده است.

در گروه آزمون یک از ۲۹۵ تخمک نارس سالم پس از ۲۴ ساعت در ۱۷/۲۸ درصد تخمکها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۸۲/۷۱ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که از این میزان هسته ۱۳/۲۲ درصد شکسته و ۶۹/۴۹ درصد تخمکها تا مرحله MII پیش رفته و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه کنترل و گروه آزمون دو (p=0.01 و p=0.000) تفاوت معنی‌داری داشت. ۱۰۸ تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرمهای موش نر مجاور شدند (جدول ۱).

در گروه آزمون دو؛ ۲۳۷ تخمک نارس سالم جدا شد. پس از ۲۴ ساعت در ۲۵/۷۳ درصد آنها نشانی از علایم شروع میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۷۴/۲۶ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که از این میزان، هستهٔ ۲۱/۵۱ درصد آنها شکسته شد و ۵۲/۷۴ درصد آنها تا مرحله MII پیش رفته و بالغ شدند که با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت و با گروههای آزمون یک و سه اختلاف معنی‌داری داشت (p=0.000 و p=0.000) . ۷۰ عدد تخمک بالغ شده با اسپرم موش نر مجاور شدند (جدول ۱).

در گروه آزمون سه؛ ۲۶۲ تخمک نارس سالم جدا شده پس از ۲۴ ساعت در ۱۴/۵ درصد آنها نشانی از علائم میوز دیده نشد. از سرگیری میوز در ۸۵/۴۹ درصد تخمکهای نارس مشاهده شد که از این میزان، هستهٔ ۱۵/۲۶ درصد آنها شکسته شد و ۷۰/۲۲ درصد آنها تا مرحله MII پیش رفتند و بالغ شدند که از نظر آماری با گروه کنترل و گروه آزمون دو اختلاف معنی‌داری داشت (p=0.07 و p=0.000). ۱۱۴ تخمک بالغ شده در آزمایشگاه با اسپرمهای موش نر مجاور شدند (جدول ۱).

## بحث

در این مطالعه تأثیر بتامرکاپتواتانل با غلظت ۱۰۰ میکرومتر در بلوغ آزمایشگاهی تخمک موش بررسی شد. این ماده یک ترکیب تیولی با وزن مولکولی کم است. اضافه کردن این ماده به محیط کشت بلوغ تخمکهای نارس موش، از سرگیری میوز، بلوغ و تکوین جنینهای حاصل را بهبود می‌بخشد. لانِ (Lane) [۴۰] نشان داد که تخمکهای بالغ شده در اکسیژن ۲/۵ یا ۵ درصد از لحاظ بلوغ هسته‌ای، لقاح و تکوین اختلاف قابل ملاحظه‌ای نداشتند اما لقاح تخمکهای بالغ شده در اکسیژن ۱۰ درصد کاهش یافت. ونگ (Wang) و همکاران [۴۱] گزارش دادند که تکوین جنینهای گاو تا مرحله بلاستوسیست در اکسیژن ۵ درصد بیشتر از اکسیژن ۱۰ درصد است به نظر می‌رسد که غلظت بالاتر اکسیژن ممکن است از رسیدن جنینهای گاو به مرحله بلاستوسیست جلوگیری کند.

رادیکالهای آزاد اکسیژن هنگام IVM و کشت جنینها تولید می‌شوند. همچنین طی چرخه انتقال الکترون برای تولید ATP (آدنوزین تری‌فسفات) در متابولیسم گلوکز در میتوکندری، اگر اکسیژن به صورت ناقص احیا شود به جای آب رادیکال آزاد تولید می‌شود [۴۲].

$H_2O_2$ ، $OH^{\circ}$ را آزاد می‌کند که با دیگر مولکولهای سیتوپلاسمی واکنش شدید نشان می‌دهد و باعث آسیب سلولی می‌شود. عملکرد $H_2O_2$ در تنظیم بیان ژن دخالت دارد و غلظتش به‌وسیله اکسیدازهای مربوط تنظیم می‌شود [۴۳]. فعالیت اکسیدازی به غلظت $O_2$ محیطی بستگی دارد و غلظت مناسب اکسیژن برای فعالیت این اکسیدازها بیشتر از مقداری است که در بدن موجود است [۴۴]. دو آنزیم اصلی، NADPH اکسیداز و گزانتین اکسیداز در جنینها ROS تولید می‌کنند [۲۵ و ۴۴]. همانطوری‌که در جنینهای هامستر و جنینهای حاصل از تخمک بالغ شده گاوی گزارش شده است مقدار $H_2O_2$ تولید شده در جنینهای کشت شده تحت فشار اکسیژن ۲۰ درصد است اندازه دم DNA در جنینهای کشت شده تحت فشار اکسیژن ۲۰ درصد بیشتر از جنینهای تحت فشار اکسیژن ۵ درصد است [۸]. مشخص شده است که $OH^{\circ}$ به نیمی از دزوکسی ریبوزومهای DNA حمله می‌کند و سبب شکسته شدن زنجیره DNA و خطا در جفت شدن بازها در طی پلیمراسیون DNA می‌شود [۴۵]. برای مثال ۸ داکسی گوانین که به‌وسیله اکسیداسیون گوانین تولید می‌شود با آدنین جفت می‌شود [۴۶]. وجود تک‌رشته

**جدول ۱: مراحل بلوغ و تکوین آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش در محیط FCS ۵ درصد + MEM$\alpha$ در گروههای کنترل و آزمون**

| گروههای آزمایش | تعداد تخمک نارس | دوزمصرفی بتامرکاپتواتانل | پس از ۶۴ ساعت | | | تعداد تخمکهای بالغ | ۶۴ ساعت پس از مجاوت | | | ۴۸ ساعت پس از مجاوت | | | ۷۶ ساعت پس از مجاوت | | | | ۹۶ ساعت پس از مجاوت | | | | | | ۱۶۰ ساعت پس از مجاوت | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | MII درصد | GVB درصد | GV درصد | | ۴سلولی درصد | ۲سلولی درصد | ۸سلولی درصد | مولار | ۴سلولی درصد | ۲سلولی درصد | مولار | ۸سلولی درصد | ۴سلولی درصد | ۲سلولی درصد | lateB | early B | مولار | ۸سلولی درصد | ۴سلولی درصد | ۲سلولی درصد | hatching درصد | late B | early | مولار | ۸سلولی درصد | ۴سلولی درصد | ۲سلولی درصد |
| کنترل | ۳۴۵ | ۰ | ۲۰۶<br>۵۹/۷۱ | ۵۰<br>۱۴/۴۹ | ۸۹<br>۲۵/۷۹ | ۱۴۴<br>۶/۲۵ | ۱۷<br>۱۱/۶ | ۷۴<br>۵۱/۳۸ | ۹<br>۶/۲۵ | | ۶۴<br>۴۴/۴۴ | ۳۲<br>۲۲/۲۲ | | ۱۷<br>۱۱/۸ | ۲۷<br>۱۸/۷۵ | ۵۰<br>۰/۶ | ۱<br>۲ | ۳<br>۱۵/۹ | ۲۳<br>۶/۲ | ۹<br>۱۶/۶۶ | ۲۴<br>۲۶/۳۸ | ۳۸<br>۰/۶ | ۱<br>۱/۳ | ۲<br>۴/۸ | ۷<br>۱۱/۸ | ۱۷<br>۲ | ۳<br>۱۳/۸۵ | ۲۰ |
| آزمون ۱ | ۲۹۵ | ۱۰۰$\mu$m | ۲۰۵<br>۶۹/۴۹ | ۳۹<br>۱۳/۲۳ | ۵۱<br>۱۷/۲۸ | ۱۰۸ | ۵<br>۴/۶ | ۴۳<br>۳۹/۸ | | ۷<br>۶/۴۸ | ۴۸<br>۴۴/۴ | ۱۹<br>۱۷/۵ | | ۱۴<br>۱۲/۹ | ۱۶<br>۱۴/۸ | ۳۹<br>۳۶/۵۶ | | ۳<br>۷ | ۷<br>۶/۴ | ۳<br>۲/۷ | ۲۲<br>۲۰/۳ | ۴۵<br>۴۱/۶ | ۱<br>۰/۹ | ۱<br>۰/۹ | ۴<br>۳/۷ | ۱<br>۰/۹ | ۱<br>۰/۹ | ۹<br>۸/۳ | ۱۰<br>۹/۲ |
| آزمون ۲ | ۲۳۷ | - | ۱۲۵<br>۵۲/۷۴ | ۵۱<br>۳۱/۵۱ | ۶۱<br>۳۵/۷۳ | ۷۰ | ۵<br>۷/۱۴ | ۲۷<br>۳۸/۵ | | | ۲۳<br>۳۳/۸ | ۱۰<br>۱۴/۳ | | ۲<br>۲/۸ | ۱۷<br>۲۴/۲ | ۱۷<br>۲۴/۲ | | | ۲<br>۲/۸ | ۳<br>۴/۲ | ۸<br>۱۱/۴۲ | ۱۶<br>۲۲/۸ | | | ۱<br>۱/۴ | | ۲<br>۲/۸ | ۴<br>۵/۷ | ۷<br>۱۰ |
| آزمون ۳ | ۲۶۲ | ۱۰۰$\mu$m | ۱۸۴<br>۷۰/۲۲ | ۴۰<br>۱۵/۲۶ | ۳۸<br>۱۴/۵ | | ۵<br>۴/۳ | ۵۴<br>۴۷/۳۶ | ۱<br>۸ | ۵<br>۴/۳ | ۴۹<br>۴۲/۹ | ۲۱<br>۱۸/۴ | ۱<br>۸ | ۱۰<br>۸/۷۷ | ۲۱<br>۱۸/۴ | ۳۵<br>۳۱/۹ | | | ۱۳<br>۱۱/۴ | ۳<br>۲/۶ | ۱۸<br>۱۵/۷ | ۳۵<br>۳۱/۹ | | ۸ درصد | ۴<br>۳/۵ | ۱۴<br>۱۳/۲۸ | -<br>- | ۷<br>۶/۱ | ۱۲<br>۱۰/۵ |

GV: Germinal Vesicle

GVB: Germinal Vesicle Breakdown

MII: Metaphas II

Early B: Early Blastocyste

Lae B: Late Blastocyste

شکسته DNA در حین همانندسازی باعث شکستهای غیرقابل برگشت هر دو رشته DNA می‌شود [۴۷]. افزایش قطعه قطعه شدن DNA در جنین با افزایش شکست‌ها در هر دو رشته DNA مرتبط است. از آنجایی که همانندسازی DNA در مراحل اولیه تکوین جنین بسیار فعال است شکست غیرقابل برگشت ۲ زنجیره DNA در جنینهای کشت شده تحت فشار اکسیژن ۲۰ درصد فراوانی بالایی خواهد داشت[۴۵، ۴۶ و ۴۸-۵۰]. یانگ (Yang) و همکاران [۱۵] گزارش دادند که جنینهای انسان با تقسیم سلولی نامساوی نسبت به جنینهای با تقسیم مساوی غلظت بالاتری $H_2O_2$ دارند، در نتیجه غشای سلولی و DNA جنینی آسیب می‌بینند، به نظر می‌رسد بین محتوای $H_2O_2$ و سرعت تکوین ارتباط وجود دارد. مشخص شده است که سلولهای ناکارا $OH^{\bullet}$ بیشتری از $H_2O_2$ تولید می‌کنند که در نهایت باعث پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به DNA می‌شوند [۱۴ و ۴۶]. طی این فرآیند فشار اکسیداتیو باعث قطعه قطعه شدن DNA و موتاسیون می‌شود که توانایی تکوین جنینی را کاهش می‌دهد. با توجه به آسیبهای وارده به سلول اضافه کردن آنتی‌اکسیدانها به محیط کشت تخمک ضروری به نظر می‌رسد. سالگو (Salgo) توانایی تکوین در جنین آزمایشگاهی خوک با اضافه کردن بتامرکاپتواتانل افزایش می‌یابد [۵۰]. در جنین گاو حضور بتامرکاپتواتانل در محیط کشت باعث تولید گلوتاتیون می‌شود و سرعت تکوین به بلاستوسیست را افزایش می‌دهد [۱۹و۲۵و۵۱]. گلوتاتیون یک ترکیب سولفیدریل غیرپروتئینی است که در سلولهای پستانداران وجود دارد و یک آنتی‌اکسیدان مهم به شمار می‌آید. گلوتاتیون (۲GSH) اکسید می‌شود و باعث می‌شود که $H_2O_2$ به $H_2O$ تبدیل شود و خودش تشکیل گلوتاتیون دی‌سولفید می‌دهد (GSSG)[1] ترکیبات تیولی با وزن مولکولی کم از جمله سیستئامین و بتامرکاپتواتانل باعث سنتز این ماده می‌شوند. این ماده بلوغ سیتوپلاسمی را افزایش می‌دهد که در نتیجه بلوغ سیتوپلاسمی تکوین جنینی بهبود می‌یابد. از طرفی گلوتاتیون غلظت ROS داخل سلولی را تنظیم می‌کند [۴۰]. بنابراین آسیبهایی که به‌وسیله ROS به‌وجود می‌آیند کاهش می‌یابد. احتمالاً بتامرکاپتواتانول باندهای دی سولفید را می‌شکند و سیستین را به سیستئین تبدیل می‌کند. سیستئین که پیش‌ساز گلوتاتیون است، از این طریق باعث افزایش سنتز گلوتاتیون و در نتیجه تکوین بهتر جنین می‌شود[۱۶]. در این مطالعه بتامرکاپتواتانل تکوین جنین را بهبود بخشید. به‌طوری‌که در روز چهارم جنینها نسبت به گروه کنترل ۲۰ درصد بیشتر بود. همچنین بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس نسبت به گروه کنترل ۱۱ درصد افزایش داشت: نتایج حاصل از این پژوهش ثابت می‌کند که بتامرکاپتواتانل با غلظت ۱۰۰ میکرومولار از سرگیری میوز، بلوغ آزمایشگاهی و تکوین جنینهای موش را بهبود می‌بخشد که احتمالاً به‌دلیل افزایش سنتز گلوتاتیون و در نتیجه کاهش ROS است.

## تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های پژوهشی حاضر از بودجه طرح بلوغ تخمک معاونت پژوهشی پژوهشکده رویان تأمین شده است. بر خود فرض می‌دانیم که از کلیه همکاران شاغل در بخشهای مختلف تحقیقاتی و بالینی رویان به خصوص سرکار خانم طائی و آقایان فاخری و صبور که در تمام مراحل انجام تحقیق صمیمانه همکاری نموده‌اند کمال تشکر و قدردانی شود.

## References

1. **Fischer B, Bavister BD**. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters, and rabbits. J Reprod Fertil. 1993; 99: 673-9.
2. **Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T**. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. Mol reprod Dev 1992; 31: 28-33.
3. **Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T**. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. Free Radic Biol Med 1992; 13: 47-53.
4. **Thompson JG, Simpson AC, Pygh PA, Donnelly PE, Tervit HR**. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. J Rerprod Fertil 1990; 89: 573-8.

1- Glutathione disulfide

5. **Liu Z, Foote RH.** Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with 5 and 20% $O_2$. Biol Reprod 1995; 53: 786-90.

6. **Fujitani Y, Kasai K, Ohtuni S, Nishimura K, Yamada M, Utsmi K.** Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro produced bovine embryos. J Anim Sci 1997; 75: 483-9.

7. **Khurana NK, Niemann H.** Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells, and energy substrates on cleavage and morula/ blastoycst formation of bovine embryos. Theriogenology 2000; 54: 741-56.

8. **Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schultz RM, Okano A.** Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. Theriogenology 2000; 54: 137-45.

9. **Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL.** Effect of oxygen concentration on human in vitro fertilization and embryo culture. Human Reprod 1999; 14: 373-8.

10. **Catt JW, Henman M.** Toxic effects of oxygen on human embryo development. Hum Reprod (2000) 2: 199-206.

11. **Goto Y, Noda , Mori T, Nakano M.** Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. Free Radic Biol Med 1993; 15: 69-75.

12. **Kwon HC, Yang HW, Hwang KJ, Yoo JH, Kim MS, Lee CH, et al.** Effect of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro. J Obstet Gynaecol res 1999; 25: 359-66.

13. **Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S.** Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biol Reprod 1989; 41: 183-97.

14. **Hulliwell B, Aruoma OI.** DNA damage by oxygen derived species It's mechanism and measurement in mammalian systems. EEBS Lett 1991; 28: 9-19 [Review].

15. **Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Chio KW, Oh KS.** Detection of reactive oxygen species (ROS) an apoptosis in human fragmented embryos. Hum Reprod 1998; 13: 998-1002.

16. **Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T.** Effect of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS) and DNA fragmentation in porcine embryos. Theriogenology 2004; 71: 1-12.

17. **Orsi NM, Leese HJ.** Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvat. Mol Reprod Dev. 2001; 59: 44-53.

18. **Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M.** Allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase, improves the development of IVM/IVF bovine embryo (>4 cell) in vitro under certain culture conditons. Theriogenology 1999; 51: 613-22.

19. **Lim JM, Liou SS, Hansel W.** Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of $\beta$-mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. Theriogenology 1996; 46: 429-39

20. **Caamano JN, Ryoo ZY, Youngs CR.** Promation of development of bovine embryos produced in vitro by addtion of cysteine and $\beta$-mercaptoethanol to a chemically defined culture system. J Dairy Sci 1998; 81: 369-74.

21. **Olson SE. Seider JL GE.** Culture of in vitro - produced bovine embryos with vitamin-E improves development in vitro and after transfer to recipients. Biol Reprod 2000; 62: 248-52.

22. **Feugang MJ, Roover R, Moens A, Leonard S, Dessey F, Donnag I.** Addition of $\beta$-mercaptoethanol or troxol at the morula/ blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degreration by prooxidant agents. Theriogendogy 2004; 61: 71-90.

23. **Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE.** Review article: Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? J Lab Clin Med 1992: 119: 598-620.

24. **Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH.**

Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. Development 1990; 109: 501-7.

25. **Nasr-Esfahani MH, Johnson MH.** The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. Development 1991; 113: 551-60.
26. **Noda Y.** Embryo development in vitro. Assist Reprod Rev 1992; 2: 9-15.
27. **Liu L, trimaruhi JR, Keefc DL.** Thiol oxidation-induced embryonic cell death in mice is prevented by the artioxidant dithiothreitol. Biol Reprod 1999; 61: 1162-9.
28. **Morales H, tilquim P, Ress JF, Massip A, Dessy F.** Pyruvate prevents peroxide induced injury of in vitro preimplantation bovine embryo. Mol Reprod Dev 1999; 52: 149-57.
29. **Porchment RE.** Pogrammed cell death (apoptosis) in murine blastocysts: extracellular free-radicals, polymaines and other cytotoxic oocytes. In vivo 1991; 5: 493-500.
30. **Pierce GB, Parehment RE, Liewellgn AL.** Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blasotyst. Differentiation 1991; 36: 181-6.
31. **Endres AC, Hendricks AG.** Abnormal development of blastoycsts and blastomers in the rhesus monkey. Biol Reprod 1982; 26: 353-66.
32. **Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ.** Rnalysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. J Reprod Fertil 1999; 117: 97-105.
33. **Eppig J.** Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in outherian mammals. Reprod Fertile Dev 1996; 8: 985-89.
34. **De matos, Furnus cc, Moses DF.** Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. Biol Reprod 1997; 57: 1420-1425.
35. **Calvin HI, Grossham K, Blake EJ.** Estimulation and manipuluation of glututhione levels in prepubertal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. Gamete Res 1986; 14: 265-75.
36. **Perreault SD, Salott VI.** Improtance of glutathione in the acquistion and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamter oocytes. Dev Biol 1988; 125: 181-6.
37. **Miyamura M, Yoshida M, Hamano S.** Glutathion concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. theriogenology 1995; 43: 282 [Abstract].
38. **Funahashi H, Stumpf TT, Cantely TC, Kin NH, Day BN.** Pronuclear formation and intracellular glutathione content of in vitro matured porcine oocytes following in vitro fertilization and/or celectrial activation. Zygote 1995; 3: 273-81.
39. **de matos DG, Furnus CC, Moses DF.** Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. Mol Reprod Dev 1995; 42: 430-432.
40. **Lane M, Bavister BD.** Regulation of intracellular pH in bovine oocytes and cleavage stage embryos. Mol Reprod Dev. 1999; 54(4) 396-401.
41. **Wang WL, Jiang HS, Lu KH, Polge C.** The effect of gas phase on the in vitro development of bovine embryos drived from in vitro maturation and fertilzation of ovarian oocytes. Theriogenology 1992; 37: 320 [abs].
42. **Uday B, Dipak D, Ranojit K.** Reactive oxygenspecies: Oxidative damage and pathogenesis. Current Sci 1999; 77: 658-666.
43. **Guerin P, EL Mouatassim S, Menezo Y.** Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod 1991; 6: 867-71.
44. **Halliwell B.** Superoxide- dependent formation of hgdrogel radicals in the presence of iron chelates. FEBS Lett 1978; 92: 321-6.
45. **Marnett LJ.** Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis 2000; 21: 361-70.
46. **Cox MM, Goodman MF, Kreuzr KN, Sherratt DJ, Sandler SJ, Marians KJ.** The importance of repairing stalled replication forks. Natre 2000; 404: 37-401.
47. **Slater TF.** Free-radical medchanisms in tissue injury. Biochem J 1989; 222: 1-15.

48. **Kelly MR, Xu J, Alexander KE, Loo G.** Disparate effects of similar phytochemicals as inhibitors of oxidative damage to cellular DNA. Mutat Res 2001; 485: 309-18.

49. **Helen ES, Linn S.** Formation, prevention, and repari of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. J Biol Chem 1997; 272: 1095-8.

50. **Salgo MG, Stone K, Squadrito GL.** Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid PBR322. Biochem Biopsy Res commun 1995; 210: 1025-30.

51. **Takahashi M, Nagai T.** Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol Reprod 1993; 49: 228-32.