بررسی تاثیر رتینوییک اسید بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش و تکوین جنین‌های حاصل از آن

حسین ایمانی .Ph.D[۲،۱*]، لیلا سادات طاهایی .M.Sc[۲،۱]، کاظم پریور .Ph.D[۳]، سعید کاظمی آشتیانی.Ph.D[۱]، عبدالحسین شاهوردی .M.Sc[۱]، پوپک افتخاری Ph.D[۱]، حسین بهاروند .Ph.D[۴]

۱. پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

۲. دانشگاه بقیه الله، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه علوم پایه، گروه زیست‌شناسی جانوری

۴. پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

پست الکترونیک: Email: Info@royaninstitute.org

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۳/۱۳، پذیرش مقاله: ۸۵/۱۲/۲۱

هدف: بررسی تاثیر دوزهای مختلف رتینوییک اسید همه ترانس بر از سرگیری میوز، بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش و تکوین جنین‌های حاصل از آن

مواد و روش‌ها: تخمک‌های نارس از موش‌های ماده نژاد NMRI در سن شش تا هشت هفته‌ای در شرایط استریل از تخمدان‌ها استخراج و به طور تصادفی در گروه‌های آزمون، شم و کنترل قرار داده شدند. رتینوییک اسید همه ترانس (All- trans Retinoic Acid: t- RA) در دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار و اتانل مطلق (گروه شم) به عنوان حلال در دوز ۰/۲ درصد(حجمی/ حجمی) به محیط کشت بلوغ اضافه شد. همه گروه‌ها جهت فرآیند بلوغ به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شدند و تخمک‌هایی که به مرحله (Metaphase II: MII) رسیده بودند جهت عمل لقاح درکنار اسپرم موش‌های نر همان نژاد قرارگرفتند. فرآیند ازسرگیری میوز، بلوغ، تشکیل جنین و تکوین آن تا مرحله بلاستوسیست توسط میکروسکوپ معکوس مشاهده و نتایج حاصل با آزمون آماری Chi-Square بررسی شد.

یافته‌ها: میزان از سرگیری میوز در گروه آزمون ۰/۲۵ میکرومولار (p<۰/۰۱)، آزمون ۰/۵ و ۱ میکرومولار (p<۰/۰۰۱) و در آزمون۲ میکرومولار t- RA (p<۰/۰۰۰۱) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. بلوغ تخمک در گروه آزمون ۱ میکرومولار (p<۰/۰۱) و آزمون ۲ میکرومولار t- RA (p<۰/۰۰۰۱) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد و تشکیل جنین‌های دو سلولی ۲۴ ساعته و بلاستوسیست ۱۲۰ ساعته در گروه آزمایشی ۲ میکرومولار t-RA نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۱) .

نتیجه‌گیری: افزودن ۲ میکرومولار t-RA به محیط کشت بلوغ حاوی تخمک‌های نارس، بلوغ و تکوین تخمک‌های نارس موش را در محیط آزمایشگاهی بهبود می‌بخشد.

کلیدواژگان: رتینوییک اسید، بلوغ آزمایشگاهی، موش، تخمک نارس

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۱۴-۷

مقدمه

تخمک‌های پستانداران در مرحله دیپلوتن از پروفاز میوز یک متوقف شده‌اند. با قرارگرفتن این تخمک‌ها در محیط کشت، روند تقسیم مجددا فعال می‌شود. این فرآیند، که مستلزم شکستن حباب زاینده (Germinal Vesicle: GV) است، به وسیله جمع‌شدگی تدریجی کروماتین و ناپدید شدن هسته متراکم و غشای هسته‌ای، توصیف شده است. بعد از پیشروی میوزی و خروج اولین جسم قطبی، تخمک در مرحله متافاز II آرایش می‌یابد و فعالیت را در لقاح ادامه می‌دهد. بلوغ تخمک نارس، مستلزم بلوغ هسته‌ای و بلوغ سیتوپلاسمی است. فرآیند بلوغ سیتوپلاسم، به عنوان یک پدیده مستقل اتفاق می‌افتد که در آن میزان mRNA ذخیره شده و پروتین‌ها افزایش و میزان cAMP داخل سیتوپلاسمی سلول کاهش می‌یابد. هنگام رشد تخمک، مقادیر زیادی از mRNA در هسته سنتز و پلی‌آدنیلاته (A) می‌شوند. در مراحل معین در هنگام بلوغ ، طویل شدن پُلی A سیتوپلاسمی، سبب فعال شدن ژن‌های کد کننده mRNA جهت شروع و پیشروی میوز می‌شود (۱). درتخمک‌های پستانداران، مهاجرت گرانول‌های کورتیکال (Cortical Granules) یک مرحله مهم در بلوغ سیتوپلاسمی است و به عنوان یک معیار در تخمین بلوغ و سازمان‌دهی اندامک استفاده می‌شود (۲). در هنگام بلوغ، اکثریت این گرانول‌های کورتیکالی از جایگاه تولید (معمولا دستگاه گلژی) جهت قرار گرفتن در زیر تعدادی از

میکرومترهای غشای پلاسمایی، حرکت می‌کنند.
لقاح موفق وابسته به این تغییرات است و اکثر تخمک‌ها، بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای خود را بعد از لقاح تکمیل می‌کنند. روش‌های بلوغ آزمایشگاهی تخمک نارس، از رخدادهای موجود در *In vivo* مانند دوره رشد پیش از تخمک‌گذاری که صلاحیت رشد و نمو تخمک را منتقل می‌کنند بی‌بهره‌اند. لذا تخمک‌های بلوغ یافته در *In vitro* صلاحیت کمتری از تخمک‌های بلوغ یافته در *In vivo* دارند (۳). بنابراین ایجاد محیطی که بتوان تعداد تخمک‌های بلوغ یافته را افزایش داد بسیار حایز اهمیت است. به نظر می‌رسد روش به کار گرفته شده در این تحقیق امکان بدست آوردن تخمک با کیفیت مناسب را از حیوانات با ارزش و نادر که به علت آسیب، بیماری و یا سن، نابارور هستند، ممکن سازد. علاوه بر آن پایه تکنیکی که لازمه بیوتکنولوژی‌های مرتبط دیگر مانند کلونینگ و انتقال ژن هستند را فراهم می‌آورد. با بررسی اینکه تنها حدود ۶۰ درصد تخمک‌های نارس موش در فرآیند بلوغ در آزمایشگاه بالغ می‌شوند، اضافه کردن هورمون‌ها (۴)، فاکتورهای رشد (۵)، ویتامین‌ها از جمله ویتامین A (۳، ۶) و مواد دیگر (۷) به منظور افزایش کارآیی‌شان به محیط کشت مناسب به نظر می‌رسد. رتینوییدها خانواده بزرگی از ترکیبات طبیعی و ترکیبی خویشاوند با ویتامین A (All-trans Retinol) هستند (۳) که به عنوان تنظیم کنندگان مهم رشد و نمو مهره داران ، تمایز سلولی و عملکرد بافت شناخته شده‌اند (۸). نوع همه ترانس از جمله مهمترین رتینوییدها در تشکیل جنین مهره‌داران است. تمایز ایجاد شده به وسیله رتینوییدها با ایجاد تغییرات معین در بیان ژن‌های همیوباکس، فاکتورهای رشد و گیرنده‌های آنها همراه است (۹). انتقال درون سلولی رتینول از طریق پروتیین سلولی متصل شونده به رتینول (Cellular Retinol Binding Protein: CRBP) و پروتیین سلولی متصل شونده به رتینوییک اسید (Cellular Retinoic Acid-Binding Protein: CRABP) صورت می‌گیرد. این پروتیین‌ها در گروه هموئوستازی رتینول موجود در درون سلول قرار می‌گیرند (۱۰) . عملکرد RA به طور غیرمستقیم از طریق دو زیر واحد گیرنده‌های هسته که عبارتند از: گیرنده‌های رتینوییک اسید هسته‌ای (Retinoic Acid Receptors: RAR) و گیرنده‌های X رتینویید(Retinoid X Receptors: RXR) تنظیم می‌شود. کمپلکس‌های لیگاند-گیرنده باعث آغاز و یا سرکوب فعالیت ژن می‌شود که این کار از طریق همکاری با برخی فاکتورهای معین مسئول در این امر که در ناحیه پروتومور ژن‌های هدف قرار می‌گیرند انجام می‌شود (۱۱). رتینوییک اسید همه ترانس باعث فعالیت گیرنده RAR می‌شود. گیرنده‌های هسته‌ای RAR به صورت هترودایمر اند و توانایی اتصال به توالی‌های خاصی از DNA که فاکتورهای گیرنده RA نامیده می‌شوند را دارند. این اتصال به منظور افزایش و یا کاهش بیان ژن رخ می‌دهد (۱۲). بنابراین تمایز را در بسیاری از سیستم‌های سلولی القا می‌کند و سبب کنترل رخدادها در چرخه سلولی می‌شود (۱۳). از آنجایی که RA روی سلول‌ها جهت تشکیل و یا تغییر الگوی فعالیت ژن عمل می‌کنند لذا می‌تواند بلوغ سیتوپلاسمی و ظرفیت تخمک را برای پیشرفت در رشد و نمو تحت تاثیر قرار دهد.
در مطالعه حاضر سعی شده است تا تاثیر رتینوییک اسید بر از سرگیری میوز (بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای) تخمک‌های نارس موش و تکوین جنین‌های حاصل از آن در آزمایشگاه بررسی شود.

مواد و روش‌ها

تهیه تخمک‌های نارس

در این تحقیق از موش‌های نژاد NMRI در سن ۶ تا ۸ هفته‌ای تهیه شده از انیستیتو پاستور ایران استفاده شد. موش‌های ماده به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند و تخمدان آنها در شرایط استریل از بدن خارج و پس ازانتقال به درون قطرات ۲۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM-α حاوی ۵ درصد FCS، چربی‌های اضافی اطراف تخمدان حذف و سپس درون قطرات ۵۰۰ میکرولیتری انتقال داده شد. تخمدان‌ها با استفاده از سرنگ‌های انسولین تشریح (Dissect) و تخمک‌های نارس حاوی ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های گرانولوزا جدا شد. سپس با روش پیپت‌کردن سلول‌های گرانولوزای اطراف آن برداشته شد. تخمک‌های نارس هسته‌دار (GV) با سیتوپلاسم روشن، قشر شفاف (Zona Pelucida: ZP) یکنواخت با فضای پیش زرده‌ای (Pervettline) مناسب مطابق گروه‌های زیر انتخاب شدند.

بلوغ تخمک‌ها

گروه کنترل: ۵۰۰ تخمک نارس از موش‌های طبیعی گرفته و در محیط MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی IU در میلی‌لیتر rFSH، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG و ۵ درصد FCS، قرار داده شد.
گروه شم: ۵۲۰ تخمک نارس در محیط بلوغ MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی‌IU در میلی‌لیتر rFSH، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG، ۵ درصد FCS و ۰/۲ درصد (حجمی/ حجمی) اِتانل مطلق قرار داده شد. رتینوییک اسید همه ترانس در اتانل ۰/۲ درصد (حجمی/ حجمی) حل و درون اپندورف پوشیده با کاغذ آلومینیوم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد درون فریزر نگهداری شد. سپس به کمک محیط کشت MEM-α غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۱۰ و ۱۵ میکرو مولار تهیه و استفاده شد. قابل ذکر است طول عمر نگهداری رتینوییک اسید در شرایط فعلی یک ماه است.
گروه آزمون یک: ۵۱۰ تخمک نارس در محیط بلوغ MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی‌IU در میلی‌لیتر rFSH، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG، ۵ درصد FCS و ۰/۲۵ میکرومولار رتینوییک اسید همه ترانس قرار داده شد.
گروه آزمون دو: ۵۲۶ تخمک نارس در محیط بلوغ MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی‌IU در میلی‌لیتر rFSH، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG، ۵ درصد FCS و ۰/۵ میکرومولار رتینوییک اسید همه ترانس قرار داده شد.

گروه آزمون سه: ۵۴۰ تخمک نارس در محیط بلوغ MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی‌IU در میلی‌لیتر rFSH، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG، ۵ درصد FCS و ۱ میکرومولار رتینوییک اسید همه ترانس قرار داده شد.

گروه آزمون چهار: ۵۳۴ تخمک نارس در محیط بلوغ MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی‌IU در میلی‌لیتر rFSH، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG، ۵درصد FCSو ۲ میکرومولار رتینوییک اسید همه ترانس قرار داده شد.

رتینوییک اسید تنها در مرحله بلوغ تخمک اعمال شد و تخمک‌های هر گروه به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد قرار داده شدند. سپس با میکروسکوپ معکوس، مراحل بلوغ آزمایشگاهی و ازسرگیری میوز در تمام گروه‌ها بررسی شد. تخمک‌های بدون تغییرشکل در هسته را به عنوان GV، تخمک‌های با هسته شکسته شده به عنوان (Germinal Vesicle Break Down: GVBD) با نشانه شروع تقسیم میوز و تخمک‌های بالغ یا MII شناسایی شد.

لقاح و تکوین تخمک‌های بالغ شده

ابتدا موش‌های نژاد NMRI به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند. دم اپیدیدیم آنها جدا و به قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت T6 حاوی ۱۵ میکروگرم سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) درهر میلی‌لیتر منتقل شدند. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO_2 ۵ درصد انکوبه شد. با انتقال اسپرم‌های فعال و سالم از کناره قطره (در هر میلی‌لیتر $۱۰^۶ \times ۲$-۱ عدد اسپرم) به داخل قطرات T6-حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA، تخمک‌های بالغ شده نیز به آنها اضافه شد. پس از گذشت ۴-۶ ساعت اسپرم‌ها از اطراف تخمک‌ها شستشو داده شد و زایگوت‌های تشکیل شده از محیط فعلی به قطرات محیط T6 حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA منتقل شدند. وضعیت جنین‌ها پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ساعت به وسیله میکروسکوپ معکوس برای ثبت مراحل تکوین جنین مشاهده و نتایج حاصل با آزمون آماری Chi-Square بررسی شد.

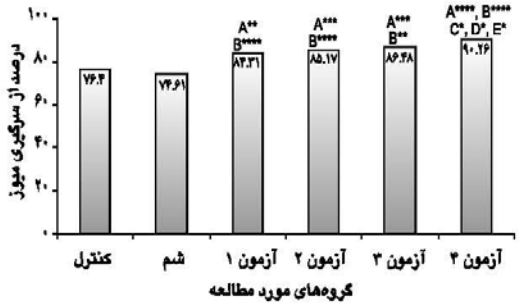
علت انتخاب محیط MEM-α جهت بلوغ و محیط T6جهت تکوین، Setup بودن این دو محیط کشت با شرایط آزمایشگاه بود. در طول مدت تکوین، جنین‌ها هر روز مورد بررسی قرار گرفتند. جنین‌های دژنره از محیط خارج شدند. به همین ترتیب جنین‌های متوقف شده، به قطرات دیگر منتقل شدند و جنین‌های سالم تا رسیدن به مرحله بلاستوسیست در محیط خود باقی گذاشته شدند.

آزمون آماری

با توجه به اینکه در این مطالعه متغیرها کیفی بودند و ملاک تعداد کل سلول‌ها بود، جهت بررسی ارتباط بین گروه‌ها از برنامه SPSS و با روش آماری Chi-Square استفاده شد. بنابراین نیازی به محاسبه انحراف معیار و میانگین دیده نشد. اختلاف با $p<۰/۰۵$، $p<۰/۰۱$، $p<۰/۰۰۱$، $p<۰/۰۰۰۱$ به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

در این مطالعه ۳۱۳۰ تخمک نارس و سالم از تخمدان موش‌های نژاد NMRI جدا و به طور کاملا تصادفی به گروه کنترل، گروه شم و چهار گروه آزمایشی اختصاص داده شد. درصد تخمک‌های باقی‌مانده در مرحله GV در گروه کنترل، شم و گروه‌های آزمون به ترتیب ۲۳/۶، ۲۵/۳۸، ۱۵/۶۸، ۱۴/۸۲، ۱۸/۱ و ۹/۷۳ بود. که نشان داد، درصد تخمک‌های باقی‌مانده در مرحله GV درگروه ۲ میکرومولار نسبت به سایر گروه‌ها کمتر است. در این مرحله درگروه آزمون ۲ نسبت به گروه آزمون ۴ افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). درگروه آزمون ۳ نسبت به گروه آزمون ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی نسبت به گروه آزمون ۴ افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۰۰۱$). درصد ازسرگیری میوز در گروه کنترل، شم و چهار گروه آزمون به ترتیب ۷۶/۴، ۷۴/۶۱، ۸۴/۳۱، ۸۵/۱۷، ۸۶/۴۸، ۹۰/۲۶ و بلوغ تخمک ۶۰/۸، ۶۰، ۶۴/۳۱، ۶۵/۷۷ و ۷۰، ۷۸/۲۷ بود. نرخ ازسرگیری میوز در گروه آزمون۱ ($p<۰/۰۱$)، درگروه آزمون۲ ($p<۰/۰۰۱$)، در گروه آزمون ۳ ($p<۰/۰۰۱$) و در گروه آزمون ۴ ($p<۰/۰۰۰۱$) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. از سرگیری میوز در گروه آزمون ۱ نسبت به گروه آزمون ۴ کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$) ولی نسبت به گروه‌های آزمون ۳ و۲ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

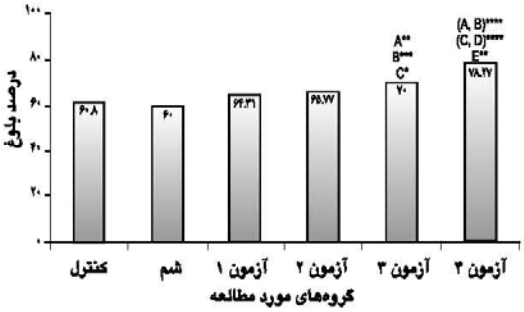


نمودار ۱: مقایسه درصد از سرگیری میوز تخمک‌های نارس در گروه‌های مورد مطالعه. A: گروه کنترل، B: گروه شم (اتانل ۰/۲ درصد، حلال)، C: گروه آزمون ۱ (۰/۲۵ میکرومولار رتینوییک اسید)، D: گروه آزمون ۲ (۰/۵ میکرومولار رتینوییک اسید)، E: گروه آزمون ۳ (۱ میکرومولار رتینوییک اسید)، F: گروه آزمون ۴ (۲ میکرومولار رتینوییک اسید). حروف به کار رفته در بالای ستون‌ها متعلق به گروهی است که نسبت به آن اختلاف معنی‌دار مشاهده شده است.

*(p<۰/۰۵)، **(p<۰/۰۱)، ***(p<۰/۰۰۱)، ****(p<۰/۰۰۰۱)

از سرگیری میوز در گروه آزمون ۲ و ۳ نسبت به گروه آزمون ۴ کاهش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). میزان بلوغ تخمک در گروه آزمون ۳ (p<۰/۰۱) و در گروه آزمون ۴ (p<۰/۰۰۰۱) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. میزان بلوغ در گروه آزمون ۴ نسبت به گروه آزمون ۱ (p<۰/۰۰۰۱) و نسبت به گروه آزمون ۲ (p<۰/۰۰۰۱) افزایش معنی‌داری را نشان داد. میزان بلوغ در گروه آزمون ۳ نسبت به گروه آزمون۱ (p<۰/۰۵) و نسبت به گروه آزمون ۴ (p<۰/۰۱) کاهش معنی‌داری نشان داد.

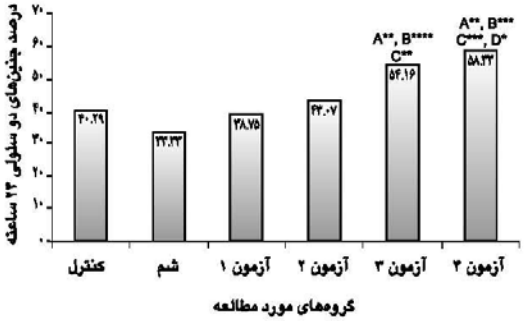
مقایسه نتایج به دست آمده از لقاح و تکوین جنین‌های حاصل از تخمک‌هایی که در معرض رتینوییک اسید ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میکرو مولار قرار گرفته بودند نشان داد در گروه آزمون ۱ جنین‌هایی که به مرحله دو سلولی ۲۴ ساعته رسیده بودند نسبت به گروه آزمون ۳ (p<۰/۰۱) و نسبت به گروه آزمون ۴ (p<۰/۰۰۱)، کاهش معنی‌داری داشتند و نیز جنین‌هایی که به مرحله بلاستوسیست ۱۲۰ ساعته رسیده بودند نسبت به گروه آزمون ۴، کاهش معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۵).



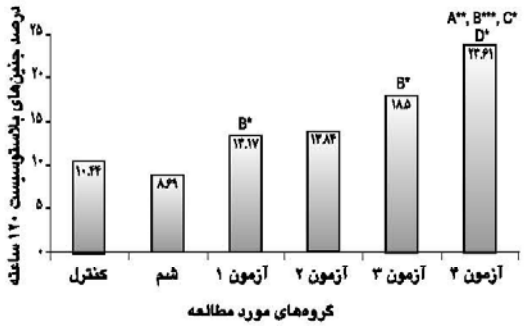
نمودار ۲: مقایسه درصد بلوغ تخمک‌های نارس در گروه‌های مورد مطالعه. A: گروه کنترل، B: گروه شم (اتانل ۰/۲ درصد، حلال)، C: گروه آزمون ۱ (۰/۲۵ میکرومولار رتینوییک اسید)، D: گروه آزمون ۲ (۰/۵ میکرومولار رتینوییک اسید)، E: گروه آزمون ۳ (۱ میکرومولار رتینوییک اسید)، F: گروه آزمون ۴ (۲ میکرومولار رتینوییک اسید). حروف به کار رفته در بالای ستون‌ها متعلق به گروهی است که نسبت به آن اختلاف معنی‌دار مشاهده شده است.
(p<۰/۰۰۰۱)**، (p<۰/۰۰۱)***، (p<۰/۰۱)**، (p<۰/۰۵)***

در گروه آزمون ۲ در دو سلولی ۲۴ ساعته و بلاستوسیست ۱۲۰ ساعته نسبت به گروه آزمون ۴ کاهش معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۵). در گروه آزمون ۳، نسبت جنین‌هایی که به مرحله دو سلولی ۲۴ ساعته رسیدند در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۵) و نیز جنین‌هایی که به دو سلولی ۲۴ ساعته (p<۰/۰۰۰۱) و بلاستوسیست ۱۲۰ ساعته (p<۰/۰۵) رسیدند در مقایسه با گروه شم افزایش معنی‌داری داشتند.

در گروه آزمون ۴، نسبت جنین‌هایی که به مرحله دو سلولی ۲۴ ساعته و بلاستوسیست ۱۲۰ ساعته رسیدند در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۱). نسبت جنین‌هایی که به مرحله دو سلولی ۲۴ ساعته (p<۰/۰۰۰۱) و بلاستوسیست ۱۲۰ ساعته (p<۰/۰۰۱) رسیدند در مقایسه با گروه شم افزایش معنی‌داری داشتند. در گروه آزمون ۴، میزان تشکیل جنین‌های متوقف شده و دژنره ۲۴ساعته نسبت به گروه‌های (کنترل، آزمون ۱، آزمون ۲ و آزمون ۳) (p<۰/۰۱) و نسبت به گروه شم (p<۰/۰۰۱) نیز کاهش معنی‌داری داشت. در گروه‌های آزمون ۳ و ۱ نسبت به گروه شم نیز کاهش معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۱).

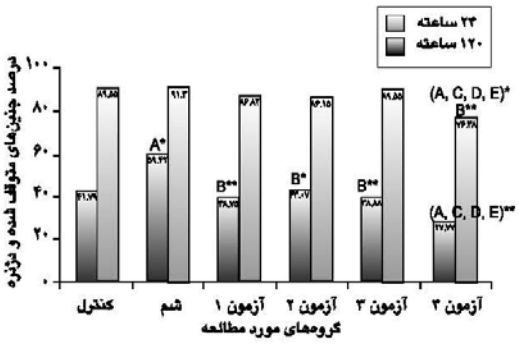


نمودار ۳: مقایسه درصد تشکیل جنین‌های دو سلولی در گروه‌های مورد مطالعه. A: گروه کنترل، B: گروه شم (اتانل ۰/۲ درصد، حلال)، C: گروه آزمون ۱ (۰/۲۵ میکرومولار رتینوییک اسید)، D: گروه آزمون ۲ (۰/۵ میکرومولار رتینوییک اسید)، E: گروه آزمون ۳ (۱ میکرومولار رتینوییک اسید)، F: گروه آزمون ۴ (۲میکرومولار رتینوییک اسید). حروف به کار رفته در بالای ستون‌ها متعلق به گروهی است که نسبت به آن اختلاف معنی‌دار مشاهده شده است.
(p<۰/۰۰۰۱)**، (p<۰/۰۰۱)***، (p<۰/۰۱)**، (p<۰/۰۵)***



نمودار ۴: مقایسه درصد تشکیل جنین‌های بلاستوسیست در گروه‌های مورد مطالعه. A: گروه کنترل، B: گروه شم (اتانل ۰/۲ درصد، حلال)، C: گروه آزمون ۱ (۰/۲۵ میکرومولار رتینوییک اسید)، D: گروه آزمون ۲ (۰/۵ میکرومولار رتینوییک اسید)، E: گروه آزمون ۳ (۱ میکرومولار رتینوییک اسید)، F: گروه آزمون ۴ (۲ میکرومولار رتینوییک اسید). حروف به کار رفته در بالای ستون‌ها متعلق به گروهی است که نسبت به آن اختلاف معنی‌دار مشاهده شده است.
(p<۰/۰۰۱)*، (p<۰/۰۱)**، (p<۰/۰۵)***

در گروه‌های آزمون ۲ و کنترل نسبت به گروه شم کاهش معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۵). در گروه آزمون ۴، میزان تشکیل جنین‌های متوقف شده و دژنره ۱۲۰ ساعته نسبت به گروه‌های کنترل، آزمون ۱، آزمون ۲ و آزمون ۳ (p<۰/۰۵) و نسبت به گروه شم (p<۰/۰۱) کاهش معنی‌داری مشاهده شد. به نمودارهای (۵-۱) مراجعه شود.



نمودار ۵: مقایسه درصد تشکیل جنین‌های متوقف شده و دژنره در گروه‌های مورد مطالعه. A: گروه کنترل، B: گروه شم (انافل ۰/۲ درصد، حلال)، C: گروه آزمون ۱ (۰/۲۵ میکرومولار رتینوییک اسید)، D: گروه آزمون ۲ (۰/۵ میکرومولاررتینوییک اسید)، E: گروه آزمون ۳ (۱ میکرومولار رتینوییک اسید)، F: گروه آزمون ۴ (۲ میکرومولار رتینوییک اسید). حروف به کار رفته در بالای ستون‌ها متعلق به گروهی است که نسبت به آن اختلاف معنی دار مشاهده شده است.

*(p<۰/۰۵)، **(p<۰/۰۱)، ***(p<۰/۰۰۱)

بحث

RA یک متابولیت ویتامین A است که نقش مهمی در رویان زایی طبیعی و تفکیک سلول‌های بدخیم و طبیعی بازی می‌کند و برای رشد و تمایز در بسیاری از سلول‌ها و بافت‌ها حیاتی است. بنابراین یک تاثیر مثبت بر همه مراحل رشد و نمو در تخمک و رویان دارد (۱۰).

در چند سال گذشته نقش رتینوییدها روی تخمک‌های نارس گاوی جهت بهبود بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای تخمک‌ها بررسی شده است. مکانیسمی که به وسیله آن مصرف RA سبب رشد و نمو رویان می‌شود ناشناخته است. اما حقیقت این است که رتینوییک اسیدی که قبل از بلوغ به تخمک داده می‌شود بر روی تخمک تاثیر می‌گذارد و این در حالی است که فاکتورهای مادری ذخیره شده در تخم بر رشد و نمو رویان قبل و بعد از فعال‌سازی ژن زایگوت تاثیر می‌گذارند. اختلافات اصلی در قابلیت تخمک ممکن است از فاکتورهای تاثیرگذار بر تخمک در اواخر فولیکول‌زایی حاصل شود (۱۴). نتایج به دست آمده در این تحقیق موید این فرضیه است که RA می‌تواند به عنوان یک فاکتور تاثیرگذار بر قابلیت تخمک باشد.

رتینوییدها (ROH و RA)، موجب تحریک FSH برای القای گیرنده‌های LH و تحریک و تولید پروژسترون و کاهش cAMP می‌شوند (۱۵). افزایش یا حفظ سطوح بالای cAMP در تخمک‌ها مانع از سرگیری میوز می‌شود (۱۶). به همین ترتیب، گفته شده است که RA ممکن است کیفیت mRNA و پردازش را در هنگام بلوغ، به واسطه افزایش در پلی‌آدنیلاسیون، بالا ببرد (۱۷). رتینوییک اسید مهاجرت گرانول‌های کورتیکالی را قبل از بلوغ القا می‌کند. مهاجرت گرانول‌های کورتیکال یک پدیده معمول در تخمک پستانداران در هنگام بلوغ سیتوپلاسمی در دو محیط *In vivo* و *In vitro* است (۳) و به عنوان یک معیار در تخمین بلوغ و سازمان‌دهی اندامک استفاده می‌شود (۲).

تحریک به افزایش تخمک‌گذاری، عملکرد تخمدانی را در گاوها و گوسفندان تغییر می‌دهد که این منجر به استرویید‌وژنز فولیکولی ناهنجار در تخمک می‌شود (۱۸). درحالی که تیمار با رتینول در حیوانات تحریک به افزایش تخمک‌گذاری، فعالیت‌های تخمدانی نابجای حاصل از افزایش تخمک‌گذاری را جبران می‌کند یا کاهش می‌دهد. در گاوها استفاده از رتینول به همراه تحریک در تخمک‌گذاری، منجر به افزایش تعداد جنین‌ها با قابلیت رسیدن به مرحله بلاستوسیست می‌شود (۱۰). بر این اساس، شواهد نشان می‌دهد که توان رشد و نمو تخمک به وسیله پشتیبانی رتینویید هنگام رشد درون فولیکولی تخمک در گاو (۱۹) گوسفند (۱۰) خوک ماده (۲۰) و خرگوش‌هایی با قابلیت سطوح بالای ویتامین A، افزایش می‌یابد (۲۱).

در مطالعه حاضر، بیش از ۳۱۰۰ تخمک موش برای ارزیابی تاثیرات RA در غلظت‌های ۰/۲۵ ، ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار در بلوغ آزمایشگاهی تخمک نارس موش و رشد و نمو رویانی تا مرحله بلاستوسیست استفاده شد. استفاده از RA هنگام IVM منجر به تاثیرات وابسته به دوز می‌شود ، به گونه‌ای که با افزایش دوز رتینوییک اسید در غلظت ۱۰ و ۱۵ میکرومولار، تعداد تخمک‌هایی که به مرحله بلوغ رسیدند نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کردند و لذا سبب حذف این دوزها شد. در حالی که کاهش میزان دوز مصرفی RA میزان بلوغ را افزایش داد. در ادامه این کاهش دوز استفاده از دوز ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار RA در مقایسه با دوز ۲ میکرو مولار RA درصد بلوغ را به میزان کمتری افزایش داد. به نظر می‌رسد این ماده دارای یک نقطه اثر اپتیمم است که میزان بلوغ در دو طرف آن کاهش می‌یابد. لذا استفاده از RA در غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار بلوغ تخمک را تحت تاثیر قرار می‌دهد ولی نسبت به روند تکوین تاثیر قابل ملاحظه‌ای ندارد. به همین ترتیب قرارگیری تخمک‌های موشی در معرض غلظت ۱ و ۲ میکرومولار RA نشان داد که علاوه بر بلوغ، رشد و نمو را تا رسیدن به مرحله بلاستوسیست بهبود می‌بخشد و در این میان دوز ۲ میکرو مولار RA نقش نقطه اپتیمم را بازی می‌کند. هنگام IVM و کشت جنین‌ها در آزمایشگاه رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید می‌شوند که با دیگر مولکول‌های

سیتوپلاسمی واکنش شدید نشان می‌دهد و باعث آسیب سلولی می‌شود. سلول‌های پستانداران شامل تخمک‌ها و رویان‌های اولیه آنها، چندین مکانیسم را برای حفاظت در مقابل آسیب رادیکال‌های آزاد و حفظ تعادل‌های متناسب در واکنش‌های اکسیداسیون و احیا اتخاذ کرده‌اند. از جمله این مکانیسم‌ها استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها است. آنتی‌اکسیدانت‌های موجود در تخمک، رویان و یا محیط شامل ویتامین‌های A (رتینول)، C، E، پیرووات، گلوتاتیون، هیپوتایورین، تایورین (۲۲) وسیستیامین (۲۳) است. از آنجایی که جنین‌ها در آزمایشگاه در معرض فشار اکسیداتیو قرار می‌گیرند و مکانیسم‌های دفاعی آنها برای حفاظت از ساختمان‌های سلولی ظریفشان کارآیی ندارد و با توجه به آسیب‌های وارده به سلول جهت حفاظت تخمک‌ها و جنین‌ها اضافه کردن آنتی‌اکسیدانت‌ها به محیط کشت ضروری به نظر می‌رسد. به عنوان مثال اضافه کردن رتینویید می‌تواند در مقام آنتی‌اکسیدانت مولکول‌های اکسیژن منفرد را فرو بنشاند و با ترکیبات آنتی‌اکسیدانت دیگر واکنش بدهد (۲۴). رتینوییدها در یک شبکه آنتی‌اکسیدانت بیولوژیکی شرکت می‌کنند و به عنوان تنظیم کنندگان مسیرهای سیگنال‌کنندگی واکنش‌های اکسیداسیون و احیا عمل می‌کنند (۲۵).

RA قادر است در مقابل مرگ سلولی، آپوپتوزیس القا شده با استرس اکسیداتیو سلول را حفاظت کند (۲۶) این تاثیرات ضدآپوپتوزیس RA به وسیله مسیرهای مستقل و وابسته به گیرنده‌های هسته‌ای میانجی‌گری شده‌اند. گلوتاتیون، ترکیب سولفیدریل غیر پروتیینی اصلی در سلول‌های پستانداران با فعالیت نشخوار خواری، در مقابل ROS است (۲۷). حفاظت از سطوح مناسب گلوتاتیون برای بلوغ تخمک، لقاح و رشد و نمو رویانی ضروری است (۲۲). ثابت شده است که RA مانع کاهش گلوتاتیون القا شده با استاروسپورین در سلول‌های نورونی می‌شود که از آپوپتوزیس و آسیب اکسیداتیو پیش‌گیری می‌کند (۲۸).

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد داده‌های این مطالعه مدارک قوی‌ای در چندین سیستم سلولی مبنی بر این موضوع فراهم می‌کنند که RA مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانت اندوژنوس را پشتیبانی می‌کند و بهبود می‌بخشد و با کاهش cAMP باعث بالارفتن میزان از سرگیری میوز، بلوغ تخمک و تکوین بهتر جنین‌های حاصل از این تخمک‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های طرح حاضر از بودجه طرح بلوغ تخمک معاونت پژوهشی پژوهشکده رویان با کد ۲۴۹/۲ تامین شده است. برخود فرض می‌داریم که تشکر خود را از آقایان فاخری و پاکزاد و خانم‌ها حسنی ، دالمن، زارع و حاتمی به خاطر همکاری صمیمانه در تمام مراحل انجام تحقیق و سرکار خانم نبوی جهت انجام امور آنالیز آماری اعلام کنیم.

References

1. Krischek C, Meinecke B. In vitro maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. Anim Reprod Sci 2002; 73: 129-140

2. Damiani P, Fissorre RA, Cibelli JB, Long CR, Balise JJ, Robl JM, Duby RT. Evaluation of developmental competence, nuclear and cytoplasmic maturation of calf oocytes. Mol Reprod 1996; 45: 521-5345

3. Duque P, Diez C, Royo L, Lorenzo PL, Carneiro G, Hidolgo CO, Facal N, Gomez E. Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. Human Reproduction, 2002; 17(10): 2706-2714

4. Alves JDR, Oliverira MAL, Lima PF, Caldas JGL, Santos Filho AS. High concentration of FSH-p on the in vitro maturation of Bos indicus oocytes. Ciencia rural 2001; 31: 645-649

5. Bortolotto EB. PDGF, retinol and insulin in the regulation of bovine oocyte nuclear maturation and their consequent effect in the embryonic development. Dissertacao (Mestrado em Medicina Veterinaria) Programa de Posgraduacao em Medicina Veterinaria. Universidade Federal de Santa Maria, 2000

6. Hidalgo CO, Diez C, Duque P, Facal N, Gomez E: Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured in vitro with 9-cis-retionic acid. Reproduction 2003; 125: 409-416

7. Ashworth CJ, Antipatis C. Micronutrients programming of development throughout gestation. Reproduction 2001; 122: 527-535

8. Tracay Livingston, Down Eberhardt, J Lannett, and Edwards: Retinol improves bovine embryonic development in vitro. Journal list, Reprod Biol Endocrinal 2004; 2

9. Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM: Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS. (eds), The Retinoids- Biology, chemistry and medicine, New York: Raven Press 1994; 319-350

10. Eberhardt DM, Will WA, Godkin JD: Retinol administration to super ovulated ewes improves in vitro embryonic viability. Biol Reprod 1999; 60: 1483-1487

11. Fu-Jen Huang, Chung-Chang Shen, Shiuh-Young Chang, Tsung-Chieh J. Wu and Yan-Der Hsuuw. Retinoic acid decreases the viability of mouse blastocysts in vitro. Human reproduction, 2003; 18(1): 130-136

12. Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day B. Use of low salt culture medium with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. Biol of Reprod. 1994; 51: 633-639

13. Eto I. Promotion – sensitive epidermal and mammary epithelial cells maintained in suspension over agarose. Cell Prolix, 1998; 31: 71-92

14. Sirard MA, Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle. Anim Reprod Sci 1996; 42: 417-426

15. Bagavandoss P, Midgley AR. Biphasic action of retinoids on gonadotropin receptor induction in rat granulosa cell in vitro. Life Sci 1988; 43: 1607-1614

16. Van Blerkom, J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in vitro fertilization and embryo transfer. Hum. Reprod 1998; 10: 415-424

17. Gomez E, Dodriguez A, Goyache F, Diez C, Royo LJ, Moreira PN, Camano JN, Mran E, Gutierrez- Adam. Retinoid development mRNA expression and poly- (A) contents in bovine oocytes meiotically arrested and / or matured in vitro. Mol Reprod, 2004; 69: 101-108

18. Assay RJ, Hyttel P, Roche JF, Boland M. Oocyte structure and follicular steroid concentration in superovulated versus unstimulated heifers. Mol Reprod Dev 1994; 39: 8-16

19. Shaw DW, Farin PW, Washburn SP, Britt JH. Effect of retinol palmitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle. Theriogenlogy, 1995; 44: 51-58

20. Whaley SL, Hedgpeth VS, Farin CE, Martus NS, Jayes FC, and Brtt JH: Influence of vitamin A injection before mating on oocyte development, follicular hormones, and ovulation in gilts fed high energy diets. J Anim Sci, 2000, 78: 1598-1607

21. Besenfelder UL, Solti J, Seregi M, Muller M, Brem G: Different roles for B-carotene and vitamin A in the reproduction of rabbits. Theriogenology, 1996, 45: 1583-1591

22. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. Hum Report update, 2001, 7: 175-189

23. Eimani H, Hasani F, Rohani H, Nasr Esfahani MH, Rezazadeh M, Kazemi S, Shahverdi A. Effect of cysteamine on in vitro maturation, resumption of meiosis and embryo development of immature mouse oocytes. J. Yakhteh Medical, 2005; 7(25): 1-6

24. Nasr-Esfahani MH, Johnson MH: The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. Development, 1991; 113: 551-60

25. Imom A, Hoyos B, Swenson C, Levi E, Chua R, Viriya E. Retinoids as ligands and co activators of protein kinase C alpha. FASEB, 2001; 15: 28-30

26. Konta T, XUQ, Furusu A, Nakayama K, kitamura M: Selective roles of retinoic acid receptor and retinoid X receptor in the suppression of apoptosis by all-trans- retinoic acid. J Biol chem, 2001; 276: 12697-12701

27. Droge W: Free radicals in the physiological

Control of cell function. Physiology Rev, 2002; 82: 47-95

28. Ahlemeyer B, Kriegistein J. Inhibition of glutathione depletion by retinoic acid and tocopherol protects cultured neurons from staurosporine – induced oxidative stress and apoptosis. Neurochem. 2000; 36: 1-5