مقاله پژوهشی

اثر تمپول به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت سنتتیک بر رویان‌های موش سوری در شرایط تنش اکسیداتیو

عباس احمدی*، رجبعلی صدرخانلو

- گروه بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: استرس اکسیداتیو می‌تواند از دلایل توقف رشد جنین در خارج از رحم باشد که منجر به از بین رفتن در اثر نکروز یا مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شود. در بدن مکانیسم‌های متعددی برای محافظت جنین در برابر ROS وجود دارد؛ ولی در شرایط آزمایشگاهی این سیستم دفاعی وجود ندارد و میزان تولید رادیکال‌های آزاد نیز بیشتر است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانتی تمپول به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت سینتتیک قابل نفوذ بر روند رشد رویان‌های موش سوری در شرایط کشت آزمایشگاهی در دو حالت طبیعی و تنش اکسیداتیو است.

روش بررسی: بعد از انجام لقاح آزمایشگاهی زیگوتها در محیط HTF حاوی BSA $4mg/ml$ در گروه‌های مختلف کشت داده شدند. برای بررسی اثر استرس اکسیداتیو، زیگوتها به مدت یک ساعت در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف H_2O_2 کشت داده و بعد از شستشو به محیط کشت منتقل شدند و برای مطالعه اثر تمپول بر روند رشد جنین در شرایط تنش‌اکسیداتیو زیگوتها بعد از کشت در محیط کشت حاوی H_2O_2 $10\mu M$، در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف تمپول کشت داده شدند و اثر تمپول بر روند رشد جنینها با افزودن غلظت‌های مختلف آن به محیط کشت بدون تنش اکسیداتیو بررسی شد. داده‌ها توسط روش آماری مقایسه بین نسبتها و ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت ($p<0/05$).

نتایج: نتایج نشان داد که رشد جنینها پس از قرار گرفتن کوتاه مدت در معرض H_2O_2 به طور کاملا معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت که در غلظت‌های بالا مشخص‌تر بود. تمپول به میزان کمی آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو را مهار نمود. در شرایط نرمال تمپول باعث بهبود روند رشد جنینی و کیفیت جنینها و سبب افزایش معنی‌دار درصد جنین‌های دوسلولی (از ۹۱/۷۸٪ در گروه کنترل تا ۹۶/۹۹٪ در محیط کشت حاوی غلظت $0/5\mu M$ تمپول)، درصد بلاستوسیستها (از ۶۷/۸۰٪ در گروه کنترل تا ۸۱/۳۳٪ در محیط کشت حاوی غلظت $0/5\mu M$ تمپول) و کاهش معنی‌دار توقف جنینی (از ۳۲/۱۹٪ در گروه کنترل به ۱۸/۶۷٪ در محیط کشت حاوی غلظت $0/5\mu M$ تمپول) و افزایش معنی‌دار میزان تسهیم و بهبود مورفولوژی جنین‌های کشت داده شده در مقایسه با گروه کنترل گردید.

نتیجه‌گیری: رادیکال‌های آزاد اکسیژن از علل توقف رشد جنین‌های کشت آزمایشگاهی است. برای مقابله با اثرات سوء ROS در سیستم‌های کشت جنین از آنتی‌اکسیدان‌های گوناگونی می‌توان استفاده کرد. عدم نفوذپذیری مناسب این آنتی‌اکسیدانتها مانع عملکرد مناسب آنها می‌شود. این مطالعه نشان داد افزودن تمپول به عنوان یک آنتی-اکسیدانت سینتتیک قابل نفوذ باعث بهبود روند رشد جنین می‌شود. براساس یافته‌های این مطالعه افزودن آنتی-اکسیدانت‌های قابل نفوذ نظیر تمپول به محیط کشت‌های جنینی جهت جلوگیری از آسیبها در روند رشد جنین توصیه می‌شود.

کلید واژگان: آنتی‌اکسیدانت سینتتیک، تمپول، تنش اکسیداتیو، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، رشد جنین، زیگوت، موش سوری.

نحوه استناد به این مقاله: احمدی عباس، صدرخانلو رجبعلی. اثر تمپول به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت سنتتیک بر رویان‌های موش سوری در شرایط تنش اکسیداتیو. فصلنامه باروری و ناباروری: سال ۱۱ (۱۳۸۹)، شماره زمستان ۸۹، صفحات: ۲۴۹-۲۳۹.

*** مسئول مکاتبه:** عباس احمدی، بخش علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، صندوق پستی: ۱۱۷۷-۵۷۱۵۵.

رایا نامه: abbasahmadi60@yahoo.com

دریافت: ۸۹/۵/۲۳

پذیرش: ۸۹/۶/۱۶

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

استرس اکسیداتیو در علم زیست شناسی به‌طور کلی برای بیان شرایطی به کار می‌رود که میزان اکسیدانتها بالا باشد و یا میزان آنتی‌اکسیدانتها در سلول کم باشد؛ این شرایط بگونه‌ای است که در آن غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن بالاتر از سطوح بیولوژیک می‌باشد (۱،۲). تغییرات اکسیداتیوی اجزاء سلول در طی اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن یکی از فرآیندهای آسیب‌رسان بالقوه بسیار مخرب در عملکرد سلول است که ممکن است منجر به مرگ سلول از طریق نکروز یا مرگ برنامه‌ریزی شده گردد (۳،٤). در شرایط کشت آزمایشگاهی، غلظت اکسیژن در مقایسه با شرایط داخل بدن به مراتب بیشتر است و این امر سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط کشت آزمایشگاهی می‌شود (٥). رادیکال‌های آزاد اکسیژن در محیط کشت می‌توانند رشد جنینی، میزان آبستنی کلینیکی و سطح باروری را تحت‌تاثیر قرار دهند. در هر دو برنامه لقاح خارج رحمی (IVF)[1] و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)[2]، مشخص شد که بالا بردن غلظت ROS در محیط کشت در روز اول با کاهش میزان بارداری ارتباط دارد (٦). با رعایت این مسئله، در برنامه‌های لقاح آزمایشگاهی– انتقال جنین انسان، این نظریه وجود دارد که در حضور غلظت بالای اکسیژن در سیستم کشت آزمایشگاهی تعداد جنین‌های با کیفیت رشد خوب کم خواهد بود (۸–٦). Yoneda و همکاران اثرات افزایش غلظت اکسیژن و H_2O_2 را بر کیفیت جنین گزارش کرده و نشان دادند که کاهش سطح H_2O_2 در شرایط محیط کشت موجب بهبود کیفیت جنین در مرحله بلاستوسیست می‌شود (۹،۱۰). علاوه بر این، ارتباط مستقیم بین غلظت بالای پراکسیدهیدروژن و بالا رفتن درجه فراگمانتاسیون یا مرگ برنامه‌ریزی شده در جنین‌های موش نشان داده شده است (۸،۱۱). Wang و همکاران گزارش کردند که افزودن آنتی‌اکسیدانها نسبت تکوین بلاستوسیست را در جنین‌های موش بهبود می‌بخشد (۱۲). Catt و همکاران نشان دادند که استفاده از آنتی‌اکسیدان در محیط کشت باعث بهبود نسبت باروری و افزایش لانه‌گزینی می‌شود (۱۱).

اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد توسط سیستم آنتی‌اکسیدان درون سلولی مانند گلوتاتیون، اسیدآسکوربیک و آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز کنترل و یا مهار می‌گردد (۱۳). با این وجود به نظر می‌رسد که در شرایط کشت آزمایشگاهی جنین‌های پستانداران، میزان تولید این رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این جنینها می‌باشد؛ لذا به منظور غلبه بر این عدم تعادل اکسیدانی انواع آنتی‌اکسیدان‌های با منشا خارجی پیش‌بینی و ارائه گردیده‌اند (١٤). از سوی دیگر به نظر می‌رسد که توان دفاع آنتی‌اکسیدانتی جنین‌های آزمایشگاهی در مقاطع مختلف تکوین تا مرحلهٔ بلاستوسیست متفاوت باشد. گروهی از محققین معتقدند که ظرفیت اصلی آنتی‌اکسیدانی جنینها در مراحل اولیه تقسیمات زیگوت وابسته به ذخیره mRNA مادری به ارث رسیده درون تخمک می‌باشد و تدریجاً در مرحله فعالیت ژنوم جنینی (ZGA)[3] است که ژنوم جنین قادر به فعالیت متقابل در مقابل اکسیدان‌های تولید شده درون سلول و یا محیط کشت می‌گردد. لذا به نظر می‌رسد که نیاز خاص جنین به آنتی‌اکسیدان‌های خارجی در مقاطع قبل و بعد از فعال شدن ژنوم زایگوت متفاوت باشد (١٥).

اگرچه آنتی‌اکسیدان‌های با منشا خارجی نقش بسیار مهمی در تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌های زنده دارند، عدم نفوذپذیری سلول‌های زنده نسبت به اکثر این آنتی‌اکسیدانها مانع عملکرد مناسب آنها در حذف رادیکال‌های آزاد تولید شده در درون سلولها می‌شود (١٤). لذا در دههٔ اخیر تلاش‌های زیادی در جهت تولید آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک قابل جذب و یا نفوذپذیر انجام پذیرفته است. تمپول (TEMPOL)[4] یک ملکول کوچک قابل نفوذ به داخل سلولی سوپراکسید دیس‌موتازمیمتیک است و باعث تقلیل آنیون سوپراکساید و پراکسی‌نیتریت ایجاد کننده آماس می‌گردد. ولی تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر توان این آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جنین‌های

1- In vitro Fertilization
2- Intra Cytoplasmic Sperm Injection
3- Zygote Genomic Activation
4- 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl

Downloaded from http://www.jri.ir

آزمایشگاهی ارائه نگردیده است. لذا با توجه به اهمیت فوق‌العاده افزایش کیفیت و کمیت تولید جنین‌های آزمایشگاهی، مطالعه اخیر به عنوان اولین مطالعه در نوع خود، به بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی مادهٔ تمپول به عنوان یک آنتی‌اکسیدان سنتتیک در طی کشت آزمایشگاهی جنین‌های موش سوری در شرایط تنش‌اکسیداتیو می‌پردازد.

روش بررسی

مواد و تجهیزات: برای تهیه محیط کشت HTF (Sigma, USA)، PMSG[1] (Folligon, Netherland)، hCG[2] (Folligon, Netherland)، BSA[3] (Sigma, USA)، پتریدیش ٦*cm* (Falcon, USA)، روغن معدنی[4] (Sigma, USA)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) (Sigma, USA)، تمپول (Sigma, USA)، پی‌پت پاستور بلند (Normax، Portugal)، لوله ٥*ml* و ١٠ (Falcon, USA، BD)، انکوباتور CO_2 (LEEC, England)، استریومیکروسکوپ (Olympus, Japan)، میکروسکوپ اینورت (Olympus, Japan) مواد مورد نیاز می‌باشد.

برای انجام این مطالعه از موش‌های سوری نژاد NMRI ماده بارور جوان ١٠-٦ هفته‌ای و نر ١٢-٨ هفته که از موسسه پاستور تهیه و در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی بخش جنین شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه نگهداری می شدند استفاده شد که در شرایط استاندارد با دمای ٢٢±٢ ℃، رطوبت ٦٠-٣٠٪ و با سیکل نوری، ١٤ ساعت روشنایی و ١٠ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. آب و غذا به صورت آزاد در دسترس بود.

این مطالعه روی جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی صورت گرفت که نیاز به تحریک تخمک گذاری دارد و به شرح زیر صورت گرفت:

تزریق ٧/٥ واحد هورمون PMSG به حجم ٠/١*ml* و ٤٨-٤٦ ساعت بعد تزریق ٧/٥ واحد هورمون hCG به حجم ٠/١*ml* به روش داخل صفاقی صورت گرفت. عمل تخمک‌گذاری معمولاً ١٢-١٠ ساعت بعد از تزریق hCG صورت می‌گیرد.

لقاح آزمایشگاهی: ابتدا برای تهیه اسپرم، موش نر را به روش جابجایی گردن کشته و بعد از جدا کردن بافت‌های همبندی اطراف دم اپیدیدیم را همراه با مقداری از کانال دفران از بیضه جدا کرده و در داخل پتری‌دیش ٦*cm* حاوی محیط کشت HTF حاوی BSA ٤*mg/ml*، که قبلاً جهت تعادل در داخل انکوباتور قرار داده شده بود قرار داده و بعد از ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم و فشار در کانال دفران برای خروج اسپرمها در داخل انکوباتور CO2 گذاشته شد. بعد از ٠/٥ ساعت اسپرمها خارج و در محیط پخش شدند، سپس اسپرمها را شستشو داده و با استفاده از روش شناورسازی[5] اسپرم‌های متحرک را جدا نموده و جهت ظرفیت‌یابی، اسپرمها به مدت یک ساعت در انکوباتور CO2 با دمای ٣٧ ℃ قرار داده شدند (١٦).

تخمک‌گیری و لقاح داخل آزمایشگاهی: ١٢-١٠ ساعت پس از تزریق hCG (صبح روز بعد) بعد از کشتن حیوان به روش جابجایی گردن، لوله‌های رحمی را جدا کرده و در داخل محیط کشت HTF حاوی BSA (Sigma, USA) ٤*mg/ml* و حاوی Hepes، ٣٧ درجه از قبل آماده شده قرار داده شد و با استفاده از روش‌های آنزیمی و مکانیکی[6] تخمکها را از سلول‌های گرانولوزا جدا نموده و پس از شستشو تخمکها را به قطرات محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF حاوی BSA ٤*mg/ml* منتقل کرده و سپس اسپرمها را به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، اضافه شد. عمل لقاح حدود ٦-٥ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم صورت می‌گیرد و بدین ترتیب زیگوت به دست آمد (١٦).

گروه‌های آزمایشی: در ادامه تحقیق زیگوت‌های شستشو داده شده حاصل از لقاح آزمایشگاهی در محیط کشت HTF حاوی BSA ٤*mg/ml* به طور تصادفی در گروه‌های مختلف آزمایشی تقسیم گردید که بعد از شستشو در دو قطره از محیط کشت گروه مربوطه به تعداد ٢٠ جنین در داخل قطرات

1- Pregnant Mare Serum Gonadotropine
2- Human Chorionic Gonadotropine
3- Bovine Serum Albumin
4- Mineral oil
5- Swim up
6- Dissecting

Downloaded from http://www.jri.ir

$100\mu l$ در زیر روغن معدنی کشت داده شدند. جهت ایجاد استرس اکسیداتیو در زیگوتها از افزودن غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید (H_2O_2) به محیط کشت و انکوباسیون به مدت یک ساعت استفاده شد سپس زیگوتها به قطرات کشت گروه‌های مختلف منتقل شدند و در مراحل بعدی ارزیابی جنینها صورت گرفت.

گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه

– گروه کنترل که زیگوتها تنها در محیط کشت HTF حاوی $4mg/ml$ BSA کشت داده شدند.

– گروه‌هایی که زیگوتها جهت ایجاد تنش اکسیداتیو به مدت یک ساعت در محیط کشت حاوی غلظت‌های پراکسید هیدروژن $5,10,25\mu M$ و ۵۰ کشت داده شدند.

– گروه‌هایی که به محیط کشت غلظت‌های $0/1\mu M$، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱۰ تمپول اضافه شد.

– گروه‌هایی که زیگوتها ابتدا جهت ایجاد تنش اکسیداتیو در آنها به مدت ۱ ساعت در محیط کشت حاوی ۱۰ میکرومول پراکسیدهیدروژن کشت داده شده و در مرحله بعدی به محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های $0/1\mu M$، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱۰ تمپول منتقل شدند.

ارزیابی رشد جنینها: برای ارزیابی تاثیر تنش اکسیداتیو و اثر آنتی‌اکسیدانتی مواد مذکور در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست مراحل رشد جنینی مورد ارزیابی قرار گرفت، بررسی میزان تسهیم ۳۶ ساعت بعد از کشت صورت گرفته و در زیگوت‌های موجود در هر گروه، جنینها از نظر میزان فراگمانتاسیون و میزان طی مراحل رشد جنینی یا تعداد جنین‌های متوقف شده و مرفولوژی جنین‌های متوقف شده با توجه به فاکتورهای مختلفی نظیر لیز شدن جنینها و نکروتیک بودن آنها و فراگمانتاسیون و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمی مقایسه گردیدند. درجه بندی جنین‌های متوقف شده به شرح ذیل می‌باشد: درجه I جنین‌های دارای بلاستومرهای لیز، فراگمانته شدن و نکروتیک بودن کامل، درجه II جنین‌های با لیز و فراگمنته شدن در تعدادی از بلاستومرها، درجه III جنین‌های با تعداد کمی بلاستومرهای لیز و فراگمانته و ویزیکول سیتوپلاسمی (۱۷).

کیفیت جنینها و تعداد جنین‌های رشد کرده، درصد جنین‌های دوسلولی، میزان جنین‌های متوقف شده و درصد بلاستوسیست‌های ایجاد شده در طی ۱۲۰ ساعت در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای بررسی کیفیت رشد جنینی و میزان تسهیم [1] بلاستوسیست‌های بدست آمده در گروه‌های مختلف، شمارش تعداد سلولی به ازای هر جنین با استفاده از روش air dry technique of Tarkowski صورت پذیرفت (۱۸).

لازم به ذکر است آزمایش‌های هر گروه در ۵ مرحله تکرار شد و مجموع نتایج حاصل از این ۵ مرحله مورد آنالیز آماری قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم افزار Minitab (Minitab Co., USA) و روش مقایسه نسبتها با $p<0/05$ مورد آنالیز قرار گرفت و نتایج به صورت درصد در نمودارها و جدول مربوطه آورده شد و مقایسه تمایز و تعداد سلول‌های موجود به ازای هر جنین بین گروه‌های مختلف توسط نرم افزار SPSS (IBM Co. USA) ویرایش ۱۶ و روش آماری One way ANOVA و تست تعقیبی Tukey با $p<0/05$ مورد مقایسه قرار گرفته و میانگین و انحراف معیار آنها به‌دست آمده و در نمودار مربوطه آورده شد.

نتایج

نتایج حاصل از افزودن غلظت‌های مختلف تمپول به محیط کشت در شرایط عادی و بدون تنش اکسیداتیو و مقایسه کیفیت رشد جنینها با گروه کنترل نشان داد، افزودن تمپول به محیط کشت باعث افزایش کیفیت رشد جنینها و مورفولوژی آنها شد (شکل ۱– ب). بررسی اثر تمپول بر درصد جنین‌های دو سلولی در مقایسه با گروه کنترل نشان داد در حضور تمپول در محیط کشت درصد جنین‌های دو سلولی در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت که این افزایش از نظر آماری فقط در غلظت ۰/۵ میکرومول تمپول معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه درصد بلاستوسیستها نشان داد، افزودن تمپول به محیط کشت جنینها باعث افزایش قابل توجه و کاملا معنی‌دار درصد بلاستوسیستها در مقایسه با

1- Cleavage rate

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول ۱. مقایسه گروه‌های مختلف از نظر درصد جنین‌های دوسلولی (۳۶ ساعت بعد از کشت زیگوتها) و بلاستوسیست (۱۲۰ ساعت بعد از کشت زیگوتها) و میانگین تعداد سلولها به ازای هر جنین در شرایط نرمال (بدون تنش اکسیداتیو).

گروه‌های آزمایشی	تعداد کل جنینها در هر گروه	جنین دو سلولی تعداد (درصد)	بلاستوسیست تعداد (درصد)	تعداد سلول به ازای هر جنین (میانگین±انحراف معیار)
کنترل تعداد (٪)	۱٤٦	۱۳٤(۹۱/۷۸)	۹۹(٦۷/۸۰)	۸٦/٦۰±۱/۵۱
تمپول ۰/۱μM	۱۷۰	۱۵٦(۹۱/۷٦)	۱۱۵(٦۷/٦۵)	۸۸/۳۰±۱/٤۰
تمپول ۰/۲μM	۱۷۵	۱٦٦(۹٤/۸۵)	۱۳۹(۷۹/٤۳)a	۹۵/٦۵±۱/٤۰a
تمپول ۰/۵μM	۱٦٦	۱٦۱(۹٦/۹۹) a	۱۳۵(۸۱/۳۳) a	۹٦/۳۳±۱/۹۸a
تمپول ۱μM	۱۵۹	۱۵۰(۹٤/۳۳)	۱۲۸(۸۰/۵۰) a	۹۳/۹٦±۱/٦۱a
تمپول ۱۰μM	۱۷٤	۱٦٤(۹٤/۲۵)	۱٤۰(۸۰/٤٦) a	۹٤/۳۲±۱/۷۸a

معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a نشان داده شده است($p<۰/۰۵$)

گروه کنترل شده است و این افزایش در غلظت‌های ۰/۲μM، ۰/۵، ۱ و ۱۰ تمپول کاملاً قابل توجه بوده و از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج حاصل از شمارش سلولها به ازای هر جنین نشان داد افزودن تمپول سبب افزایش کاملاً معنی‌دار تعداد سلولها به ازای هر جنین در مقایسه با گروه کنترل می‌شود که این نشان دهنده تاثیر مثبت افزودن تمپول بعنوان یک آنتی‌اکسیدانت به محیط کشت جنینی روی افزایش کیفیت رشد جنینها و تسهیم بوده است (جدول ۱). مقایسه درصد جنین‌های متوقف شده نشان داد که افزودن غلظت‌های مختلف تمپول باعث کاهش کاملا معنی‌دار تعداد جنین‌های متوقف شده در مقایسه با گروه کنترل می‌شود و جنین‌های متوقف شده در حضور تمپول اکثراً از درجه III با لیز و فراگمانتاسیون کم در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد و این کاهش توقف جنین و درجه توقف جنینی از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بوده که نشان می‌دهد افزودن تمپول سبب کاهش میزان لیز و فراگمانته شدن شده است (جدول ۳).

جدول ۲. مقایسه گروه‌های مختلف از نظر درصد جنین‌های دو سلولی (۳٦ ساعت بعد از کشت زیگوتها) و بلاستوسیست (۱۲۰ ساعت بعد از کشت زیگوتها) و میانگین تعداد سلولها به ازای هر جنین در شرایط تنش اکسیداتیو

گروه‌های آزمایشی	تعداد کل جنینها در هر گروه	جنین دو سلولی تعداد (درصد)	بلاستوسیست تعداد (درصد)	تعداد سلول به ازای هر جنین (M±SD)
کنترل تعداد (٪)	۱٤٦	۱۳٤(۹۱/۷۸)	۹۹(٦۷/۸۰)	۸٦/٦۰±۱/۵۱
آب اکسیژنه ۵ μM	۱٤۳	۱۰۸(۷۵/۵۲) a	۵٤(۳۷/۷٦) a	۷۹/۹۰±۱/۹۹a
آب اکسیژنه ۱۰ μM	۱۷۲	۵٤(۳۱/۳۹) a	۲٦(۱۵/۱۲) a	۷٤/۵۰±۱/۳۸a
آب اکسیژنه ۲۵ μM	۱۵۵	۱۵(۹/٦۸) a	۳(۱/۹۳) a	٦۷/۳۳±۲/٦۰a
آب اکسیژنه ۵۰ μM	۱۵۸	٤(۲/۵۳) a	۰ a	۰a
آب اکسیژنه ۱۰ μM+ تمپول ۰/۱μM	۱٦۱	۵۱(۳۱/٦۸)	۲٦(۱٦/۱۵)	۷۸/۳۸±۰/۹۹
آب اکسیژنه ۱۰ μM+ تمپول ۰/۲μM	۱٦۵	۵۳(۳۲/۱۲)	۲۵(۱۵/۱۵)	۸۰/۱٦±۱/۲٦
آب اکسیژنه ۱۰ μM+ تمپول ۰/۵μM	۱۷۲	۵۷(۳۳/۱٤)	۲۸(۱٦/۲۸)	۷۹/۹۰±۰/۹۱
آب اکسیژنه ۱۰ μM+ تمپول ۱μM	۱٦٤	٤۹(۲۹/۸۸)	۲۳(۱٤/۰۲)	۷۹/۳۵±۱/٤۱
آب اکسیژنه ۱۰ μM+ تمپول ۱۰μM	۱۷۳	۵۵(۳۱/۷۹)	۲۷(۱۵/٦۱)	۷۹/۱۲±۱/۰۷

معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a و در مقایسه با گروه تنش اکسیداتیو حاوی آب اکسیژنه غلظت ۱۰μM با b (که تفاوت معنی‌داری وجود نداشت) نشان داده شده است ($p<۰/۰۵$)

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول ۳. مقایسه گروه‌های مختلف از نظر درصد و درجه توقف جنینی در شرایط کشت جنین‌های موش در شرایط بدون تنش اکسیداتیو (طی ۱۲۰ ساعت)

گروه‌های آزمایشی	تعداد کل جنینها در هر گروه	درجه I	درجه II	درجه III	تعداد کل جنینهای متوقف شده
کنترل	۱٤٦	٤(۲/۷٤)	۱۱(۷/۵۳)	۳۲(۲۱/۹۱)	٤۷(۳۲/۱۹)
تمپول ۰/۱μM	۱۷۰	۲ (۱/۱۸)	٦ (۳/۵۳)	٤۷ (۲۷/٦۵)	۵۵ (۳۲/۳۵)
تمپول ۰/۲μM	۱۷۵	۲ (۱/۱٤)	۱ (۰/۵۷) a	(۱۸/۸٦) a ۳۳	۳٦ (۲۰/۵۷) a
تمپول ۰/۵μM	۱٦٦	۰ (۰)	۱(۰/٦) a	۳۰ (۱۸/۰۷)	۳۱ (۱۸/٦۷) a
تمپول ۱μM	۱۵۹	۰ (۰)	۰ (۰)	۳۱ (۱۹/۵۰)	۳۱ (۱۹/۵۰) a
تمپول ۱۰μM	۱۷٤	۳ (۱/۷۲)	۲ (۱/۱۵) a	۲۹ (۱٦/٦۷)	۳٤ (۱۹/۵٤) a

تمامی داده‌ها مثل گروه کنترل بصورت تعداد (درصد نسبت به کل جنینها در هر گروه) آورده شده است. ، معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a نشان داده شده است($p<۰/۰۵$)

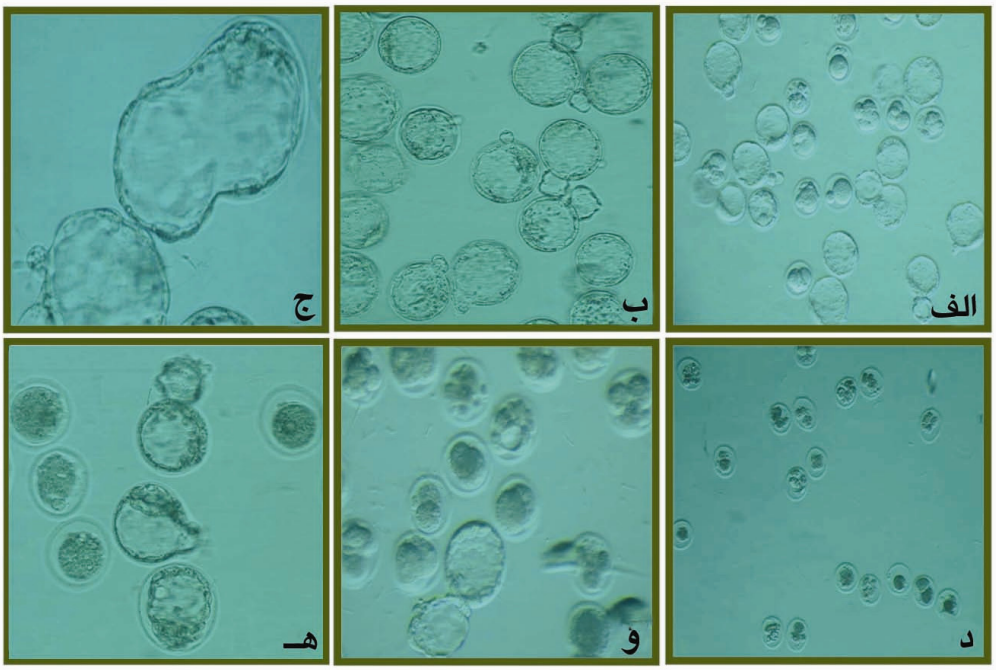
نتایج حاصل از قرار دادن جنینها در معرض غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه سبب ایجاد توقف در جنینها در مرحله یک سلولی و دو سلولی شد که این توقف در غلظت‌های پایین (۵μM و ۱۰) اکثراً از درجه II یا III با میزان لیز و فراگمانتاسیون کم بود (شکل ۱- و). در غلظت‌های بالای آب اکسیژنه (۲۵μM و ۵۰) میزان بالای توقف جنینی مشاهده شد که اکثراً از درجه I و تعدادی از درجه II با میزان لیز و فراگمانتاسیون بالا با رشد بسیار کم بودند، به طوریکه در غلظت ۵۰μM درصد زیادی از جنینها در مرحله یک سلولی متوقف، لیز و فراگمانته بودند (جدول ٤). تنها درصد خیلی کمی از آنها تا مراحل اولیه تقسیم پیشرفت داشتند و به مراحل بالاتر تقسیم و رشد جنینی پیش نرفته بودند (شکل۱- د).

جدول ۴. مقایسه گروه‌های مختلف از نظر درصد و درجه بندی توقف جنینی در شرایط کشت جنینهای موش بوسیله قرار دادن در غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه و بررسی اثر تمپول در شرایط تنش اکسیداتیو

گروه‌های آزمایشی	تعداد کل جنینها در هر گروه	درجه I	درجه II	درجه III	تعداد کل جنینهای متوقف شده
کنترل تعداد (٪)	۱٤٦	٤(۲/۷٤)	۱۱(۷/۵۳)	۳۲(۲۱/۹۱)	٤۷(۳۲/۱۹)
آب اکسیژنه ۵ μM	۱٤۳	۲٤ (۱٦/۷۸) a	۵۵ (۳۸/٤٦) a	۱۰ (٦/۹۹) a	۸۹ (٦۲/۲۳)a
آب اکسیژنه ۱۰ μM	۱۷۲	۱۰۰ (۵۸/۱٤) a	۳۷ (۲۱/۵۱) a	۹ (۵/۲۳) a	۱٤٦ (۸٤/۸۸)a
آب اکسیژنه ۲۵ μM	۱۵۵	۱۳۸ (۸۹/۰۳) a	۱٤ (۹/۰۳) a	۰ a	۱۵۲ (۹۸/۰٦)a
آب اکسیژنه ۵۰ μM	۱۵۸	۱۵٤ (۹۷/٤۷) a	٤ (۲/۵۳) a	۰ a	۱۵۸ (۱۰۰)a
آب اکسیژنه ۱۰ μM+ تمپول ۰/۱μM	۱٦۱	۸۷ (۵٤/۰٤)	٤۸ (۲۹/۸۱)	۰ (۰) b	۱۳۵ (۸۳/۸۵)
آب اکسیژنه ۱۰ μM+ تمپول ۰/۲μM	۱٦۵	۱۰۷ (٦٤/۸۵)	۲۸(۱٦/۹۷)	۵ (۳/۰۳)	۱٤۰ (۸٤/۸۵)
آب اکسیژنه ۱۰ μM+ تمپول ۰/۵μM	۱۷۲	۱۱۱ (٦٤/۵۳)	۲۱ (۱۲/۲۱) b	۱۲ (٦/۹۸)	۱٤٤ (۸۳/۷۲)
آب اکسیژنه ۱۰ μM+ تمپول ۱μM	۱٦٤	۱۰۷ (۱۵/۲٤)	۲۵ (۱۵/۲٤)	۹ (۵/٤۹)	۱٤۱ (۸۵/۹۸)
آب اکسیژنه ۱۰ μM+ تمپول ۱۰μM	۱۷۳	۹۹ (۵۷/۲۳)	٤۱ (۲۳/۷۰)	٦ (۳/٤۷)	۱٤٦ (۸٤/۳۹)

تمامی داده‌ها مثل گروه کنترل بصورت تعداد (درصد نسبت به کل جنینها در هر گروه) آورده شده است. معنی‌دار بودن گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل با a و در مقایسه با گروه تنش اکسیداتیو حاوی غلظت ۱۰ میکرومول آب اکسیژنه با b نشان داده شده است($p<۰/۰۵$)

Downloaded from http://www.jri.ir



شکل ۱. تصاویر مربوط به جنینها در گروه‌های مختلف مورد مطالعه: الف- گروه کنترل تمایز درصدی از جنینها به بلاستوسیست بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون و درصدی از جنینها که در مراحل مختلف رشد متوقف شده‌اند، ب- گروه حاوی تمپول، درصد بالایی از جنینها به بلاستوسیست اکسپند و از زونا خارج شده تمایز یافته‌اند، ج- بلاستوسیست در مرحله خروج از زونا را نشان می‌دهد، د- گروه تنش اکسیداتیو (حاوی ۵۰ μM آب اکسیژنه)، جنینها در مراحل اولیه رشد متوقف شده و درجات بالایی از لیز و فراگمانتاسیون را نشان می‌دهند، و- گروه تنش اکسیداتیو (حاوی ۱۰ μM آب اکسیژنه)، تعداد کمی از جنینها به مرحله بلاستوسیست رسیده و از لحاظ مورفولوژی مناسب نمی‌باشند و سایر جنینها در مراحل اولیه رشد متوقف شده و دچار لیز و فرا گمانتاسیون شده هستند، ه- گروه تمپول در شرایط تنش اکسیداتیو، تعدادی از جنینها به مرحله بلاستوسیست تمایز یافته‌اند و سایر جنینها متوقف شده با لیز و فراگمانتاسیون کم در آنها.

مقایسه درصد جنین‌های دو سلولی ایجاد شده که نشان دهنده شروع تسهیم است نشان داد در گروه‌هایی که تنش اکسیداتیو توسط افزودن غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه ایجاد شده بود کاهش کاملاً معنی داری در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد و این کاهش در گروه‌های با غلظت‌های بالای آب اکسیژنه کاملاً محسوس بود به طوری که در غلظت ۲۵ μM تنها ۹/۶۸٪ و در غلظت ۵۰ μM تنها ۲/۵۳٪ جنینها تا مرحله دوسلولی و بالاتر پیش رفته بودند (جدول ۲). مقایسه درصد بلاستوسیستها با گروه کنترل نشان داد پس از قرار گرفتن جنینها در معرض استرس اکسیداتیو درصد بلاستوسیستها به میزان قابل توجه و کاملاً معنی‌داری کاهش پیدا کرده بود. به خصوص در غلظت‌های بالا که این کاهش بسیار بالا بود، به طوری که در غلظت ۵۰ μM هیچگونه بلاستوسیستی ایجاد نشد (جدول ۲) و بلاستوسیست‌های ایجاد شده در غلظت‌های پایین‌تر آب اکسیژنه نیز از لحاظ مورفولوژی طبیعی نبودند (تصویر ۱- و).

نتایج حاصل از شمارش سلولی نشان داد که میانگین تعداد سلولها به ازای هر جنین در گروه‌هایی که جنینها در معرض غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه قرار گرفته بودند کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌داد و این کاهش با افزایش غلظت آب اکسیژنه بیشتر می‌شد (جدول ۲).

مطالعه اثر افزودن تمپول به محیط کشت جنینی در شرایط تنش اکسیداتیو با قرار دادن آنها به مدت یک ساعت در معرض ۱۰ μM آب اکسیژنه در محیط کشت و در ادامه، کشت آنها در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختف تمپول نشان داد که تمپول تا حدودی موجب مهار آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو گردیده و باعث افزایش درصد جنین‌های دو سلولی، در مقایسه با گروه تنش اکسیداتیو شده است؛ ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲). مقایسه درصد بلاستوسیستها نشان داد افزودن تمپول سبب

Downloaded from http://www.jri.ir

افزایش درصد بلاستوسیستها در شرایط تنش اکسیداتیو می‌شود ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۲). مقایسه نتایج حاصل از شمارش سلولی نشان داد، تمپول سبب افزایش تعداد سلولها به ازای هر جنین در شرایط تنش اکسیداتیو شده است (جدول ۲) و بیانگر این است که تمپول سبب بهبود کیفیت رشد و میزان تسهیم در جنین‌های کشت داده شده در شرایط تنش اکسیداتیو شده و تا حدودی توانسته آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو را کاهش دهد. بررسی جنین‌های متوقف شده نشان داد، تمپول باعث کاهش درصد جنین‌های متوقف شده گردید؛ ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. مطالعه درجه جنین‌های متوقف شده براساس میزان لیز و فرگمانتاسیون آنها نشان داد، میزان لیز و فراگمانتاسیون جنین‌های متوقف شده در شرایط تنش اکسیداتیو در حضور تمپول کاهش معنی‌داری را داشت (جدول ٤). بررسی مورفولوژی بلاستوسیستها نشان داد افزودن تمپول هم در شرایط تنش اکسیداتیو و هم در شرایط بدون تنش اکسیداتیو سبب بهبود مورفولوژی بلاستوسیست‌های ایجاد شده گردید (شکل ۱- هـ).

بحث

تنش اکسیداتیو در نتیجهٔ عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی در یک سلول ایجاد می‌شود. انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن شامل آنیون‌سوپراکسید (.O2)، رادیکال هیدروکسیل (.OH) و مشتقات غیررادیکالی از اکسیژن مانند پراکسیدهیدروژن (H2O2) بوده که به شدت ناپایدارند و به طور سریع و غیراختصاصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان داده و منجر به ایجاد و توسعه انواع آسیب‌های سلولی از جمله پراکسیداسیون غشاء پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و نوکلئیک، آپوپتوزیس و نکروز می‌شوند که خود در نهایت منجر به کاهش قدرت زیست‌پذیری و تکوین جنین‌های آزمایشگاهی می‌گردد (۱۹،۲۰). رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند هم از منابع داخل سلولی نظیر گامتها و یا از منابع خارج سلولی و فاکتورهای محیطی تولید شوند به عنوان مثال در روند انجام روشهای کمک باروری (ART) رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند در طول آماده کردن اسپرم در محیط کشت تولید شوند و یا ممکن است در داخل جنین افزایش یابند و یا می‌توانند در کشت داخل آزمایشگاهی ایجاد گردند (۷). افزایش در میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر روی غشاء سلول، DNA و میتوکندریها موثر است و به نظر می‌رسد این تاثیر به عنوان واسطه‌ای باشد تا آبشار آپوپتوزی را از تنظیم خارج کند (۱۹). شواهد فراوان نشان می‌دهد که سطوح بالای آب اکسیژنه بسته به غلظت آن سبب مرگ برنامه‌ریزی شده و نکروز در گونه‌های مختلف سلول‌های سوماتیک می‌شود (۲۲-۲۰، ۷).

نتایج این مطالعه نشان داد که توان رشد جنین در مراحل اولیه پیش از لانه‌گزینی پس از قرار گرفتن کوتاه مدت در معرض رادیکال‌های آزاد اکسیژن به شدت کاهش یافته است. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر با نتایج حاصل از سایر مطالعات صورت گرفته در این زمینه مطابقت دارد. همچنین مشخص شد که دزهای بالای رادیکال‌های آزاد اکسیژن در محیط کشت تاثیرات بیشتری را سبب می‌شوند و از یک حد آستانه غلظت به بالا تاثیر کامل بوده و مانع رشد جنین و یا سبب حالت‌های غیر طبیعی شدید می‌شود که نشانگر وابسته به غلظت بودن رشد جنین در ارتباط با رادیکال‌های آزاد می‌باشد. به طوری که در این مطالعه مشاهده شد قرار دادن جنینها به مدت یک ساعت قبل از کشت در محیط حاوی غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه باعث ایجاد آسیب در جنین‌های پیش از لانه‌گزینی گردیده است به طوری که جنین‌هایی که در معرض غلظت ۵۰ μM آب اکسیژنه قرار گرفتند اکثر جنینها فاقد قدرت تسهیم و رشد بودند و تنها درصد خیلی کمی از آنها تا مراحل اولیه رشد جنینی پیش رفته و دچار لیز و فراگمانته شدن شده بودند (تصویر ۱-D). ولی در غلظت‌های پایین آب اکسیژنه (۵ μM و ۱۰) تاثیرات کمتر بوده و باعث کاهش تسهیم و رشد جنینها و کاهش کیفیت جنینها و مورفولوژی آنها شد؛ هر چند که درصدی از این جنینها تا مرحله بلاستوسیست پیش رفتند؛ ولی در مقایسه با گروه کنترل این درصد خیلی پایین بوده و بلاستوسیست‌های حاصله از نظر مورفولوژی نیز حالت غیر طبیعی را نشان دادند (تصویر ۱- و).

Downloaded from http://www.jri.ir

اثـرات تخریبـی رادیکـال‌هـای آزاد توسـط سیسـتم آنتی‌اکسیدان درون سلولی مانند گلوتاتیون، اسید آسکوربیک و آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتـالاز و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) کنترل و یا مهار می‌گـردد (۱۳). بـا ایـن وجـود بـه نظـر مـی‌رسـد کـه در شـرایط کشـت آزمایشـگاهی جنـین‌هـای پسـتانداران، میـزان تولیـد ایـن رادیکـال‌هـای آزاد بـیش از ظرفیـت آنتـی‌اکسـیدانی جنینهـا می‌باشد. لذا به منظور غلبه بر این عدم تعادل اکسیدانی انـواع آنتـی‌اکسـیدان‌هـای بـا منشـا خـارجی پـیش بینـی و ارائـه گردیده‌اند (۱٤). از سوی دیگر به نظر می‌رسد که تـوان دفـاع آنتـی‌اکسـیدانی جنـین‌هـای آزمایشـگاهی در مقـاطع مختلـف تکوین تا مرحله‌ی بلاستوسیست متفـاوت باشـد. گروهـی از محققین معتقدند که ظرفیت اصـلی آنتـی‌اکسـیدانی جنینهـا در مراحل اولیـه تقسـیمات زیگـوت وابسـته بـه ذخیـره mRNA مادری به ارث رسیده درون تخمک است و تدریجاً در مرحله فعالیت ژنوم جنینی اسـت کـه ژنـوم جنـین قـادر بـه فعالیـت متقابل در مقابل اکسیدان‌های تولیـد شـده درون سـلول و یـا محیط کشت می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد که نیاز خاص جنین به آنتی‌اکسیدان‌های خـارجی در مقـاطع قبـل و بعـد از ZGA متفاوت باشد (۱٥).

مکانیسم‌های دفاعی متعددی در جنـین و محـیط پیرامـونی احاطه کننده آن وجود دارد. در بدن[1] به نظر می‌رسد تخمک و جنین در برابر اسـترس اکسـیداتیو بواسـطه پـاک‌کننـده‌هـای اکسیژنی موجود در مایعات فولیکـولی و اویـدوکت محافظـت می‌شوند. اگرچه علل بسیار مختلفی برای کیفیت پـائین رونـد تولیـد آزمایشـگاهی جنـین گـزارش گردیـده اسـت بـه نظـر می‌رسد که تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، به عنوان یکی از علل اصلی توقف رشد جنین‌های کشت داده شـده در آزمایشـگاه اسـت. بـر اسـاس گـزارش‌هـای موجـود ROS می‌توانند، باعث توقف میوزی در تخمک، مهار تکوین جنین و مرگ سـلولی شـوند. بـرای مقابلـه بـا اثـرات سـوء ROS در سیستم کشت جنینی تا کنون از آنتی‌اکسیدان‌هـای گونـاگونی استفاده شده اسـت (٤،۱۳). نتـایج حاصـل از مطالعـات اخیـر نشان داد که تمپول به عنـوان یـک نیتروکسـید قابـل نفـوذ از غشـاء سـلول کـه عملکـردی مشـابه SOD دارد (۲۳). در مطالعه‌ای که توسط Garner و همکاران صورت گرفت نشـان داد که افزودن تمپول به مایع منی گاو سبب افزایش میزان بقا و قـدرت زیسـت پـذیری اسـپرم در شـرایط نگهـداری آن در محیط داخل آزمایشگاه می‌شود (۲٤). در مطالعه دیگـری کـه توسط Lindenmann و همکاران صورت گرفت نشان داد کـه افزودن تمپول به عنوان یک نیتروکسـید قابـل نفـوذ از غشـاء سلول که عملکردی مشابه SOD دارد سبب افزایش بقا تحرک در اسپرم‌های منجمد شده گاو می‌شود (۲٥). در مطالعه‌ای که روی نگهداری اسپرم بوقلمون در شرایط محیط ازمایشگاهی صورت گرفت نشان داد کـه افـزودن تمپـول بقـای اسـپرم را افزایش می‌دهد (۲٦).

در مطالعه‌ای که توسـط Mara و همکـاران صـورت گرفـت نشان داد که نمونه‌های اسپرمی قوچ که به آنها تمپول افزوده شـده بـود و بـه مـدت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ سـاعت در دمـای ۱٥ ℃ نگهداری شده بودند میزان تحرک و کیفیت تحرک بهتـری (از نظر نـوع تحـرک)، در مقایسـه بـا گـروه کنتـرل داشـته‌انـد و همچنین نشان داد که با اضافه کردن تمپول به محـیط کشـت اسـپرم، میـزان بـاروری و تعـداد بلاستوسیسـتها افـزایش یافت (۲۷).

در شـرایط کشـت آزمایشـگاهی جنینهـا میـزان تولیـد رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی اکسیدانی آنها می‌باشد؛ لذا به منظـور غلبـه بـر ایـن عـدم تعـادل اکسـیدانی از انـواع آنتی‌اکسیدان‌های با منشاء خارجی استفاده مـی‌شـود کـه بـه علـت نفوذپـذیری کـم سـلول‌هـای زنـده بـه اکثـر ایـن آنتـی اکسـیدانها، مـانع عملکـرد مناسـب آنهـا در از بـین بـردن رادیکال‌های آزاد تولید شده در درون جنین می‌شـود بـه ایـن منظور در این پژوهش از آنتی اکسیدان سنتتیک تمپول جهـت حذف رادیکال‌های آزاد تولید شده در داخـل سـلول اسـتفاده شد که نفوذ پذیری بیشتری به داخـل سـلول داشـت و نتـایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن تمپـول بـه عنـوان آنتی اکسیدانتی سینتتیک با قابلیت نفوذپذیری بـالا بـه داخـل سـلول توانسـته در شـرایط طبیعـی بـدون شـرایط تـنش اکسیداتیو باعث بهبود و افزایش کیفیت جنین، افزایش درصـد جنین‌های دو سلولی که بیانگر شروع تسهیم در جنـین اسـت،

1- In vivo

Downloaded from http://www.jri.ir

افزایش درصد بلاستوسیست و افزایش تعداد سلولها در جنینها بعد از کشت در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف تمپول شود که نشان می‌دهد افزودن تمپول به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت سینتتیک با قدرت نفوذپذیری بالا به محیط کشت جنین می‌تواند بسیار مفید باشد. همچنین نتایج حاصل از افزودن تمپول به محیط در شرایط تنش اکسیداتیو در جنین‌هایی که قبل از کشت به مدت یک ساعت در داخل محیط کشت حاوی ۱۰μM آب اکسیژنه کشت داده شده بودند نشان داد که تمپول تاثیر کمی در بهبود کیفیت و روند رشد جنینها در شرایط تنش اکسیداتیو داشته است.

در مطالعه‌ای که Li و همکاران بر روی جنین خرگوش در شرایط تنش اکسیداتیو با جنینها در ۲۰٪ اکسیژن انجام داده بودند نشان دادند که افزودن غلظت‌های ۰/۰۰۱mM تا ۰/۱ تمپول تاثیر کمی بر روند رشد جنینها داشته است و تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل نداشت و نشان دادند که غلظت‌های بالاتر از ۱mM تمپول دارای اثرات سمیت سلولی داشته است (۲۸). مطالعه حاضر نیز نشان داد که افزودن غلظت‌های پایین تمپول (کمتر از ۰۱/ mM) دارای تاثیرات کمتری در بهبود روند رشد جنین‌ها در شرایط تنش اکسیداتیو داشته است که به نظر می‌رسد ناشی از این باشد که آسیب‌های جنینی حاصل از قرار دادن جنینها در غلظت ۱۰mM آب اکسیژنه اندازه‌ای بوده است که اثر آنتی‌اکسیدانتی تمپول نتوانسته است این آسیبها را جبران نماید. تاثیرات آنتی اکسیدانتی تمپول در شرایط عادی و بدون تنش اکسیداتیو مشخص‌تر و معنی‌دارتر از شرایط تنش اکسیداتیو بوده است. بنابراین افزودن تمپول جهت بهبود روند رشد جنین و جلوگیری از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن به محیط کشت‌های جنینی توصیه می‌شود.

نتیجه گیری

یافته های این مطالعه نشان می دهد افزودن تمپول به عنوان یک آنتی اکسیدانت سینتیک به محیط کشت جنینی سبب بهبود روند رشد جنینها در شرایط کشت داخل آزمایشگاهی می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را یاری نموده‌اند به ویژه جناب آقای دکتر آراز رابری و خانمها دکتر سحر غفاری، دکتر سمیرا ابراهیم‌زاده و دکتر کیانا کارگر کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Gonzalez-Flecha B, Reides C, Cutrin JC, Llesuy SF, Boveris A. Oxidative stress produced by suprahepatic occlusion and reperfusion. Hepatology. 1993;18 (4):881-9.
2. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Curr Med Chem. 2001;8 (7):851-62.
3. Sarafian TA, Bredesen DE. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? Free Radic Res. 1994;21 (1):1-8.
4. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. Hum Reprod. 1998;13(4):998-1002.
5. Luvoni GC, Keskintepe L, Brackett BG. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. Mol Reprod Dev. 1996;43(4):437-43.
6. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. Fertil Steril. 2004;82(3):593-600.
7. Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. Free Radic Biol Med. 1992;13(1):47-53.
8. Goyanes VJ, Ron-Corzo A, Costas E, Maneiro E. Morphometric categorization of the human oocyte and early conceptus. Hum Reprod. 1990;5(5):613-8.
9. Yoneda A, Suzuki K, Mori T, Ueda J, Watanabe T. Effects of delipidation and oxygen concentration on in vitro development of porcine embryos. J Reprod Dev. 2004;50(3):287-95.
10. Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. Mol Hum Reprod. 2003;9(11):639-43.

Downloaded from http://www.jri.ir

11. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. Hum Reprod. 2000; 15 Suppl 2:199-206.
12. Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. Fertil Steril. 2002;78(6):1272-7.
13. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update. 2001;7(2):175-89.
14. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. Theriogenology. 2003;59(3-4):939-49.
15. Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. Anim Reprod Sci. 2004;82-83:13-20.
16. Nagy A, Gestsenstion M, Vintersten K, Behringer R. Manipulating the mouse embryo. 3nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2000; p. 565-98.
17. Cebral E, Carrasco I, Vantman D, Smith R. Preimplantation embryotoxicity after mouse embryo exposition to reactive oxygen species. Biocell. 2007; 31(1):51-9.
18. Tarkowski AK. An Air-Drying Method for Chromosome Preparations from Mouse Eggs. Cytogenetics. 1966;5(6):394-400.
19. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem Toxicol. 1999;37(9-10):949-62.
20. Szeto HH. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. AAPS J. 2006;8(2):E277-83.
21. Forrest VJ, Kang YH, McClain DE, Robinson DH, Ramakrishnan N. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox. Free Radic Biol Med. 1994;16(6):675-84.
22. Tada-Oikawa S, Oikawa S, Kawanishi M, Yamada M, Kawanishi S. Generation of hydrogen peroxide precedes loss of mitochondrial membrane potential during DNA alkylation-induced apoptosis. FEBS Lett. 1999;442(1):65-9.
23. Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, DeGraff WG, Ahn MS, Samuni U, et al. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. Biochemistry. 1990;29(11):2802-7.
24. Garner DL, Thomas CA, Gravance CG, Marshall CE, DeJarnette JM, Allen CH. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. Theriogenology. 2001;56(1):31-40.
25. Lindemann CB, Kanous K. The cyclic nidroxide free radical, 4-hidroxy-2,2,6,6,tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL), is effective in prolonging the motility of bull sperm in vitro. Biol Reprod. 1991;44(suppl 1):117.
26. Donoghue AM, Donoghue DJ. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. Poult Sci. 1997;76(10):1440-5.
27. Mara L, Accardo C, Pilichi S, Dattena M, Chessa F, Chessa B, et al. Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. Theriogenology. 2005;63(8):2243-53.
28. Li J, Foote RH, Liu Z, Giles JR. Development of rabbit zygotes into blastocysts in defined protein-free medium and offspring born following culture and embryo transfer. Theriogenology. 1997;47(5): 1103-13.

Downloaded from http://www.jri.ir