

اثر غلظت‌های مختلف گلوکز بر بلوغ تخمک کومولوس‌دار مدل گاوی، لقاح و تکوین پیش از لانه‌گزینی آن در شرایط آزمایشگاه

دکتر نورالله رضائی*، دکتر سید محمد باقر هاشمی**، دکتر محمدجعفر گل‌علی پور***، دکتر ری چنگ چین****

چکیده

سابقه و هدف: مواد مغذی و سوبستراهای مختلف انرژی‌زا در محیط کشت می‌توانند در بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک اثر بگذارند. در مورد تأثیر گلوکز بر روی بلوغ تخمک در محیط کشت و تکوین رویانی بعدی آن، نظرات متناقضی وجود دارد. هدف از این مطالعه تعیین اثر غلظت‌های مختلف گلوکز بر بلوغ تخمک کومولوس‌دار، لقاح و تکوین پیش از لانه‌گزینی آن در یک مدل گاوی است.

مواد و روش‌ها: تخمدان‌های گاوی از یک کشتارگاه جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. مجموعه تخمک کومولوس (۱۱۷۰ عدد) از فولیکول‌هایی (به قطر ۶-۲ میلی‌متر) آسیبیده و به‌طور تصادفی در چهار گروه (سه گروه تجربی و یکی کنترل) تقسیم سپس در دیش‌های کشت ارگان حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت بلوغ کشت داده شدند. به محیط‌های کشت بلوغ گروه‌های تجربی به ترتیب مقادیر ۳، ۱/۵، ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر D- گلوکز اضافه شد و همه در انکوباتور ۳۸/۵ درجه سانتیگراد، دی‌اکسید کربن ۵ درصد و هوای ۹۵ درصد با رطوبت بالا برای مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. تخمک پس از کشت برای بررسی میزان بلوغ به‌طور تصادفی فیکس و ۷۷۶ تخمک دیگر را برای بررسی میزان لقاح و تکوین رویانی اولیه با اسپرم‌های ذوب شده گاو نر لقاح داده و بعد از ۱۸ ساعت از لقاح، ۳۸۷ تخمک (تخم فرضی) به منظور بررسی میزان لقاح فیکس و ۳۸۹ عدد دیگر در محیط‌های تکوینی مشابه تا مرحله بلاستوسیست (روز هشتم بعد از لقاح) کشت داده شدند. نمونه‌ها با استرئومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفته و نتایج با آزمون کای‌دو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بلوغ تخمک‌ها در محیط‌های دارای گلوکز در مقایسه با گروه کنترل (به ترتیب ۸۲، ۷۹ و ۸۰ درصد در مقابل گروه کنترل ۵۵ درصد) به‌طور معناداری بیشتر بوده است ($P < 0/001$) گرچه میزان لقاح تخمک‌ها در بین گروه‌های مختلف فرقی نداشت (به ترتیب ۵۷، ۵۴ و ۵۰ درصد در مقابل گروه کنترل ۴۹ درصد)، اما میزان تشکیل بلاستوسیست‌ها در گروه‌های مورد، به‌طور معناداری ($P < 0/01$) بیشتر از گروه کنترل بوده است (به ترتیب ۳۰، ۳۳ و ۳۲ درصد در مقابل گروه کنترل ۱۴ درصد).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که گلوکز در محیط کشت بلوغ، در بلوغ تخمک کومولوس‌دار و تکوین رویانی بعدی آن اثر مثبت دارد.

کلیدواژه‌ها: گلوکز، تخمک گاوی، بلوغ آزمایشگاهی، لقاح. «دریافت: ۸۴/۱۰/۲۷ پذیرش: ۸۵/۱۰/۱۲»

** استادیار گروه بیوشیمی و ژنتیک دانشکده پزشکی ساری

* دانشیار گروه تشریح دانشکده پزشکی ساری

*** دانشیار گروه علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی گرگان

**** دانشیار بخش زنان و زایمان، دانشگاه مک‌گیل، کانادا

مقدمه

رشد و تکوین اولیه رویان، نیاز به فعالیت متابولیکی قابل توجه برای تولید انرژی (ATP) و سنتز انواع مولکولهای پیچیده دارد (۱). مواد مغذی و سوبستراهای مختلف انرژی مورد استفاده برای بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاه، بر بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک به شدت تأثیر گذاشته و بعد از لقاح تخمک بر تکوین رویان اثر می‌گذارند (۲). تکوین رویان شدیداً تحت تأثیر شرایط بلوغ تخمک قرار دارد (۳). گلوکز، پرووات و لاکتات سوبستراهای اصلی برای متابولیسم انرژی در سلول‌های پیکری (کومولوس) هستند (۴ و ۵). پرووات سوبسترای اصلی انرژی است که می‌تواند به‌طور مستقیم به‌وسیله تخمک و تخم استفاده شود (۶). همچنین گلوتامین می‌تواند به‌عنوان یک سوبسترای انرژی، در بهبود بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های هامستر (۷) و خرگوش (۸) عمل کند. گزارش شده است که گلوکز و گلوتامین جهت پیشبرد سنتز ترکیبات پورینی جدید در داخل سلول‌های پیکری کومولوس، با هم عمل می‌کنند به‌طوری که زمان و مدت سنتز این ترکیب، تعیین‌کننده توقف یا ادامه تقسیم میوزی در تخمک‌ها خواهد بود (۹). به‌علاوه در طول بلوغ آزمایشگاهی تخمک مقداری از گلوکز می‌تواند به گلوکز آمین تبدیل شود و برای سنتز ماتریکس خارج سلولی و گسترش کومولوس استفاده شود (۳). همچنین گزارش شده است که ترکیب گلوکز و ۱۱ اسید آمینه در طول بلوغ آزمایشگاهی تخمک، برای تکامل بعد از لقاح رویان گاو مهم هستند (۱۰).

تحقیقات نشان داده است که سلول‌های کومولوس در استفاده از سوبستراهای انرژی (شامل گلوکز، پرووات،

تخمک، نقش مهم و کلیدی را بازی می‌کنند از طرف دیگر حضور هورمون محرکه فولیکولی باعث افزایش جذب گلوکز به‌وسیله مجموعه اووسیت، کومولوس شده و حضور هورمون لوتئین‌زینگ در محیط کشت قدرت تکاملی اووسیت‌ها را افزایش داده و اکسیداسیون گلوکز در داخل مجموعه کومولوس، اووسیت را افزایش می‌دهد (۱۱). استفاده تخمک از پرووات به‌واسطه ارتباطش با سلول‌های کومولوس است (۱۲). Geshi و همکارانش در سال ۲۰۰۰ گزارش کرده‌اند که سدیم پرووات در محیط بلوغی بدون سرم، می‌تواند بلوغ هسته‌ای تخمک‌های گاوی عاری از کومولوس را حمایت کند و پیش‌برد (۱۳)، اما Zheng و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان داده‌اند که پرووات به تنهایی برای بلوغ سیتوپلاسمی تخمک کافی نیست (۱۴). Sutton و همکارانش در سال ۲۰۰۳ اظهار داشتند گرچه تخمک‌ها توانایی محدودی در استفاده از گلوکز دارند، اما سلول‌های کومولوس می‌توانند گلوکز را از طریق گلیکولیز به پرووات یا لاکتات متابولیزه کنند تا به‌وسیله تخمک‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۳). همچنین سلول‌های کومولوس می‌تواند با حضور اسید آمینه سیستمین در محیط کشت بلوغ، گلوتامین را که یک ماده آنتی‌اکسیدان در داخل سلول است بسازند (۱۵).

بلوغ مجموعه تخمک، کومولوس در محیط بدون گلوکز منجر به اختلال در گسترش کومولوس و تکوین رویان می‌شود (۱۰). اما محققین دیگر اظهار داشتند که حضور، گلوکز در محیط کشت بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاه در تکوین رویانی پیش از جایگزینی رویان‌های هامستر (۱۶)، موش (۱۷) و گاو (۲۰-۱۸) می‌تواند اثرات

مجموعه تخمک، کومولوس چهاربار به سرعت در محیط فر با شستشوی تخمک (Hepes Buffered Tyrodes (Medium) TLH حاوی ۰/۳ درصد پلی‌وینیل پیرولیدون (Polyvinyl Pyrrolidone= PVP) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین شستشو شده‌اند (۲۴)، و به‌طور تصادفی به چهار گروه (سه گروه تجربی و یک گروه کنترل) تقسیم شدند. محیط کشت بلوغ شامل یک محیط با ترکیب شیمیایی مشخص (۲۵) که به آن ۰/۳ درصد PVP و ۷۵ میلی‌واحد در میلی‌لیتر هر یک از هورمون‌های محرکه فولیکولی (FSH) و لوتنیزینگ هورمون (LH) اضافه شد. بر اساس مطالعه زمینه‌ای، گروه کنترل تنها در محیط کشت بلوغ، گروه تجربی ۱ در محیط کشت بلوغ با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر D-گلوکز، گروه تجربی ۲ در محیط کشت بلوغ با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر D-گلوکز و گروه تجربی ۳ در محیط کشت بلوغ با غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر D-گلوکز کشت داده شدند. بعد از شستشو، ۱۰ تخمک در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت بلوغ در یک دیش کشت ارگان با حفره مرکزی کشت داده شدند. مجموعه تخمک - کومولوس در ۳۸/۵ درجه سانتیگراد در شرایط ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۵ درصد هوا با حداکثر رطوبت در انکوباتور قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت از کشت، به‌طور تصادفی ۳۹۴ تخمک به‌منظور بررسی میزان بلوغ، فیکس شدند و ۷۷۶ تخمک برای لقاح آزمایشگاهی استفاده شدند. همه مواد مصرفی در این تحقیق از شرکت سیگما تهیه گردیده است.

● آماده کردن اسپرم و لقاح آزمایشگاهی

نی‌های اسپرم در آب ۳۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۳۰

انسانی عاری از کومولوس در طول کشت در محیط آزمایشگاه اثرمهراری دارد (۲۱). Saito و همکارانش در (سال ۱۹۹۴) گزارش کرده‌اند که گلوکز در بلوغ تخمک‌های نارس هسته‌دار (ژرمینال وزیکول) موش مفید نیست و ممکن است مانع میوز و نیز بلوغ تخمک‌های فولیکولی شود (۲۲). درحالی‌که Lim و همکارانش در سال ۲۰۰۰ گزارش کردند که گلوکز بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های گاوی را به پیش می‌برد (۲۳). لذا با توجه به اظهارات متفاوت مذکور، اثر غلظت‌های مختلف گلوکز بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک و تکوین رویانی بعدی آن به بررسی بیشتری نیاز دارد. هدف از این مطالعه تعیین اثر غلظت‌های مختلف گلوکز بر روی بلوغ تخمک کومولوس دار گاوی، لقاح و تکوین رویانی اولیه آن در شرایط آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

● بلوغ تخمک‌ها در شرایط آزمایشگاه

تخمندان‌های گاو (۳۴۰ عدد) از یک کشتارگاه جمع‌آوری شد. گاوها از نوع هولشتین بالای سه سال بوده‌اند. تخمک‌ها در سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در مدت ۲ ساعت بعد از کشتار به آزمایشگاه انتقال داده شدند. مجموعه تخمک - کومولوس از فولیکول‌هایی به قطر ۶-۲ میلی‌متر با سرسوزن شماره ۱۸ وصل به یک سرنگ ۱۰ سی‌سی اسپیره و در زیر لوپ مجموعه تخمک، کومولوس‌هایی که دارای حداقل سه لایه سلول کومولوس در اطراف خود بوده و سیتوپلاسم هموزن داشتند، جمع‌آوری شده است. زیرا اندازه تخمک و ارتباط بین سلولی بین تخمک و سلول‌های کومولوس جهت کسب ظرفیت قابلیت بلوغ

(محلول اسید استیک و اتانل به نسبت ۱ به ۳) برای حداقل ۲۴ ساعت فیکس شدند تخمک‌ها سپس با اورسئین درصد رنگ آمیزی شدند (۲۵). لام‌ها در زیر میکروسکوپ فاز کتراست از نظر بلوغ تخمک و میزان لقاح بررسی شدند (۲۵).

بلوغ تخمک‌ها به صورت تخمک نارس هسته‌دار (germinal vesicle)، مرحله متافاز یک (MI) با مشاهده کروموزوم‌های موجود در هسته و بدون مشاهده جسم قطبی اولیه، مرحله متافاز دو (MII) با مشاهده جسم قطبی اولیه و کروموزوم‌های موجود در هسته سلول تعیین گردید. لقاح با مشاهده دو پرونوکلئوس همراه با دم اسپرم در سیتوپلاسم مشخص شده است. همچنین تخمک‌هایی با دو پرونوکلئوس و یک جسم قطبی ثانویه واضح اما بدون دم اسپرم هم به عنوان لقاح یافته تلقی شده‌اند.

میزان تخمک‌های بالغ، میزان تخمک‌های لقاح یافته و میزان بلاستوسیت‌های گروه‌ها محاسبه گردید برای مقایسه آماری از آزمون کای اسکویر استفاده شده و مقدار P کمتر از ۵٪ معنادار تلقی شده است.

یافته‌ها

همان طوری که در جدول ۱ نشان داده شده است، میزان بلوغ تخمک‌ها در محیط‌های بلوغ گروه‌های تجربی محتوی ۳، ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گلوکز (به ترتیب ۸۲، ۷۹ و ۸۰ درصد) بیشتر از میزان بلوغ تخمک‌ها در محیط بدون گلوکز یا محیط کنترل (۵۵ درصد) بوده است، آزمون نشان داد که این اختلاف به لحاظ آماری معنادار می‌باشد ($P < 0.001$) اما بین میزان بلوغ تخمک در

همکارانش در سال ۲۰۰۲ شرح داده‌اند به روش شناور کردن (swim-up) آماده شدند (۲۴). سپس اسپرم و تخمک در قطرات ۵۰ میکرولیتر از محیط لقاح (modified mTALP Tyrodes medium) محتوی ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر هیپارین در زیر روغن در دمای ۳۸/۵ درجه سانتیگراد در ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۵ درصد هوا با ماکزیمم رطوبت به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند (۲۴). غلظت نهایی اسپرم در هر قطره 1×10^6 اسپرم در هر میلی‌لیتر بود و در هر قطره ۵ تخمک قرار داده شد.

● کشت جنین

بعد از ۱۸ ساعت از لقاح ۳۸۷ تخمک (زیگوت فرضی presumptive zygote) برای بررسی میزان لقاح به طور تصادفی فیکس و ۳۸۹ تخمک برای بررسی تکوین رویانی اولیه سه بار در محیط TLH شستشو داده شدند و سپس به قطره ۵۰ میکرولیتری محیط تکوینی Bovine Embryo Culture Medium (BECM) مکمل با ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA (Bovine Serum Albumin) و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین در زیر روغن کشت داده شدند (۲۲). جنین‌ها ۱۲۰ ساعت بعد از لقاح در محیط مذکور کشت داده شدند و سپس به محیط کشت دیگری حاوی قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط BECM مکمل با ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله (Fetal Calf Serum =FCS) و ۰/۲۵ میلی‌مول اسیدپروویک در زیر روغن برای کشت تکوینی بیشتر (تا ۱۹۲ ساعت یا روز هشتم بعد از لقاح) قرار داده شدند.

● ثابت کردن (فیکس) تخمک‌ها

بعد از ۲۴ ساعت بلوغ و ۱۸ ساعت از لقاح، تخمک‌ها به وسیله پپتاژ مکانیکی از سلول‌های کومولوس عاری

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف گلوکز در محیط کشت بلوغ، بر روی میزان بلوغ تخمک کومولوس‌دار گاوی، لقاح و تکوین رویانی اولیه آن‌ها

در شرایط آزمایشگاه *

فراوانی بلاستوسیت‌ها، در روز هشتم بعد از لقاح			فراوانی اووسیت‌های لقاح یافته			فراوانی اووسیت‌های بلوغ یافته به مرحله متافاز دو			غلظت گلوکز (mg/l)
درصد	موارد مثبت	تعداد نمونه	درصد	موارد مثبت	تعداد نمونه	درصد	موارد مثبت	تعداد نمونه	
۱۴	۱۳ ^a	۹۳	۴۹	۴۵ ^a	۹۲	۵۵	۵۲ ^a	۹۵	۰
۳۰	۲۹ ^b	۹۷	۵۷	۵۶ ^a	۹۹	۸۲	۸۳ ^b	۱۰۱	۱
۳۳	۳۳ ^b	۱۰۰	۵۴	۵۲ ^a	۹۶	۷۹	۷۸ ^b	۹۹	۱/۵
۳۲	۳۲ ^b	۹۹	۵۰	۵۰ ^a	۱۰۰	۸۰	۷۹ ^b	۹۹	۳

* داده‌ها از ۶ بار تکرار آزمایش جمع‌آوری شده‌اند.

^{a,b} در هر ستون، اعداد با نشانه‌های مختلف، اختلاف معناداری با گروه کنترل (یا مقدار صفر) دارند (از راست به چپ در ستون ۲: $P < 0/001$)

در ستون ۳: $P < 0/05$)، ستون ۴، $P < 0/01$.

بحث

یافته‌های این تحقیق نشان داد که افزودن گلوکز به محیط کشت بلوغ اووسیت گاوی، در مقایسه با کنترل به‌طور معناداری سبب بلوغ اووسیت نابالغ می‌شود ($P < 0/001$) و نتایج گزارشات قبلی در این زمینه را تأیید می‌کند (۲۶ و ۲۷).

گرچه درصد بلوغ اووسیت‌ها در مطالعه حاضر (جدول ۱) به مراتب بیشتر از درصد اووسیت‌های بلوغ یافته در نتایج گزارش شده توسط Hashimoto و همکارانش در سال ۲۰۰۰ بوده است که این تفاوت می‌تواند ناشی از ترکیبات محیط کشت بلوغ و شرایط کشت باشد، بلکه مشابه نتایج آن‌ها با افزایش غلظت گلوکز در محیط بلوغ، درصد بلوغ اووسیت کاهش داشته است (۸۰ درصد با ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مقابل ۸۲ درصد با ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). بنابراین نتایج نشان می‌دهد که غلظت پائین

معناداری وجود نداشت. همچنین میزان گسترش کومولوس در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه مورد به مراتب بیشتر بوده است. بین میزان لقاح تخمک‌های گروه‌های تجربی (به ترتیب ۵۷، ۵۴ و ۵۰ درصد) در مقایسه با گروه کنترل (۴۹ درصد) اختلاف معناداری وجود نداشت. همچنین میزان تشکیل بلاستوسیت در گروه‌های تجربی (به ترتیب ۳۰، ۳۳ و ۳۲ درصد) بیشتر از گروه کنترل (۱۴ درصد) بوده است و آزمون نشان داد که این اختلاف به لحاظ آماری معنادار می‌باشد ($P < 0/01$). بین میزان تشکیل بلاستوسیت در گروه‌های تجربی با غلظت‌های مختلف گلوکز اختلاف معناداری وجود نداشت.

تعداد کل تخمک‌ها ۱۱۷۰ عدد (۳۹۴ تخمک در ستون ۲ برای بررسی میزان بلوغ، ۳۸۷ تخمک در ستون ۳ برای بررسی میزان لقاح و ۳۸۹ تخمک در ستون ۴ برای

ماده یک پیش ساز متابولیک برای سنتز هگزوز آمین ها است و افزودن آن به محیط کشت باعث بهبود گسترش سلول های کومولوس توده کومولوس - اووسیت می گردد، همراه با گلوکز اضافه شده به محیط کشت بلوغ اسید هیالورونیک را می سازند. اسید هیالورونیک باعث گسترش سلول های کومولوس شده و سلول های کومولوس که در طول بلوغ آزمایشگاهی نقش مهمی در جذب گلوکز دارند، گلوکز موجود در محیط را جذب نموده و به پیرووات تبدیل می کند (۲۹).

همچنین نقش اصلی گلوکز در طول بلوغ اووسیت به خصوص در مراحل آغازین بلوغ آزمایشگاهی اووسیت، تولید TP و اسید کربوکسیلیک از طریق گلیکولیز است (۱۱).

افزودن گلوکز به محیط کشت، گلیکولیز اووسیت را افزایش می دهد و بالارفتن میزان گلیکولیز در اووسیت های بلوغ یافته در شرایط آزمایشگاه، قدرت تکوینی اووسیت را بالا می برد (۲۶). به علاوه مجموعه کومولوس - اووسیت علاوه بر راه گلیکولیز، از راه پنتوز فسفات گلوکز را متابولیزه می کند و به نظر می رسد متابولیت های گلوکز ضمن تولید انرژی، در تنظیم بلوغ میوزی اووسیت و نیز در سنتز نوکلئوپورین ها جهت تنظیم بلوغ هسته ای اووسیت شرکت می کنند (۱۰ و ۲۶) و بنابه اظهارات Sutton و همکارانش (۳۰)، غلظت گلوکز در طول بلوغ مجموعه اووسیت - کومولوس روی چندین عمل شامل پیشرفت میوزدر اووسیت، قابلیت تکوینی اووسیت و گسترش کومولوس تأثیر می گذارد.

گرچه در مطالعه حاضر حضور ۱ میلی گرم در میلی لیتر گلوکز یا بیشتر در محیط کشت بلوغ اووسیت

برای تکامل رویان فراهم می کند اما افزایش غلظت گلوکز باعث افزایش درصد بلوغ اووسیت نمی گردد. مطالعات در این زمینه نشان داده است که غلظت پائین گلوکز در طول کشت جنین های گاوی سودمند است اما غلظت بالای گلوکز در محیط کشت، تکامل رویانی اولیه در شرایط آزمایشگاه را مهار می کند و تأثیرات معکوس روی تکامل بعدی جنین دارد. پیشنهاد شده است این تأثیرات ممکن است مربوط به افزایش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و کاهش ذخیره داخل سلولی گلوکوتایون باشد (۲۰، ۲۲، ۲۷ و ۲۸).

تحقیقات نشان داده است که سلول های کومولوس در استفاده از سوبستراهای انرژی (مانند گلوکز) در طول بلوغ آزمایشگاهی اووسیت نقش مهم و کلیدی را بازی می کنند، به طوری که در فقدان این سلول ها، اووسیت های نابالغ پستانداران به علت نقص در انتقال گلوکز سطح بسیار پایینی از جذب، فعالیت گلیکولیتیک و اکسیداسیون گلوکز را از خود نشان می دهند (۲۲ و ۲۶). از طرفی گسترش مطلوب توده کومولوس برای اوولاسیون طبیعی و نیز لقاح بعدی ضروری به نظر می رسد (۱).

مطالعات نشان داده است که اسید هیالورونیک عامل اصلی گسترش کومولوس است (۱۱). گلوکز، گلوکوتامین و هگزوز آمین ها از سوبستراهای اصلی سنتز اسید هیالورونیک هستند، به طوری که ناکافی بودن سوبستراها برای سنتز اسید هیالورونیک (مانند گلوکز) در محیط کشت بلوغ منجر به اختلال در تکمیل بلوغ هسته ای (۲۷)، گسترش اووسیت و تکوین بلاستوسیست می شود (۱۰)؛ لذا پیشنهاد می شود با توجه به این که یکی از ترکیبات موجود در محیط کشت بلوغ تحقیق ما مشابه

علت این سوبسترای انرژی منحصر به فرد مربوط به فعالیت گلیکولیتیک پایین و توقف یکی از آنزیم‌ها مانند ۶- فسفات- فروکتوکیناز است (۶). Iwata و همکارانش در سال ۱۹۹۸ گزارش کرده‌اند که متابولیسم گلوکز در سراسر تکوین رویانی متغیر است، به طوری که در مراحل اولیه تکوین رویان گاوی با حضور درصد کم گلوکز در محیط کشت بلوغ، متابولیسم گلوکز در مقایسه با مورولا یا بلاستوسیست پایین است. اما حضور غلظت بالای گلوکز (۴/۵ میلی‌مول) در محیط کشت بلوغ، تکوین رویانی از مرحله ۴ سلولی به مرحله بلاستوسیست را مهار می‌کند (۲۰).

مطالعات متعددی نشان داده است که گلوکز زیادی در محیط کشت بلوغ در تکوین اووسیت‌های هامستر (۱۶) و (۳۱)، گاو (۲۰-۱۸) و موش (۱۷، ۲۰ و ۳۲) به مرحله بلاستوسیست اختلال ایجاد می‌کند که این امر می‌تواند احتمالاً به علت افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش گلوکاتایون داخل سلولی موجود در اووسیت باشد، زیرا رادیکال‌های آزاد اکسیژن بیشتری در شرایط کشت آزمایشگاهی نسبت به شرایط کشت داخل بدن تولید می‌شود که این امر می‌تواند مربوط به زیر حد مطلوب بودن فشار اکسیژن باشد (۲۰ و ۲۸). اکسیژن برای ادامه حیات نیاز است اما متابولیت‌هایش نظیر انواع اکسیژن‌های فعال (Reactive oxygen Species (ROS)) می‌تواند عمل سلول را تغییر دهد و یا برای حیات سلول خطرناک باشد. بنابراین به منظور حفظ عمل طبیعی سلول، ROS اضافی باید به طور دائم غیرفعال شود که این عمل به وسیله آنتی‌اکسیدان‌های موجود در سلول رخ می‌دهد. آنیون سوپراکسید (O_2)، رادیکال هیدروکسیل

نداشت، اما به طور معناداری سبب تکوین رویانی بعدی تا مرحله بلاستوسیست شده است ($P < 0/01$). نتایج ما از نظر میزان لقاح با نتایج گزارش Hashimoto و همکارانش (۲۷) تفاوت داشته است که این تفاوت ممکن است ناشی از محیط کشت لقاح و کیفیت اسپرم باشد، اما از نظر میزان بلاستوسیست با مطالعات قبلی در این زمینه مطابقت داشته است (۱۰، ۲۶ و ۲۷) و با نتایج تحقیق Iwata و همکارانش (۲۰) که گزارش کردند غلظت ۴/۵ میلی‌مول گلوکز در محیط کشت بلوغی، تکوین رویانی به مرحله بلاستوسیست را در مقایسه با کنترل به طور معناداری مهار می‌کند اما اختلاف معناداری بین غلظت ۱/۵ میلی‌مول گلوکز با گروه کنترل روی تکوین رویانی وجود ندارد، مغایرت داشته است زیرا همان طوری که این محققین اظهار داشته‌اند آن‌ها در ترکیب محیط کشت بلوغی خود از ۱۰٪ FCS استفاده کرده‌اند که حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم گلوکز بوده است و در گروه‌های مورد و شاهد وجود داشت. لذا ما در این تحقیق برای رفع این مشکل به جای FCS از PVP استفاده کردیم. به نظر می‌رسد با توجه به متغیر بودن متابولیسم گلوکز تأثیر آن در مراحل اولیه تکوین رویانی چندان محسوس نباشد اما با پیشرفت تکوین اثرات خود را بیشتر نشان خواهد داد.

در مطالعات انجام شده روی مرحله پیش از لانه‌گزینی رویان موش نشان داده شد که تغییرات مهمی در متابولیسم انرژی در طول کلیواژ روی می‌دهد. مهم‌ترین این تغییرات در ارتباط با استفاده از گلوکز است. برای مثال رویان دو سلولی موش نمی‌تواند از هر دو سوبسترا (گلوکز و پیرووات) استفاده کند بلکه تنها می‌تواند از پیرووات استفاده کند اما بر خلاف آن رویان هشت

نتیجه گیری

یافته های این تحقیق نشان داد که حضور گلوکز در محیط کشت بلوغ برای بلوغ اووسیت کومولوس دار گاوی و تکامل رویانی بعدی اثر مثبت دارد. به طوری که غلظت پایین گلوکز (۱ میلی گرم در میلی لیتر) نه تنها برای بلوغ اووسیت گاوی مؤثر است بلکه برای تکوین بعدی رویان مفید می باشد اما افزایش غلظت گلوکز باعث افزایش درصد بلوغ اووسیت نمی گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله محققان مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاری آقایان احمد کمال عبدالجلیل و جین ته چونگ اعلام می دارند.

اصلی هستند (۲۸ و ۳۳). رادیکال های آزاد اکسیژن تولید شده در شرایط آزمایشگاه با پروتئین ها، لیپیدها و DNA سلول واکنش نشان می دهند و منجر به غیرفعال شدن آنزیم ها، پراکسیداسیون غشای لیپیدی و تغییرات DNA می شود. غلظت بالای هیدروکسید اکسیژن سبب پراکسیداسیون لیپید می شود و منجر به مرگ سلول می شود. همچنین شواهدی وجود دارد که تولید رادیکال های آزاد به وسیله اتواکسیداسیون گلوکز در شرایط فیزیولوژیکی ایجاد می شود که به نوبه خود تکثیر سلولی را طولانی می کند یا تغییرات بیوشیمیایی ایجاد می کند که عمل سلول را تغییر می دهد یا سبب مرگ سلولی در محیط آزمایشگاه می شود (۲۰ و ۲۸).

Abstract:***Effect of Various Concentrations of Glucose on Bovine Cumulus-Oocyte Complexes Maturation, Fertilization and Early Embryonic Development in Vitro***

Rezaei, N.¹; Hashemi, S.M.B²; Golalipour, M.J.³; Chian, R.C.⁴

1. Associate professor, Department of Anatomy, Mazandaran University of medical sciences, Iran.

2. Assistant professor, Department of Biochemistry & Genetics, Mazandaran University of medical sciences, Iran.

3. Associate professor, Department of Anatomy, Gorgan University of medical sciences, Iran.

4. Associate professor, Department of Gynecology, McGill University, Canada.

Background & Objectives: Different energy substrates and nutrients can greatly influence oocyte nuclear and cytoplasmic maturation. Effect of glucose on in-vitro oocyte maturation and subsequent early embryonic development is controversial. The objective of the present study was to verify the effect of various concentrations of glucose on cumulus-oocyte complexes maturation, fertilization and early embryonic development using a bovine model.

Materials & Methods: Ovaries were collected from the local abattoir and brought into laboratory. Cumulus-oocyte complexes (n=1170) were aspirated from follicles, randomly divided into 4 groups (3 treatment/experimental & 1 control), and cultured in an organ culture dish containing 1 ml maturation medium, in treatment groups, chemically defined medium, supplemented with 1.0, 1.5 or 3.0 mg/ml D-glucose respectively, at 38.5 degrees on the Celsius scales in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air with high humidity for 24 hours. Following maturation, 394 oocytes were fixed randomly for 24h, for maturation rates; and 776 oocytes were inseminated with frozen-thawed bull semen for fertilization rates and early embryonic development, 387 oocytes (presumptive zygotes) fixed randomly for fertilization rates, and 389 oocytes (presumptive zygotes) were cultured for development with similar medium to blastocyst stage (day 8). The samples were examined by streomicroscope and the results were analysed by X² test.

Results: The oocytes maturation rates were higher ($P<0.001$) in the medium contained glucose compared to the control group (82%, 79% and 80% vs. 55% respectively). Although fertilization rates of oocytes were not different among groups, (57%, 54% and 50% vs. 49% respectively), the rates of blastocyst formation in the treatment group were significantly higher ($p<0.01$) than the control (30%, 33% and 32% vs. 14%).

Conclusion: These results confirm that the presence of glucose, in the maturation medium, is important for oocyte maturation and the subsequent embryonic development.

Keywords: Bovine Oocyte, In Vitro Maturation, Glucose, Fertilization.

منابع

1. Furnus CC, Matos DG, De Martinez AG, Matkovic M. Effect of glucose on embryo quality and post-thaw viability of in-vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 1997; 47:481-90
2. Dows SM, Hudson GD. Energy substrates and the completion of spontaneous meiotic maturation. *Zygote* 2000; 8:339-51
3. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* 2004; 128(3):313-19
4. Kim JH, Funahashi H, Niwa K, Okuda K. Glucose requirements at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology* 1993; 39:875-86
5. Rieger D, Loskutoff NM. Changes in the metabolism of glucose, Pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 1994; 100:257-62
6. Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 1984; 72(1):9-13
7. Gwatkin and Haidri. Requirements for the maturation of hamster oocytes in vitro. *Exp Cell Res* 1973; 76(1):1-7
8. Bae IH, Foote RH. Utilization of glutamine for energy and protein synthesis by cultured rabbit follicular oocytes. *Exp Cell Res* 1975; 90(2):432-6
9. Downs SM, Verhoeven A. Glutamine and the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes: influence of culture medium, glucose, and cumulus cells. *Mol Reprod Dev* 2003; 66(1):90-7
10. Rose-Hellekant TA, Libersky-Williamson EA, Bavister BD. Energy substrates and amino acids provided during in vitro maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote* 1998; 60:285-294
11. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Uptake* 2003; 9(1):35-47
12. Leese HJ, Barton AM. Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. *J Exp Zool* 1985; 234(2):231-

13. Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod* 2000; 63(6):1730-4
14. Zheng P, Bavister BD, Ji W. Energy substrate requirement for in vitro maturation of oocytes from unstimulated adult rhesus monkeys. *Mol Reprod Dev* 2001; 58(3):348-55
15. de Matos D, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of bovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 2002; 57:1443-51
16. Barnett DK, Bavister BD. Inhibitory effects of glucose and phosphate on the second cleavage division of hamster embryos is it linked to metabolism? *Hum Reprod* 1996; 11:177-83
17. 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(2):679-88
18. Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryo: influence of glucose, lactate, pyruvate, aminoacids and vitamins. *Theriogenology* 1992; 37:963-78
19. Donnini D, Zambite AM, Perrella G, Ambesi-Impimbateo FS, Curcio F. Glucose may induce cell death through a free radical-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219:412-17
20. Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology* 1998; 50:365-75
21. Cekleniak NA, Combelles CM, Ganz DA, Fung J, Albertini DF, Racowsky C. A novel system for in vitro maturation of human oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75(6):1185-93
22. Saito T, Hiroi M, Kato T. Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice. *Biol Reprod* 1994; 50:266-70
23. Lim Jm, Lee BC, Lee EC, Chung HM, Koj J, Paik SE, et al. In vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein free medium: effects of carbohydrates and amino acids. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11(2):127-32
24. Chian RC, Chung J, Downey BR, Tan SL. Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. *Reprod Biomed Online* 2002; 4(2):129-34
25. Rezaei N, Chian RC. Effects of essential and non-essential amino acids on in vitro maturation, fertilization

26. Krisher RL, Bavister BD. Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes in vitro is associated with increased developmental competence. *Mol Reprod Dev* 1999; 53(1):19-26
27. Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev* 2000; 56:520-26
28. Iwata H, Hashimoto S, Ohota M, Kimura K, Shibano K, Miyake M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reprod* 2004; 127:159-64
29. Gandolfi F, Milanesi E, Pocar P, Luciano AM, Brevini TAL, Acocella F, et al. Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation . *Mol Reprod Dev* 1998; 49:168-75
30. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG: Effect of hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear maturation during in vitro maturation in a synthetic follicle fluid medium. *Rprod Fertil Dev* 2005; 17(4):407-15
31. McKiernan SH, Bavister BD, Tasca RJ. Energy substrate requirements for in-vitro development of hamster 1- and 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 1991; 6(1):64-75
32. Downs SM, Humpherson PG, Martin KL, Leese HJ. Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in cumulus-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1996; 44:121-31
33. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2000; 79:829-43