دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

تاثیر اسید رتینوئیک بر بلوغ برون تنی تخمک های نابالغ کومولوس دار گوسفند

م. خانی[۱]، ح. دقیق کیا[۲]، ا. زارع شحنه[۳] و ص. علیجانی[۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز
۲- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه تبریز (نویسنده مسوول)
۳- استاد گروه علوم دامی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱۷

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی تاثیر دوزهای مختلف اسید رتینوئیک ال ترانس بر بلوغ برون تنی تخمک های کومولوس دار نابالغ گوسفند بود. تخمک های کومولوس دار از فولیکول هایی با قطر ۶-۲ میلی متر به روش آسپیره کردن گرفته شدند. اسید رتینوئیک ال ترانس در دوزهای ۰، ۱، ۱/۵ و ۲ میکرومولار به محیط کشت بلوغ اضافه شدند. برای انجام فرآیند بلوغ همه تیمارها به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۸/۵°C قرار داده شدند. فرآیند آغاز میوز و بلوغ تخمک پس از رنگ آمیزی با میکروسکوپ اینورت بررسی و نتایج حاصل با رویه GLM تجزیه و تحلیل شدند. هیچ یک از تخمک ها در گامه GV باقی نماندند. تعداد تخمک ها در گامه GVBD در تیمار کنترل نسبت به تیمار دو میکرومولار افزایش معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۵). نرخ بلوغ تخمک در غلظت ۲ میکرومولار نیز نسبت به تیمار کنترل و تیمار یک میکرومولار افزایش معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد، افزودن دو میکرومولار اسید رتینوئیک به محیط کشت بلوغ حاوی تخمک های نابالغ، بلوغ تخمک ها را در محیط کشت تجاری TCM199 بهبود می بخشد.

کلید واژه ها: اسید رتینوئیک، بلوغ برون تنی، GV، GVBD، تخمک نابالغ

مقدمه

بلوغ برون تنی، فرآیندی است که در طی آن تخمک‌های پوشیده با سلول‌های کومولوس برای بالغ شدن، در محیط‌های فیزیولوژی ویژه‌ای قرار داده می‌شوند. بلوغ برون تنی برای اولین بار توسط پینکوس و انزمان مطرح شد. این پژوهشگران توانستند بدون استفاده از هورمون، تقسیم میوز را در تخمک فولیکول های رسیده خرگوش فعال کنند و تخمک های نابالغ[۱] را به گامه بلوغ اولیه[۲] برسانند (۱۰). تخمک‌های پستانداران در زمان تولد در پروفاز میوز اول متوقف می‌شوند. لازم است قبل از لقاح موفق، فرآیند میوز، از سر گرفته و تکمیل شود. بلوغ تخمک نابالغ،

1- Germinal Viscle (GV)
2- Germinal Viscle Breakdown (GVBD)

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-18]

مستلزم بلوغ هسته‌ای و بلوغ سیتوپلاسمی است. وقایع اصلی بلوغ هسته‌ای شامل GVBD، متراکم شدن هسته، پیشرفت به گامه ی متافاز یک، خروج اولین جسم قطبی و به دنبال آن توقف در متافاز دو، می باشند. تغییر و تبدیل در سیتوپلاسم تخمک شامل دوباره پخش شدن اندامک ها، تغییرات در فعالیت پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن و فاکتور افزایش دهنده بلوغ، افزایش میزان mRNA ذخیره شده و پروتئین‌ها و کاهش میزان CAMP داخل سیتوپلاسم می باشند. مهاجرت گرانول‌های قشری[1] از جایگاه تولید (معمولاً دستگاه گلژی) به سمت غشای پلاسمایی گامه مهمی در بلوغ سیتوپلاسمی است. بلوغ هسته و سیتوپلاسم تخمک در مسیر همزمان شده‌ای رخ می‌دهند و شکست در تکمیل این فرآیندها سبب به خطر افتادن شایستگی رشد و نمو تخمک می شود (۴).

روش های بلوغ برون تنی تخمک نابالغ، از رخدادهای موجود درون بدن مانند دوره رشد پیش از تخمک ریزی که شایستگی رشد و نمو تخمک را منتقل می‌کند، بی بهره اند، لذا تخمک‌های بالغ شده در شرایط برون تنی شایستگی کمتری نسبت به تخمک‌های بلوغ یافته درون بدن موجود زنده دارند (۸). بنابراین ایجاد محیطی که بتواند تعداد تخمک‌های بلوغ یافته را در شرایط برون تنی افزایش دهد، بسیار حایز اهمیت می‌باشد (۱۱). روش به کار گرفته شده در این تحقیق امکان به دست آوردن تخمک با کیفیت مناسب از حیوان با ارزش و نادری که به علت آسیب، بیماری و یا سن نابارور هستند را ممکن می‌سازد. با توجه به این که حدود ۶۰ درصد تخمک‌های نابالغ گوسفند در آزمایشگاه بالغ می‌شوند، اضافه کردن هورمون ها، فاکتورهای رشد و ویتامین‌ها از جمله ویتامین A به منظور افزایش کارایی آنها به محیط کشت مناسب به نظر می رسند (۸ و ۱۲). توانایی رشد تخمک ها به وسیله رتینوئیدها تحریک شده و افزایش می یابد، در نتیجه افزودن نوع ال ترانس رتینول به حیوانات، باعث افزایش توانایی تخمک ریزی و رشد جنین در گاوها و گوسفندها می شود (۷). رتینوئید ها خانواده بزرگی از ترکیبات طبیعی هستند که نقش مهمی در رشد و نمو مهره داران و تمایز سلولی دارند. نوع ال ترانس از جمله مهمترین رتینوئیدها در تشکیل جنین مهره داران است. تمایز ایجاد شده به وسیله رتینوئیدها با ایجاد تغییرات معین در بیان ژن های هوموباکس، فاکتورهای رشد و گیرنده های آنها همراه است (۱۳). تاثیرات مختلف نوع ال ترانس رتینول ها به وسیله اتصالات اختصاصی آنها به پروتئین های متصل شونده به رتینول تنظیم می شود. عملکرد اسید رتینوئیک به طور غیر مستقیم از طریق دو زیر واحد گیرنده های هسته شامل: گیرنده های X رتینوئید[2] (RXR) و گیرنده های اسید رتینوئیک هسته ای[3] (RAR) تنظیم می شود. کمپلکس سوبسترا گیرنده از طریق همکاری با برخی از فاکتورهای معین مسئول در این امر، که در

1- Cortical granules 2- Retinoic X Receptors 3- Retinoic Acid Receptors

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-18]

ناحیه پروتومور ژن های هدف قرار دارند، سبب آغاز و یا سرکوب فعالیت ژن می شوند (۱۵). اسید رتینوئیک ال ترانس سبب فعالیت گیرنده RAR می شود. این گیرنده توانایی اتصال به توالی خاصی از DNA که فاکتورهای گیرنده اسید رتینوئیک نامیده می شوند را دارند. این اتصال به منظور افزایش و یا کاهش بیان ژن رخ می‌دهد و از این طریق تمایز را در بسیاری از سیستم‌های سلولی القا می کند و سبب کنترل رخدادها در چرخه سلولی می شود (۱۷). با توجه به این که اسید رتینوئیک روی سلول جهت تشکیل و یا تغییر الگوی فعالیت ژن عمل می کند، و به علت داشتن خواص آنتی اکسیدانی، می تواند بلوغ سیتوپلاسمی و شایستگی تخمک را برای پیشرفت در رشد و نمو تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تاثیر غلظت های مختلف اسید رتینوئیک بر بلوغ برون تنی تخمک های گوسفند می باشد.

مواد و روشها

جمع آوری تخمدان ها و تخمک ها

نمونه های تخمدان گوسفند از کشتارگاه کرج راک واقع در کرج جمع آوری شدند. تخمدان ها بلافاصله پس از کشتار درون ترموفلاسک حاوی سرم فیزیولوژی گرم (۳۵-۳۰ درجه سانتی گراد) و یک درصد پنی سیلین- استرپتومایسین جمع آوری شده و در مدت کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه فیزیولوژی گروه علوم دامی دانشگاه تهران انتقال یافت. استحصال تخمک ها از فولیکول‌های ۶-۲ میلیمتری به کمک دستگاه ایجاد کننده خلاء که به سر سوزن با درجه ۲۰ متصل بود، انجام شد. لوله فالکون تا اتمام آسپیره کردن تخمدان‌ها داخل بن‌ماری در دمای $38/5^{\circ}C$ نگهداری شد. سپس حدود ۱۰-۵ دقیقه اجازه داده شد تا محتوای فالکون به ته آن رسوب کند.

بلوغ برون تنی تخمک ها

پس از ارزیابی تخمک های کومولوس دار، به کمک پیپت پاستور ۴ بار توسط محیط کشت HEPES-TCM-199 که با ۵ درصد سرم جنین گاوی و یک درصد پنی سیلین- استرپتومایسین غنی شده بود و یک بار نیز با محیط بلوغ TCM-199 که حاوی ده درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ IU/ml پنی سیلین، ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین، ۰/۰۱ IU/ml هورمون LH و ۵ µg/ml هورمون FSH بود، شستشو داده شدند. تخمک های کومولوس دار مناسب مطابق گروه های زیر انتخاب شدند.

هر تیمار دارای ۳ تکرار بوده و هر تکرار دارای ۵۰ تخمک نابالغ بود. هر تیمار در مجموع دارای ۱۵۰ تخمک نابالغ بوده و کل تخمک های نابالغ بکار رفته در این آزمایش ۶۰۰ تا بود. تخمک ها در محیط بلوغ TCM-199 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین، IU/ml ۱۰۰ پنی سیلین، ۰/۰۱ IU/ml هورمون LH و µg/ml ۵ هورمون FSH قرار داده شدند. محیط کشت تیمارهای کنترل، اول، دوم و سوم به ترتیب دارای غلظت های متفاوتی از اسید رتینوئیک ال ترانس (۰، ۱، ۱/۵ و ۲ میکرومولار) بودند. اسید رتینوئیک ماده محلول در چربی بوده و به سختی در آب حل

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-18]

می‌شود، از این‌رو و به منظور استفاده از آن در محیط کشت باید قبل از افزودن آن به محیط کشت دریک حلال مناسب حل شود. بدین منظور از اتانل مطلق استفاده شد. رقیق سازی اسید رتینوئیک به روش رقیق سازی پی‌درپی[1] با استفاده از اتانل ۰/۱ درصد و محیط کشت TCM-199 انجام شد. در روز استفاده، ۵۰ میکرولیتر از محلول غلیظ ذکر شده، به ۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت بلوغ اضافه شد و در گامه بلوغ تخمک به صورت قطره گذاری، به تیمارها اعمال شد و تخمک‌های هر گروه به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور $^{\circ}$C ۳۸/۵ با ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت قرار داده شدند.

ارزیابی بلوغ هسته ای

پس از ۲۴ ساعت، ابتدا پراکندگی کومولوسی ارزیابی (شکل یک) و سپس تخمک ها به وسیله ۱۰۰ IU/ml آنزیم هیالورونیداز بدون کومولوس شدند. پس از آن وضعیت هسته تخمک ها با استفاده از رنگ اورسئین یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. تخمک هایی که تغییر شکلی در هسته نداشتند (نابالغ) به عنوان GV، تخمک هایی که هسته شکسته داشتند به عنوان GVBD، تخمک های با نشانه شروع تقسیم میوز در گامه متافاز یک و تخمک های بالغ در گامه متافاز دو شناسایی شدند.

طرح آزمایشی

این آزمایش با چهار تیمار در سه تکرار انجام شده است. برای هر تکرار ۵۰ تخمک نابالغ و برای هر تیمار ۱۵۰ تخمک در نظر گرفته شد. داده های حاصل از آزمایش با روش طرح پایه کاملا تصادفی براساس مدل آماری زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با توجه به ماهیت داده ها که به صورت تعداد و درصد بودند، بنابراین توام با انجام تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS (۱۸)، توزیع نرمال باقیمانده ها نیز با آزمون شاپیرو-ویک مورد بررسی قرار گرفت. در صورت نیاز از تبدیل آرک سینوس استفاده شد.

$$y_{ij}=\mu+t_i+e_{ij}$$

y_{ij}: درصد تخمک های بالغ، μ: میانگین کل جمعیت، t_i: اثر تیمار iام و e_{ij}: خطای آزمایش را نشان می دهد. برای مقایسه میانگین بین تیمارها از روش مقایسه میانگین حداقل مربعات استفاده شد.

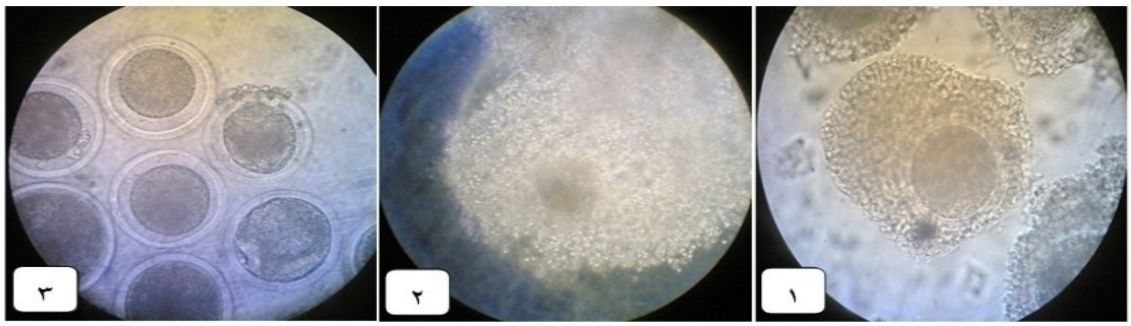
نتایج و بحث

در این تحقیق ۶۰۰ تخمک نابالغ پس از ارزیابی پراکندگی کومولوس، رنگ آمیزی شده و وضعیت هسته ای آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هیچ تفاوت معنی داری بین گروه های مختلف در ارتباط با تعداد تخمک هایی که پس از بلوغ برون تنی در گامه GV که حاوی هسته بدون تغییر شکل بودند، وجود نداشت و در حقیقت این تعداد برای همه گروه ها صفر بود. درصد تخمک های باقیمانده در گامه GVBD، در گروه کنترل و تیمارها به ترتیب ۲۳/۵، ۱۷/۷، ۱۵/۱ و ۹/۵ بود. درصد تخمک های باقیمانده در گامه GVBD در تیمار دو میکرومولار نسبت به سایر گروه ها کمتر بود. تعداد تخمک‌ها در گامه GVBD در تیمار کنترل

1- Serial Dilution

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-18]

نسبت به تیمار دو میکرومولار افزایش معنی داری نشان دارد (P<۰/۰۵). در بین سایر تیمارها تفاوت معنی داری مشاهده نشد. درصد متافاز یک در گروه کنترل و تیمارها به ترتیب ۱۶/۳، ۱۹/۳، ۱۲/۶ و ۱۲/۱۰ و درصد متافاز دو ۶۰/۳، ۶۵/۷، ۶۹/۸ و۷۸/۴ بود. نتایج آنالیز حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمار ۱ میکرومولار با تیمارهای ۱/۵ و ۲ میکرومولار در گامه متافاز یک می باشد (P<۰/۰۵). تعداد تخمک ها در گامه متافاز دو تفاوت معنی داری در تیمار کنترل نسبت به تیمارهای ۱/۵ و ۲ میکرومولار نشان داد (P<۰/۰۵) (جدول۱). در نهایت این آزمایش بیانگر آن است غلظت دو میکرومولار شرایط بهینه تری را برای رشد تخمک ها نسبت به گروه کنترل و یک میکرومولار ایجاد کرده است.



کومولوسی را نشان می‌دهد که بعد از پیپتینگ (تکنیکی برای جدا کردن سلول‌های کومولوس) روی تخمک باقی مانده است که اگر حتی یکی از آن‌ها روی تخمک باقی بماند، بعد از رنگ آمیزی تخمک، کروموزوم‌های آن سلول کومولوس روی تخمک نمایان می‌شود و ایجاد اشتباه می‌کند.

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد بلوغ هسته ای تخمک های کومولوس دار نابالغ گوسفند در غلظت های مختلف اسید رتینوئیک ال ترانس پس از ۲۴ ساعت

غلظت اسید رتینوئیک	تعداد کل تخمک نابالغ	بلوغ هسته ای (درصد میانگین)		
		GVBD	MI	MII
۰	۱۵۰	۲۳/۵^{a}	۱۶/۳^{ab}	۶۰/۳^{c}
۱	۱۵۰	۱۷/۷^{ab}	۱۹/۳^{a}	۶۵/۷^{bc}
۱/۵	۱۵۰	۱۵/۱^{ab}	۱۲/۶^{b}	۶۹/۸^{ab}
۲	۱۵۰	۹/۵^{b}	۱۲/۱^{b}	۷۸/۴^{a}
میانگین خطای استاندارد		۲/۵۱	۱/۸۳	۲/۷۱

در هر ستون نداشتن حرف مشترک بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها می باشد. GVBD: تخمک هایی که در گامه ی ناپدید شدن وزیکول زاینده هستند. MI: تخمک‌هایی که در گامه متافاز یک قرار دارند. MII: تخمک هایی که در گامه متافاز دو قرار دارند.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-18]

بین نتایج به دست آمده توسط محققین در ارتباط با تاثیر اسید رتینوئیک بر بلوغ برون تنی تخمک‌های گونه‌های مختلف اختلافاتی وجود دارد که تصور می‌شود یکی از علت‌های آن به دلیل محیط کشت‌ها و افزودنی‌های مختلفی باشد که در تحقیقات مختلف استفاده می‌شود.

لیما و همکاران در محیط کشت پایه خود از FSH و داکو و همکاران در محیط کشت خود از FSH، LH و ۱۷- بتا استرادیول استفاده کرده بودند که نتایج بدست آمده متفاوت بود. به طوری که داکو و همکاران گزارش کردند که اسید رتینوئیک در این محیط تأثیری در قابلیت رشد و نمو تخمک ها و تشکیل بلاستوسیست ندارد. بنابراین وجود افزودنی‌های مختلف ممکن است اثر رتینوئیدها روی تخمک‌های گاو را بپوشاند (۶ و ۱۴). در تحقیق حاضر نیز از TCM 199 که با FSH، LH و FBS مکمل‌سازی شده بود، استفاده شد که حضور اسید رتینوئیک نسبت به تیمار بدون اسید رتینوئیک بلوغ هسته ای بالاتری را نشان داد.

آلمینانا و همکاران گزارش کردند که ۹- سیس اسید رتینوئیک تأثیری بر بلوغ هسته‌ای تخمک های خوک ندارد که با نتایج حاصل این آزمایش مطابقت نداشت که دلیل عمده‌اش تفاوت گونه‌ای و همچنین پاسخ اووسیت‌ها به دوزهای مختلف رتینوئیدها عنوان می‌شود (۱). پالمیتات بیشترین نوع اسید چرب موجود در تخمک‌های حیوانات اهلی به ویژه خوک است. استریفه شدن اسیدهای چرب به ویژه پالمیتات، شکل اصلی ذخیره رتینول در سلول ها است. بنابراین، میزان رتینول در تخمک‌های خوک بیشتر است ولی چون با پالمیتات ترکیب شده، نمی تواند به اسید رتینوئیک تبدیل شود و اثر خود را اعمال کند چرا که رتینول از طریق تبدیل به اسید رتینوئیک فعال می شود (۹). نقش اسید رتینوئیک بر بلوغ تخمک هنوز به طور کامل مشخص نشده است ولی به طور مستقیم یا غیر مستقیم قابلیت هسته و سیتوپلاسم را بهبود می بخشد، بنابراین قابلیت رشد و نمو تخمک را برای رسیدن به مراحل بعدی رشد افزایش می دهد (۱۴).

سلول های کومولوس که اطراف تخمک را احاطه کرده‌اند، جهت کمک به رشد و نمو تخمک تخصصی شده اند. استروئید سازی نقش اصلی سلول‌های گرانولوزا که دیواره فولیکول را می‌پوشانند، می باشد. سلول‌های کومولوس دارای گیرنده‌های اسید رتینوئیک می‌باشند، بنابراین اسید رتینوئیک ال ترانس قادر به تنظیم رونویسی در سلول‌های کومولوس گرانولوزا هستند. کارولان و همکاران (۵) نشان دادند که با افزودن ۰/۵ میکرومولار ۹- سیس اسید رتینوئیک و یک میکرومولار ال ترانس اسید رتینوئیک بیان گیرنده های اسید رتینوئیک در سلول های کومولوس افزایش می‌یابد. براساس یافته های این تحقیق افزودن اسید رتینوئیک به محیط کشت می تواند تاثیر مثبتی روی کمپلکس کومولوس- تخمک داشته باشد و سبب بهبود در رشد و نمو رویان شود. اگرچه پس از بلوغ برون تنی با مشاهده سلول های کومولوس مشخص شد که غلظت‌های ۰، ۱، ۱/۵ و ۲

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-18]

میکرومولار اسید رتینوئیک میزان پراکندگی سلول‌های کومولوس را پس از ۲۴ ساعت کشت تحت تاثیر قرار نمی دهد. رتینوئیدها سبب تحریک FSH برای القا گیرنده‌های LH و تولید پروژسترون و کاهش cAMP می‌شوند. افزایش یا حفظ سطوح بالای cAMP در تخمک ها مانع از سرگیری میوز می شود. بنابراین گفته می شود که رتینوئیک اسید ممکن است، کیفیت mRNA و پردازش را در هنگام بلوغ به واسطه افزایش در پلی آدنیلاسیون، بالا ببرد. اسید رتینوئیک مهاجرت گرانول‌های قشری را قبل از بلوغ القا می‌کند. مهاجرت گرانول‌های قشری یک پدیده معمول در تخمک پستانداران در هنگام بلوغ سیتوپلاسمی در دو محیط برون تنی و درون تنی است و به عنوان یک معیار در تخمین بلوغ و سازماندهی اندامک استفاده می شود (۸).

تحریک به افزایش تخمک ریزی، عملکرد تخمدانی را در گاوها و گوسفندان تغییر می‌دهد که این منجر به استروئیدوژنز فولیکولی ناهنجار در تخمک می‌شود (۲). این در حالی است که تیمار دارای رتینول در حیوانات تخمک‌ریزی را تحریک کرده، فعالیت تخمدانی نامناسب حاصل از افزایش تخمک‌ریزی را جبران نموده و یا کاهش می‌دهد. توان رشد و نمو تخمک به وسیله پشتیبانی رتینوئیدها هنگام رشد درون فولیکولی تخمک در گاو، گوسفند (۷)، خوک ماده و خرگوش‌هایی با قابلیت سطوح بالای ویتامین A، افزایش می‌یابد (۳).

در زمان انجام IVM و کشت جنین‌ها در آزمایشگاه، رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید می‌شوند که با دیگر مولکول‌های سیتوپلاسمی واکنش شدید نشان می‌دهند و باعث آسیب سلولی می‌شوند. سلول‌های پستانداران شامل تخمک‌ها و رویان‌های اولیه آنها، مکانیسم‌های مختلفی را برای حفاظت در مقابل آسیب رادیکال‌های آزاد و حفظ تعادل های مناسب در واکنش‌های اکسیداسیون و احیا اتخاذ کرده‌اند. از جمله این مکانیسم‌ها می توان به استفاده از آنتی اکسیدان‌ها اشاره کرد. آنتی اکسیدان‌های موجود در تخمک، رویان و یا محیط شامل ویتامین های A، C، E، پیروات و گلوتاتیون می‌باشند. با توجه به این که جنین‌ها در آزمایشگاه در معرض فشار اکسیداتیو قرار می‌گیرند و مکانیسم‌های دفاعی آنها برای حفاظت از ساختمان‌های سلولی ظریفشان کارایی ندارد، اضافه‌کردن آنتی اکسیدان‌ها به محیط کشت جهت جلوگیری از آسیب‌های وارده به سلول ضروری به نظر می‌رسد. رتینوئیدها می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان، مولکول‌های اکسیژن منفرد را فرو بنشاند و با دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها واکنش دهند. اسید رتینوئیک قادر است، سلول را در مقابل مرگ سلولی، آپوپتوزیس القا شده با تنش اکسیداتیو حفظ کند که این تاثیرات به وسیله مسیرهای مستقل و وابسته به گیرنده‌های هسته ای میانجی گری شده‌اند (۱۶). از طرفی می توانیم یکی از دلایل بالا بودن درصد تخمک های گامه متافاز دو در غلظت ۲ میکرومولار را به خواص

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-18]

آنتی اکسیدانی اسید رتینوئیک و غلظت بهینه آن نسبت داد. گلوتاتیون، ترکیب سولفیدریل غیرپروتئینی اصلی در سلول های نشخوارکنندگان در مقابل ROS است. سطوح مناسب گلوتایتون برای بلوغ تخمک، لقاح و رشد و نمو رویان ضروری است. پیشگیری از آپوپتوزیس و آسیب اکسیداتیو از طریق کاهش گلوتایتون القا شده و استاروسپورین توسط اسید رتینوئیک به اثبات رسیده است (۱۶). میدیکین[1] فاکتور رشد موجود در مایع فولیکولی گاو است که افزودن آن به محیط کشت سبب افزایش تولید بلاستوسیت می‌شود. اسید رتینوئیک ال ترانس می تواند mRNA میدیکین را در سلول های گرانولوزی کشت شده افزایش دهد. میدیکین از آپوپتوزیس سلول های کومولوس در محیط کشت جلوگیری به عمل می آورد. از این رو اسید رتینوئیک می تواند بلوغ سیتوپلاسمی تخمک را از طریق تولید میدیکین در سلول های کومولوس افزایش دهد (۴).

به نظر می رسد اسید رتینوئیک مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانی درون سلولی را پشتیبانی کرده و با تاثیر بر سلول‌های کومولوس و تولید فاکتورهای رشد سبب بالا رفتن میزان شروع مجدد میوز و بلوغ تخمک می شود. در نهایت این تحقیق نشان داد که افزودن ۲ میکرومولار اسید رتینوئیک به طور معنی دار بلوغ تخمک های کومولوس دار را بهبود می بخشد.

منابع

1. Alminana, C., M.A. Gil, C. Cuello, I. Caballero, L. Roca, J.M. Vazquez, E. Gomez and E.A. Martinez. 2008. In vitro maturation of porcine oocytes with retinoids improves embryonic development. Fertility and Development. 20: 483-489.
2. Assay, R.j., P. Hyttel, G.F. Roche and M. Boland. 1994. Oocyte structure and follicular sterold concentration in superovulated versus unstimulated heifers. Mol. Reprod. Dev., 39: 816.
3. Besenfelder, U., L. Solti, J. Seregi, M. Müller and G. Brem. 1996. Different roles for B-carotene and vitamin A in the reproduction on rabbits. Theriogenology. 45(8): 1583-1591.
4. Boni, R., A. Cuomo and E. Tosti. 2002. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity and calcium stores. Biol. Reprod., 66(3): 836-842.
5. Carolan, C., P. Lonergan, P. Monget and P. Mermillod. 1995. Role of insulin familiy of growth factors in bovine oocyte maturation (IVM) and embryo development (IVC) in vitro. J. Reprod. Fertil., 15: 71.
6. Duque, P., E. Gomez, C. Hildalgo, N. Facal and I. Fernandez. 2002. Retinoic acid during in vitro maturation of bovine oocytes promotes embryonic development and early differentiation. Theriogenology. 245: 220-223.
7. Eberhardt, D.M., W.A.Will and J.D. Godkin. 1999. Retinol Administration to Superovulated Ewes Improves In Vitro Embryonic Viability. Biology of Reproduction. 60(6): 1483-1487.

1- Midikin

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-18]

8. Fukui, Y. and Y. Sakuma. 1980. Maturation of Bovine Oocytes Cultured in vitro: Relation to Ovarian Activity, Follicular Size and the Presence or Absence of Cumulus Cells. Biology of Reproduction. 22(3): 669-673.
9. Gomez, E., L.J. Royo, P. Duque, G. Carneiro, C. Hidalgo, F. Goyache, P.L. Lorenzo, I. Alvarez, N. Facal and C. Diez. 2003. 9-Cisretinoic acid during in vitro maturation improves development of the bovine oocyte and increases midkine but not IGF-I expression in cumulus-granulosa cells. Mol. Reprod. Dev., 66: 247-255.
10. Gordon, I. 1997. Controlled reproduction in sheep and goats. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 450 pp.
11. Huang, F.J., T.C.J. Wu and M.Y. Tsai. 2001. Effect of retinoic acid on implantation and post-implantation development of mouse embryos. Human Reproduction. 16(10): 2171-2176.
12. Ikeda, S., M. Kitagawa, H. Imai and M. Yamada. 2005. The roles of vitamin A for cytoplasmic maturation of bovine oocytes. J. Reprod. Dev., 51: 23-35.
13. Lelievre-Pegorier, M., J. Vilar, M.L. Ferrier, E. Moreau, N. Freund, T. Gilbert and C. Merlet-Benichou. 1998. Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. Kidney Int., 54(5): 1455-1462.
14. Lima, PF., M.A. Oliveira, M.H. Santos, H.D. Reichenbach, M. Weppert, F.F. Paula-Lopes, C.C. Neto and P.B. Goncalves. 2006. Effect of retinoids and growth factor on in vitro bovine embryos produced under chemically defined conditions. Animal Reproduction Science. 95: 184-192.
15. Minegishi, T., T. Hirakawa, H. Kishi, K. Abe, M. Tano, Y. Abe and K. Miyamoto. 2000. The mechanisms of retinoic acid-induced regulation on the follicle-stimulating hormone receptor in rat granulosa cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 1495(3): 203-211.
16. Moreno-Manzano, V., Y. Ishikawa, J. Lucio-Cazana and M. Kitamura. 1999. Suppression of apoptosis by all-trans-retinoic acid. Journal of Biological Chemistry. 274(29): 20251-20258.
17. Morriss-Kay, G.M. and S.J. Ward. 1999. Retinoids and mammalian development. Int. Rev. Cytol., 188: 73-131.
18. SAS Institute Inc. 2003. SAS Users Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-18]

Effect of Retinoic Acid on in Vitro Maturation of Ovine Immature Oocytes Containing Cumulus Cells

M. Khani[1], H. Daghigh kia[2], A. Zare-Shahneh[3] and S. Alijani[2]

1- Former M.Sc. Student, Collage of Animal Science, University of Tabriz
2- Assistant Professor, Collage of Animal Science, University of Tabriz (Corresponding author)
3- Professor, Collage of Animal Science, University of Tehran, Karaj

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of all-trans retinoic acid (t-RA) on in vitro maturation of ovine immature oocytes containing cumulus cells. The Oocytes with cumulus cells were recovered from follicles (2-6 mm in diameter). Different concentrations of t-RA (0, 1, 1.5 and 2 μmol) were added in the maturation medium. For oocytes maturation, all groups were located in the CO2 incubator for 24 hours. The meiosis and nuclear maturation status of the oocytes in each experimental group were assessed using an invert microscope and the data were analyzed with GLM procedure. There are not any oocytes in GV stage. The percentage of oocytes in GVBD stage at control group in comparison with 1 μmol and 2 μmol treatments was significant ($p<0.05$). The rate of oocytes maturation in 2 μmol retinoic acid treatments were significantly more than other groups ($P<0.05$). In conclusion, the use of 2 μmol retinoic acid increased the ovine oocyte maturation significantly in the commercial TCM199 medium.

Keywords: In vitro maturation, Retinoic acid, GV, GVBD, Ovine oocyte

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-18]