بررسی اثر هیپوتائورین بر لقاح و باروری داخل آزمایشگاهی اووسیت‌های حاصل از موش‌های مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک تجربی: مطالعه تجربی

یوسف نصیری باری[۱]، وهاب باباپور[۲]، عباس احمدی*[۳]، مرتضی زنده‌دل خیبری[٤]، قاسم اکبری[٥]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۱/۲۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰٤/۱۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: در این مطالعه تجربی، اثر هیپوتائورین بر لقاح و باروری داخل آزمایشگاهی اووسیت‌های حاصل از موش‌های مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک تجربی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی، از موش‌های NMRI در سنین ۶ تا ۸ هفته استفاده شد. موش‌ها به دو گروه کنترل و PCOS تقسیم شدند. برای القاء PCOS تجربی، استرادیول والرات ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. سپس برای تخمک‌گذاری ابتدا تزریق با ۷/۵ واحد PMSG در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر و ۴۸-۴۶ ساعت بعد با تزریق ۷/۵ واحد hCG در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر انجام شد. سرانجام، کورکومین ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار به محیط کشت اووسیت‌های گروه PCOS اضافه شد و میزان رشد و توسعه جنینی در گروه‌های مختلف موردبررسی قرار گرفت (P<0/05).

یافته‌ها: اکثر رویان‌های متوقف‌شده دارای درصد بالایی از لیز و فراگمانتاسیون بوده و رویان‌های متوقف شده جزو تیپ I و II بودند. افزودن هیپوتائورین باعث کاهش میزان لیز و فراگمانتاسیون و کاهش درصد رویان‌های متوقف شده گردید. رویان‌های کم‌تر متوقف شده جزو تیپ III بودند (P<0/05). این بررسی نشان داد که 1 µM هیپوتائورین باعث افزایش درصد لقاح و 10 µM هیپوتائورین باعث افزایش درصد رویان‌های دوسلولی و هم‌چنین درصد بلاستوسیت‌ها را بیش‌تر افزایش داده‌اند (P<0/05).

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد، افزودن غلظت‌های معین هیپوتائورین به‌عنوان ماده آنتی‌اکسیدانی، باعث بهبود و افزایش درصد لقاح و افزایش درصد رویان‌های دوسلولی می‌شود. هم‌چنین در افزایش درصد بلاستوسیست‌ها نیز می‌تواند مفید واقع شود.

کلیدواژه‌ها: سندروم تخمدان پلی‌کیستیک، اووسیت، لقاح آزمایشگاهی، هیپوتائورین، موش

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره پنجم، ص ۳۷۱-۳۶۴، مرداد ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: ارومیه، گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه. تلفن: ۰۹۱۴۱۴۹۸۵۲۴

Email: ahmadiabbas36@yahoo.com

مقدمه

سندروم پلی‌کیستیک تخمدانی[۱]، یک وضعیت پیچیده، به دلیل بالا بودن سطوح آندروژن‌ها (تستوسترون، آندرستندیون و دهیدرواپی‌آندرستندیون)، بی‌نظمی در دوره‌های آندومتری و وجود کیست‌های کوچک بر روی یک یا هر دو تخمدان است. این بی‌نظمی می‌تواند مرفولوژیکی یا غالباً بیوشیمیایی به شکل هیپرآندروژنمی باشد. هیپرآندروژنیسم، علائم بالینی از سندروم پلی‌کیستیک تخمدانی است که می‌تواند باعث مهار رشد فولیکولی باشد. کیست های کوچک در تخمدان‌ها به شکل غیر تخمک‌گذاری و تغییرات وابسته به قاعدگی ظاهر می‌شود (۱).PCOS، یک سندروم ناهمگون است (۲). این سندرم با عوارض وسیع الطیف با جنبه‌های مختلف سلامت همراه است، ازجمله؛ باروری (هیرسوتیسم و اختلالات قاعدگی)، متابولیسم (چاقی، دیابت و خطرات قلبی و عروقی) و

[۱] دانشجوی دکترای تخصصی فیزیولوژی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

[۲] استاد بخش فیزیولوژی دامپزشکی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

[۳] دانشیار بخش علوم تشریح، آناتومی و جنین شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه اورمیه، ارومیه، ایران(نویسنده مسئول)

[٤] استاد بخش فیزیولوژی دامپزشکی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

[٥] استادیار گروه مامایی و بیماری‌های تولیدمثل، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

[1] PCOS= polycystic ovary syndrome

ویژگی‌های روانی (اختلالات خلقی و کاهش کیفیت زندگی)، (۳). طبق گزارش انستیتو ملی سلامت[2]، و انستیتو ملی سلامت کودکان و کنفرانس رشد و توسعه انسانی در سال ۱۹۹۰، در تشخیص PCOS، می‌توان به مواردی چون؛ تخمک‌گذاری بیش‌ازحد و غیرطبیعی بودن غدد مترشحه ازجمله؛ هیپرپلازی مادرزادی غدد آدرنال[3]، سندروم کوشینگ، کم‌کاری غده تیرویید، هیپرپرولاکتینمی، توموری شدن سلول‌های مترشحه آندوژن‌ها اشاره کرد (۴). و نیز طبق نظریه انستیتو ملی دفتر سلامت و پیش‌گیری از بیماری‌های آمریکا، تقریباً ۵ میلیون زن در سنین بارداری دچار این بیماری هستند. و درصد بالایی از این بیماران دچار سرطان آندومتر رحم، سرطان پستان، بیماری‌های قلبی عروقی، انواع دیابت، مخصوصاً دیابت نوع دو دچار می‌شوند (۱). به‌تازگی، طب مکمل و جایگزین[4]، به‌عنوان یک مدیریت پزشکی adjuvant در PCOS موردبحث قرار گرفته است. چندین درمان CAM موردمطالعه قرار گرفته و به نظر می‌رسد آن‌ها تأثیرات مثبتی بر شدت PCOS و غدد درون‌ریز، متابولیسم قلبی و عوارض تولیدمثل ایفا می‌کنند. به‌عنوان‌مثال، اصلاح شیوه زندگی، طب سوزنی، یوگا، مراقبه، آروماتراپی، هومیوپاتی، آیورودا، کاهش وزن، داروهای گیاهی و آنتی‌اکسیدان‌ها به‌ویژه ویتامین‌ها به‌عنوان CAM در PCOS شناخته می‌شود. امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در مدیریت زنان مبتلا به PCOS منافع بسیاری را به خود جلب کرده است (۵). باروری آزمایشگاهی اووسیت (IVF)، نیز باعث بهبود بارداری خواهد شد (۴). باروری آزمایشگاهی اووسیت منجر به تولید جنین‌های آزمایشگاهی (IVEP)، شده که ابزاری غیرقابل تخمین بر باروری کلینیکی انسان می‌باشد، به زنان و مردان نابارور که تمایل دارند فرزندان خود را داشته باشند کمک بسزایی می‌کند. هم‌چنین این روش، در تولید جنین‌های تجاری در حیوانات با ارزش ژنتیکی بالا نیز بسیار اهمیت دارد (۶). مبتلایان به PCOS در جهت تحریک تخمدان‌ها به‌شرط وجود اووسیت‌های قابل‌قبول برای تکوین آزمایشگاهی (IVM)، و سپس IVF، می‌توانند بارداری موفقیت آمیزی داشته باشند. درصورتی‌که در برخی افراد ادامه رشد و توسعه جنین‌ها قطع می‌شود. زنان مبتلا به PCOS اگر وزن بدنی بالایی داشته باشند به‌شدت آسیب‌پذیر هستند، و باروری آزمایشگاهی کم‌تری داشته و جنین‌ها پس از کاشت در رحم مادر دژنره می‌شوند (۴). تا به امروز، میزان بارداری بالینی و میزان لانه گزینی حاصل از درمان IVM در زنان نابارور مبتلا به PCOS تقریباً ۳۰-۳۵ درصد بوده است. بنابراین، به‌عنوان یک گزینه درمان، IVM را می‌توان برای زنان مبتلا به PCOS به‌جای درمان معمول IVF که در حدود ۱۰-۱۵ درصد است با تحریک تخمدان ارائه کرد (۷). زنانی که مبتلا به PCOS، هستند به فن‌های نوین تولیدمثلی که مهم‌ترین آن IVF، می‌باشد امیدوار می‌شوند. در تکوین و باروری آزمایشگاهی اووسیت، استرس اکسیداتیو و وجود رادیکال‌های آزاد از عوامل اصلی مهار رشد و توسعه رویانی می‌باشد. عبارت استرس اکسیداتیو عموماً هنگامی به کار برده می‌شود که میزان اکسیدان‌ها بیش از مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها باشد (۸). رادیکال‌های آزاد نیز به‌شدت ناپایدار بوده و به‌طور سریع و غیراختصاصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان داده و منجر به ایجاد و گسترش انواع آسیب‌های سلولی ازجمله؛ پراکسیداسیون غشای پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و نوکلئوتیک، آپوپتوز و نکروز می‌شود که درنهایت منجر به کاهش قدرت زیست‌پذیری و تکوین رویان‌ها در محیط کشت می‌گردد (۹). آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی، قادرند اکسیژن واکنش‌پذیر را خنثی و ساختار سلولی را از آسیب‌های ناشی از اکسیدان‌ها محافظت نمایند (۱۰). در راستای کاهش اثرات استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد در جهت رسیدن به موفقیت تولید جنین‌های آزمایشگاهی در زنان مبتلا به PCOS می‌توان از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مثل هیپوتائورین استفاده کرد. هیپوتائورین[5]، یک سولفونیک اسید[6]، است که به همراه تائورین (2-aminoethanesulphonic acid)، از غده پانکراس در پستانداران از بیوسنتز اسیدآمینه سیستئین به وجود می‌آید. هیپوتائورین به‌عنوان نوروترانسمیتر درونی، در بدن می‌تواند باعث فعال شدن گیرنده‌های گلیسین شود (۱۱). هیپوتائورین در لوله‌های فالوپ به‌ویژه در زمان باروری در سطح بالایی قرار دارد. تائورین و هیپوتائورین ممکن است در تحریک، نگه‌داری، حرکت و ظرفیت پذیری اسپرم و نیز فعالیت مجدد آکروزومی در داخل رحم شده، بنابراین می‌تواند در بهبود باروری آزمایشگاهی اووسیت‌ها نقش مهمی داشته باشد (۱۲). در زمینه تولید جنین‌های آزمایشگاهی تحقیقات زیادی به‌عمل‌آمده، ولی ازآنجایی‌که زنان مبتلا به سندروم پلی‌کیستیک تخمدانی دچار مشکلات تولیدمثلی و متابولیکی زیادی هستند، درنتیجه استحصال اووسیت قابل‌قبول و باروری آزمایشگاهی و از همه مهم‌تر ادامه تداوم بارداری در این بیماران حائز اهمیت می‌باشد. فلذا در این تحقیق موش‌های مبتلا به PCOS با افزودن هیپوتائورین بر لقاح و باروری داخل آزمایشگاهی اووسیت‌های حاصل از موش‌های مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک تجربی موردمطالعه قرار گرفت.

[2] NIH= National Institutes of Health
[3] CAH= Congenital Adrenal Hyperplasia
[4] CAM= complementary and alternative medicine
[5] HTAU= Hypotaurine
[6] sulfinic acid

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی، از موش‌های نر و ماده با سن ۶ الی ۸ هفته‌ای از نژاد NMRI استفاده شد. موش‌ها از مرکز پرورش و نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تهیه و نگه‌داری شدند. در طول مدت ایجاد پلی‌کیستیک تجربی در شرایط استاندارد با رعایت دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰-۳۰ درصد و سیکل نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و رعایت موارد بهداشتی با در دسترس قرار دادن آب و غذا به‌صورت آزاد نگه‌داری شدند. حیوانات به‌صورت تصادفی در گروه کنترل و PCOS تجربی، تقسیم‌بندی شدند. گروه PCOS تجربی در زمان‌بندی مشخص جهت القای پلی‌کیستیک تخمدانی با تزریق استرادیول والرات (شرکت ابوریحان ایران)، را با دز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت تک‌دوز از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. موش‌ها ۶۰ روز پس از تزریق استرادیول والرات دچار پلی‌کیستیک تخمدانی شدند. پس از اطمینان از ایجاد سندروم تخمدان پلی‌کیستیک، با بررسی بافت تخمدان القاء PCOS تأیید شد. به همین منظور سطح پراکسیداسیون لیپیدها، میزان تولید مالون دی آلدئید ((MDA، و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)، بافت تخمدان و سرم خون اندازه‌گیری شد. با رعایت چرخه نوری در دو مرحله تزریق هورمون جهت تحریک به تخمک‌گذاری صورت گرفت. در مرحله اول، تزریق ۷/۵ واحد (IU) داروی PMSG (ساخت شرکت HIPRA اسپانیا)، به روش داخل صفاقی در حوالی ساعت ۷ بعدازظهر. و در مرحله دوم، ۴۸-۴۶ ساعت بعد از تزریق اول تزریق ۷/۵ واحد (IU) داروی hCG (ساخت شرکت Folligon هلند)، به روش داخل صفاقی صورت گرفت. عمل تخمک‌گذاری معمولاً ۱۳-۱۰ ساعت بعد از تزریق hCG صورت می‌گیرد. در این تحقیق از دو نوع محیط کشت، یکی محیط کشت T6، تکمیل‌شده با ۴ میلی‌گرم (BSA=Bovine Serum Albumin)، برای نگه‌داری اسپرم‌های استحصال‌شده جهت ارزیابی پارامترهای موردنظر، و دیگری محیط کشت (HTF=Human Tubal Fluid)، تکمیل‌شده با ۴ میلی‌گرم BSA، جهت لقاح و باروری آزمایشگاهی اسپرم و تخمک مورداستفاده قرار گرفت. یک روز قبل از لقاح، قطره‌های محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمونه آزمایشی تهیه و ۱۲ ساعت قبل از لقاح جهت تعادل در داخل انکوباتور با Co_2 ۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای تهیه اسپرم از موش‌های نر ۸ تا ۱۲ هفتگی با میانگین وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم برای هر گروه به تعداد ۲ سر انتخاب و با استفاده از روش بی‌هوشی آسان کشی شدند. بیضه‌ها به همراه اپیدیدم آن‌ها را از ناحیه اسکروتوم بیضه خارج و سریعاً دم اپیدیدم را با مقداری از کانال دفران جدا و در داخل پلیت ۶ سانتی حاوی محیط کشت از قبل آماده شده T6، تکمیل شده با ۴ میلی‌گرم BSA، قرار داده شدند. سپس برای این‌که اسپرم‌ها از کانال دفران و اپیدیدم خارج و در محیط کشت پخش شوند به مدت ۰/۵ ساعت در داخل انکوباتور CO_2 قرار داده شدند. پس از نیم ساعت اسپرم‌ها را شتشو داده و با استفاده از روش Swim up، اسپرم‌های متحرک را جدا و به‌منظور ظرفیت‌پذیری به مدت ۱ ساعت در انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن مدت، اسپرم‌ها را از نظر مورفولوژی، میزان تحرک و قابلیت زنده ماندن مورد ارزیابی قرار داده و اسپرم‌هایی که بالای ۹۵ درصد از نظر مورفولوژی و بالای ۸۰ درصد تحرک و قابلیت زنده ماندن داشتند جهت لقاح استفاده شدند. ۱۰ الی ۱۳ ساعت پس از تزریق hCG، موش‌های ماده را در داخل آزمایشگاه IVF، با روش بی‌هوشی آسان کشی کرده و لوله‌های رحمی را جدا نموده و در داخل پلیت حاوی محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از قبل به تعادل رسیده، قرار داده شدند. سپس با استفاده از تکنیک Dissecting، اووسیت‌ها را از داخل لوله‌های رحمی خارج و پس از شتشو و ارزیابی میکروسکوپی، اووسیت‌ها را به قطرات لقاح حاوی محیط کشت HTF، تکمیل شده با ۴ میلی‌گرم BSA، که قطرات زیر روغن معدنی بودند منتقل و سپس اسپرم‌های متحرک به توانایی رسیده را به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، اضافه و داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ دی‌اکسیدکربن نگه داشته شدند. عمل لقاح حدوداً ۳ الی ۵ ساعت پس از اضافه کردن اسپرم با مشاهده دو پیش هسته مشخص می‌شود. بدین ترتیب اووسیت‌ها بارور شده و بعد از شتشو به محیط کشت از قبل به تعادل رسیده در گروه‌های مورد مطالعه انتقال داده شدند. میزان شکافتگی، ۲۴ ساعت پس از کشت صورت گرفت و طی ۱۲۰ ساعت موردبررسی قرار گرفتند. و در مرحله بعدی درصد موفقیت لقاح و روند رشد رویانی تخمک‌های گروه PCOS با افزودن دزهای مختلف ۶، ۱۰ و ۱۲ میکرومول کورکومین به محیط کشت لقاح صورت گرفت و سپس روند رشد و توسعه رویانی در گروه‌های مختلف مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفتند.

تحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (Minitab شرکت Minitab، آمریکا) و روش Proporcion2 با ($P<0.05$) برای تعیین میزان لقاح، درصد جنین دو سلول، درصد بلاستوسیست‌ها، لیز جنین و میزان تکه تکه شدن استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از لقاح آزمایشگاهی و رشد رویان‌ها در گروه کنترل و PCOS، نشان داد که درصد بالایی از اووسیت‌ها برای IVF از نظر

کیفیت ضعیف بودند، به‌طوری که سلول‌های کومولوسی اطراف اووسیت‌ها از رشد و توسعه مناسبی برخوردار نبودند. درصد لقاح و رشد رویانی تا مرحله بلاستوسیست تفاوت داشته، به‌طوری‌که این روند در گروه PCOS، کاهش معنی‌داری داشته است (جدول ۱). بررسی درصد رویان‌های متوقف شده گروه کنترل در مقایسه با گروه PCOS، کم‌تر بوده و تیپ رویان‌های بیش‌تر متوقف شده اکثراً از نوع تیپ I، با لیز و فراگمانتاسیون بیش‌تر می‌باشند (جدول ۲). نتایج حاصل از افزودن غلظت‌های مختلف هیپوتائورین به محیط کشت لقاح و مقایسه کیفیت رشد رویان‌ها، نشان داد افزودن آن‌ها به محیط کشت باعث افزایش درصد لقاح، کیفیت رشد رویان‌ها و مورفولوژی آن‌ها شد. بررسی درصد لقاح در مقایسه با گروه PCOS، نشان داد در حضور غلظت‌های مختلف هیپوتائورین درصد لقاح در محیط کشت افزایش داشت، به‌طوریکه این افزایش در غلظت ۰/۱ میکرومول، ۸۷/۶۸ درصد و در غلظت ۱ میکرومول ۹۰/۲۸ درصد و در غلظت ۱۰ میکرومول ۸۸/۹۵ درصد بوده و در مقایسه با گروه PCOS، که ۷۵/۳۵ درصد بوده است. این مقایسه نشان می‌دهد که افزودن هیپوتائورین با غلظت ۱ میکرومول نسبت به هیپوتائورین ۰/۱ و ۱۰ میکرومول درصد لقاح را بیش‌تر افزایش داده است. بررسی درصد رویان‌های دو سلولی ایجاد شده در مقایسه با گروه PCOS، نشان داد در حضور غلظت‌های مختلف هیپوتائورین درصد رویان‌های دو سلولی ایجاد شده در محیط کشت افزایش معنی‌داری داشت، به‌طوریکه این افزایش در غلظت ۰/۱ میکرومول، ۷۵/۲۸ درصد و در غلظت ۱ میکرومول ۸۴/۱۸ درصد و در غلظت ۱۰ میکرومول ۸۴/۶۱ درصد بوده و در مقایسه با گروه PCOS، که ۵۹/۸۸ درصد بوده است. مقایسه درصد رویان‌های دوسلولی نشان می‌دهد که افزودن هیپوتائورین با غلظت ۱۰ میکرومول نسبت به هیپوتائورین ۰/۱ و ۱ میکرومول درصد رویان‌های دوسلولی را بیش‌تر افزایش داده است. بررسی درصد بلاستوسیت‌ها در مقایسه با گروه PCOS، نشان داد در حضور غلظت‌های مختلف هیپوتائورین درصد بلاستوسیست ایجاد شده در محیط کشت افزایش معنی‌داری داشت، به‌طوریکه این افزایش در غلظت ۰/۱ میکرومول، ۳۷/۰۸ درصد و در غلظت ۱ میکرومول ۳۶/۰۷ درصد و در غلظت ۱۰ میکرومول ۳۸/۴۶ درصد بوده و در مقایسه با گروه PCOS، که ۲۷/۷۸ درصد بوده است. مقایسه درصد بلاستوسیت‌ها نشان می‌دهد که افزودن هیپوتائورین با غلظت ۱۰ میکرومول نسبت به هیپوتائورین ۰/۱ و ۱ میکرومول درصد بلاستوسیت‌ها را بیش‌تر افزایش داده است. بررسی درصد رویان‌های متوقف شده نشان داد که افزودن غلظت‌های مختلف هیپوتائورین باعث کاهش درصد رویان‌های متوقف شده در مقایسه با گروه PCOS، می‌شوند و تیپ رویان‌های متوقف شده در حضور هیپوتائورین اکثراً از نوع تیپ III، با لیز و فراگمانتاسیون کم در مقایسه با گروه PCOS، می‌باشند که نشان دهنده اثر آنتی‌اکسیدانتی و تأثیر هیپوتائورین بر آسیب‌های وارده به رویان‌ها در طی روند لقاح و کشت آزمایشگاهی می‌باشد. و این کاهش میزان لیز و فراگمانتاسیون و کاهش درصد و نوع رویان‌های متوقف شده در حضور غلظت ۱۰ میکرومول هیپوتائورین به مراتب قابل توجه بوده و از نظر آماری در مقایسه با گروه PCOS، معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳).

جدول (۱): مقایسه کیفیت اووسیت‌ها، لقاح آزمایشگاهی و رشد رویانی در گروه کنترل وPCOS.

گروه	تعداد حیوان	تعداد کل اووسیت (اووسیت‌ها به ازای هر حیوان)	اووسیت مناسب تعداد (٪)	اووسیت نا مناسب تعداد (٪)	لقاح تعداد (٪)	دو سلولی تعداد (٪)	بلاستوسیست تعداد (٪)
Control	۱۰	۱۷۶	۱۷۳	۳	۱۶۵	۱۵۲	۱۰۱
			۹۸/۳۰	۱/۷۰	۹۵/۳۸	۹۲/۱۲	۶۱/۲۱
PCOS	۱۰	۲۸۳	۲۱۵	۶۸	۱۶۲	۹۷	۴۵
			a۷۵/۹۷	a۲۴/۰۳	a۷۵/۳۵	a۵۹/۸۸	a۲۷/۷۸

a: تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های کنترل را نشان می‌دهد ($P<0.05$).

جدول (۲): مقایسه گروه‌های کنترل و PCOS در درصد نوع رویان‌های متوقف شده

گروه	رویان‌های متوقف شده تعداد (٪)	تیپ III تعداد (٪)	تیپ II تعداد (٪)	تیپ I تعداد (٪)
Control	۶۴	۲	۵	۵۷
	۳۸/۷۹	۱/۲۱	۳/۰۳	۳۴/۵۴
PCOS	۱۱۷	۵۶	۳۹	۲۲
	a۷۲/۲۲	a۳۴/۵۷	a۲۴/۰۷	a۱۳/۵۹

a: تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های کنترل را نشان می‌دهد (P<0.05).

جدول (۳): مقایسه اثر افزودن دزهای مختلف هیپوتائورین به محیط کشت رویانی موش‌های مبتلا به PCOS تجربی از نظر لقاح و روند رشد رویانی

گروه	تعداد کل اووسیت‌های مناسب	لقاح تعداد (٪)	دو سلولی تعداد (٪)	بلاستوسیت تعداد (٪)	رویان‌های متوقف شده تعداد (٪)	تیپ I تعداد (٪)	تیپ II تعداد (٪)	تیپ III تعداد (٪)
Control	۱۷۳	۱۶۵ (۹۵/۳۸)	۱۵۲ (۹۲/۱۲)	۱۰۱ (۶۱/۲۱)	۶۴ (۳۸/۷۹)	۲ (۱/۲۱)	۵ (۳/۰۳)	۵۷ (۳۴/۵۴)
PCOS	۲۱۵	۱۶۲ a(۷۵/۳۵)	۹۷ a(۵۹/۸۸)	۴۵ a(۲۷/۷۸)	۱۱۷ a(۷۲/۲۲)	۵۶ a(۳۴/۵۷)	۳۹ a(۲۴/۰۷)	۲۲ a(۱۳/۵۹)
PCOS + هیپوتائورین ۰/۱ میکرومول	۲۰۳	۱۷۸ ab(۸۷/۶۸)	۱۳۴ ab(۷۵/۲۸)	۶۶ a(۳۷/۰۸)	۱۱۲ a(۶۲/۹۲)	۲۱ ab(۱۱/۸۰)	۱۸ ab(۱۰/۱۱)	b(۴۱/۰۱)۷۳
PCOS + هیپوتائورین ۱ میکرومول	۱۷۵	۱۵۸ b(۹۰/۲۸)	۱۳۳ abe(۸۴/۱۸)	۵۷ a(۳۶/۰۷)	۱۰۱ a(۶۳/۹۲)	۱۵ ab(۹/۴۹)	۲۵ a(۱۵/۸۲)	۶۱ b(۳۸/۶۱)
PCOS + هیپوتائورین ۱۰ میکرومول	۱۹۰	۱۶۹ ab(۸۸/۹۵)	۱۴۳ abe(۸۴/۶۱)	۶۵ ab(۳۸/۴۶)	۱۰۴ ab(۶۱/۵۴)	۱۸ ab(۱۰/۶۵)	۲۷ a(۱۵/۹۸)	b(۳۴/۹۱)۵۹

a: نشان دهنده معنی‌دار بودن نسبت به گروه کنترل (P<0/05)

b: نشان دهنده معنی‌دار بودن نسبت به گروه PCOS تجربی (P<0/05)

c: نشان دهنده معنی‌دار بودن نسبت به گروه دز ۰/۱ میکرومول هیپوتائورین (P<0/05)

d: نشان دهنده معنی‌دار بودن نسبت به گروه دز ۱ میکرومول هیپوتائورین (P<0/05)

e: نشان دهنده معنی‌دار بودن نسبت به گروه دز ۱۰ میکرومول هیپوتائورین (P<0/05)

بحث و نتیجه‌گیری

سندروم تخمدان پلی‌کیستیک شایع‌ترین اختلال غدد درون‌ریز در زنان بارور است که شیوع آن ۵ تا ۲۱ درصد می‌باشد (۱۳). PCOS را می‌توان به‌عنوان یک اختلال الیگوژنیک توصیف کرد که در آن تعدادی از عوامل ژنتیکی و محیطی، فنوتیپ ناهمگن، بالینی و بیوشیمیایی دخالت دارند. گرچه علت ژنتیکی PCOS هنوز ناشناخته است، سابقه خانوادگی PCOS نسبتاً رایج می‌باشد. با این حال، عوامل ارثی در آن نامشخص است. فقدان اطلاعات فنوتیپی مانع از تجزیه‌وتحلیل رسمی در این مورد می‌شود. در حال حاضر تحقیقات نشان می‌دهند که نوع ارثی PCOS در خانواده شبیه یک

الگوی غالب اتوزوم مغزی است. عوامل محیطی PCOS مثلاً چاقی را می‌توان با انتخاب نامناسب رژیم غذایی و عدم فعالیت فیزیکی افزایش داد. عفونت‌ها و سموم هم‌چنین ممکن است در ایجاد PCOS نقش داشته باشند. ویژگی‌های تولیدمثل و متابولیک PCOS گاهی اوقات با تغییرات شیوه زندگی مانند کاهش وزن و ورزش، برگشت پذیر است (۱۴). نامتعادل بودن میزان چربی، استرس اکسیداتیو، مقاومت به انسولین و عوامل ژنتیکی احتمالاً از عمده فاکتورهای این عارضه می‌باشند. (۱۵). ازآنجایی‌که مشکلات ناباروری در کل جوامع امروزی زیاد شده است، فلذا محققان در زمینه‌های مختلف تحقیقات دنباله‌دار جهت باروری‌های طبیعی و آزمایشگاهی را در مدل‌های حیوانی و انسانی با جدیت دنبال می‌کنند. در باروری آزمایشگاهی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها مورد توجه می‌باشد. بررسی اثرات هیپوتائورین بر روی باروری آزمایشگاهی اووسیت موش‌های صحرایی ژاپنی نشان دادند که، هیپوتائورین باعث بهبودی باروری آزمایشگاهی اووسیت موش‌ها در فصل جفت‌گیری گردید. غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌مول از هیپوتائورین قبل از باروری با اسپرم و گروه دیگر پس از باروری با اسپرم ولی قبل از انکوباسیون، اضافی گردید و سپس مشاهده شد، غلظت ۱ میلی‌مول هیپوتائورین بر روی اووسیت‌ها پس از باروری اثر معنی‌داری داشته درصورتی‌که قبل از باروری با اسپرم اثر معنی‌داری در آن‌ها مشاهده نگردید. ۶۸ تا ۸۳ درصد از رویان‌ها ۹۶ ساعت پس از باروری تا مرحله ۲ سلولی رشد و توسعه پیدا کردند. اما در همه گروه‌های آزمایشی رشد تا مرحله بلاستوسیستی خیلی کم بود. از ۰ تا ۳ درصد مشاهده گردید. بعد از انتقال جنین‌ها به گیرنده‌ها، میزان زاد و ولد در حدود ۲۱ درصد و میزان آبستنی کاذب نیز در حدود ۴۱ درصد مشاهده گردید (۱۶). در مطالعه دیگری چنین گزارش شده است که شیره رحمی و شیره ناحیه آمپولای لوله‌های اویدوکت خرگوش، ۱۱ ساعت پس از جفت‌گیری و مایع فولیکولی گاو و شیره لوله‌های اویدکت میمون به همراه سطوح ۰/۱ تا ۱ میلی‌مول هیپوتائورین می‌تواند در مقادیر غلظت فیزیولوژیکی بوده و اثرات آنتی‌اکسیدانی داشته باشد (۱۷). تائورین و هیپوتائورین در غلظت‌های میلی‌مول در اغلب بافت‌های بدن به‌ویژه بافت‌های عصبی شبکیه چشم، نوتروفیل‌ها و عملکردهای خاص متابولیکی ازجمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی در سطح هسته سلول را داراست (۱۸). در مطالعه دیگری گزارش شده که ارتباطی بین اکسیژن زیاد و سلول وجود دارد. به نظر می‌رسد هیپوتائورین و سیستئین سولفونیک اسید ((CSA= Cysteine Sulphinic Acid، با اکسیژن در مکانیسم انتقال اولین الکترون به داخل سلول با رادیکال‌های سولفونیل ترکیب می‌شوند. در موقع بالا بودن میزان اکسیژن در سلول با سولفانات‌ها ترکیب شده و درنتیجه وارد سلول می‌گردند. در مکانیسم عبور اولین الکترون، هیپوتائورین و سیستئین سولفونیک اسید می‌توانند با دومین الکترون اکسید شده تا منجر به مصرف اکسیژن در خارج سلول شده تا اکسیژن نتواند به شکل مازاد وارد سلول گردد. ازاین‌رو می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی هیپوتائورین و سیستئین سولفونیک اسید اشاره کرد (۱۹). جلوگیری از اکسیده شدن تیروزین با بکارگیری هیپوتائورین و سیستئین سولفونیک اسید، هر دو در غیاب بی‌کربنات می‌توانند باعث ممانعت از فعالیت رادیکال‌های کربنات و هیدرواکسیل گردند (۲۰). افزودن گلوتاتیون و هیپوتائورین به تنهایی یا ترکیب هر دو با هم تفاوت معنی‌داری در تحرک و حرکت رو به جلو و تکامل DNA ی اسپرم انسان نداشته، ولی تا حدی بر روی اکسیژن واکنش‌پذیر مؤثر بوده است. (۲۱). مطالعه حاضر نشان داد که نتایج به‌دست آمده هیپوتائورین در این تحقیق نیز با سایر مطالعات هم‌سو، مطابقت داشته است. بنابراین افزودن هیپوتائورین به‌عنوان ماده آنتی‌اکسیدانتی در شرایط طبیعی بدون استرس اکسیداتیو باعث بهبود و افزایش درصد لقاح، افزایش درصد رویان‌های دو سلولی که بیانگر شروع شکافتگی در رویان است را می‌شوند. هم‌چنین در افزایش درصد بلاستوسیست‌ها نیز می‌توانند بسیار مفید واقع شوند. در نهایت افزودن غلظت‌های معین هیپوتائورین جهت بهبود روند رشد و توسعه رویانی و جلوگیری از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن به محیط کشت رویانی توصیه می‌شود. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به انتقال جنین اشاره کرد که می‌تواند به‌عنوان تحقیقات دنباله‌دار در این زمینه باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات عزیزانی که در این تحقیق ما را یاری نمودند، به‌ویژه آقای دکتر بهرام دلیر نقده ریاست محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه اورمیه، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Ndefo UA, Eaton A, Robbinson M. Polycystic ovary syndrome 2013; 38: 336-8.
2. Dumesic DA, Schramm RD, Abbott DH. Early Origins of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). Reprod Fertil Dev 2005; 17:349–60.
3. Teede HJ, Misso ML, Deeks AA, Moran LJ, Stuckey BGA, Wong JLA, et al. Assessment and

management of polycystic ovary syndrome: summary of an evidence-based guideline. Med J Aust 2011; 195: 65.

4. Daniel A. Dumesic, Vasantha P, and David H. Abbott. Polycystic Ovary Syndrome and Oocyte Developmental Competence. Obstet Gynecol Surv 2008; 63(1): 39–48.
5. Leila A, Najmeh T, Mansoureh M, Fahimeh RT, and Saeedeh Z. Antioxidants and management of polycystic ovary syndrome in Iran, Jan 2015; 13(1): 1–8.
6. Hansen PJ, In Vitro Production of Bovine Embryos. Department of Animal Sciences, University of Florida 2013, Version 10-16.
7. Chian RC, In-vitro maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. Reprod Biomed Online 2004;8(5):547-52.
8. Bansal AK and Bilaspuri GS, Impact of oxidative stress and antioxidants an semen functions. Vet Med Int 2011; ID 686137, 7.
9. Ahmadi A, And Sadrkhanlo R. Study of Antioxidant Effects of Hypotaurine on Reduction of Oxidative Stress in the Development of Embryos of Mice Experienced from in vitro fertilization. Urmia Med J 2010; 21: 377-503.
10. Carbone MC, Tatone C, Delle SD, Marci R, Caserta D, Colonna R, et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular characterization and age-dependent changes. Mol Hum Reprod 2003; 9: 639-43.
11. Kalir A, and Henry H. Biological activity of sulfinic acid derivatives in chemistry of sulphinic acid, esters their derivatives edited by saul. Wiley, New York 1990; P. 665.
12. Horst VD, Brand A. Occurrence of hypotaurine and inositol in the reproductive tract of the ewe and its regulation by pregnenolone and progesterone. Nature 1969; 223:67-8.
13. Roe AH, Dokras A. The Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome in Adolescents. Rev Obstet Gynecol 2011; 4: 45-51.
14. Shannon M, Wang Y. Polycystic ovary syndrome: A common but often unrecognized condition. J Midwifery Womens Health 2012; 57:221–30.
15. Sushma R, Nazi B, Sumith M, and Vassudha B. Beneficial effect of Curcumin in Letrozole induced polycystic ovary syndrome, science direct 2016; 5(2) 116-22.
16. Teruhiko W, Jun-ihi S, Kenkichi I, Yutaka T, Masamichi K, and Yoshihiro H. Effect of Hypotaurine on in Vitro Fertilization and Production of Term Offspring from in Vitro-Fertilized Ova of the Japanese Field Vole, Microtus Montebelli. Biology of Reproduction 1996; 54(3): 625–30.
17. Meizel S, Lui CW, Working PK, Mrsny RJ. Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro and their presence in spermatozoa and reproductive tract fluids of several mammals. Dev Growth Differ 1980; 22:483-94.
18. Okezie IA, Barry H, Brigid MH. and John B. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. Biochem 1988; 256, 251-5.
19. Mario F, Donatella A, Emanuela O, Alberto B, and Laura P. Oxidation of hypotaurine and cysteine sulphinic acid by peroxynitrite. Biochem 2005; 389. 233-240.
20. Mario FFG, and Laura P. The protective effect of hypotaurine and cysteine sulphinic acid on peroxynitrite-mediated oxidative reactions. Free Radical Research 2008; 42(4): 320-30.
21. Donelly ET, Mclure N, and Lewis SE. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. Mutagenesis 2000; 15(1):61-8.

Original Article

EVALUATION OF THE EFFECT OF HYPOTAURINE ON IN VITRO FERTILIZATION IN THE OOCYTES OBTAINED OF THE EXPERIMENTAL POLYCYSTIC OVARY SYNDROME IN MICE: AN EXPERIMENTAL STUDY

*Yousef Nasiri Bari[1], Wahab Babapour[2], Abbas Ahmadi [*3], Morteza Zendehdel Khaybari[4], Gasem Akbari[5]*

Received: 09 April, 2020; Accepted: 05 July, 2020

Abstract

***Back ground & Aims*:** In this experimental study, the effect of hypotaurine on in vitro fertilization and fertility of oocytes from mice with experimental polycystic ovary syndrome was designed and performed.

Materials & Method: In this experimental study, NMRI mice aged 6 to 8 weeks were used. The mice were divided into two groups, control and experimental PCOS. For induction of experimental PCOS, Estradiol Valerate (100 mg/kg, IP) was injected. Then, for ovulation, the injection was performed first with 7.5 IU PMSG in the volume of 0.1 ml and 46-48 hours later with 7.5 IU hCG in the volume of 0.1 ml. Finally, 0/1, 1 and 10 µM curcumin were added to the culture medium of oocytes of PCOS group and development in different groups were evaluated ($P < 0.05$).

***Results*:** Most of the arrested embryos had a high percentage of lysis and fragmentation and the arrested embryos were type I and II. The addition of hypotaurin reduced the rate of lysis and fragmentation and decreased the percentage of arrested embryos. Lesser arrested embryos were type III ($P < 0.05$). This study showed that 1 µM hypotaurin increased fertilization percentage and 10 µM hypotaurin increased the percentage of two-cell embryos and also increased the percentage of blastocytes ($P < 0.05$).

***Conclusion*:** The results showed that addition of certain concentrations of hypotaurin as an antioxidant, improved and increased the fertilization rate and the percentage of two-cell embryos. It can also be helpful in increasing the percentage of blastocysts.

***Keywords*:** Polycystic Ovary Syndrome, Oocyte, In Vitro Fertilization, Hypotaurin, Mice

Address: Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Tel: +989141498524
Email: ahmadiabbas36@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(5): 371 ISSN: 2717-008X

[1] PhD Student in Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Branch, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Veterinary Physiology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[3] Associate Professor, Department of Anatomy, Anatomy and Embryology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)
[4] Professor, Department of Veterinary Physiology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Midwifery and Reproductive Diseases, School of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran