جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ سیزدهم، شمارهٔ ۱، ص۷-۱، ۱۳۸۴

مقالهٔ پژوهشی

اثرات نور مرئی بر تکوین جنین‌های دو سلولی موش آزمایشگاهی در محیط کشت

دکتر سید نورالدین نعمت اللهی ماهانی[*1]، حسن پاهنگ[2]، محمد علی کیانی[3] و سید امیر مهدی نعمت اللهی ماهانی[3]

خلاصه

مقدمه: جنین و تخمک در محیط آزمایشگاه تحت تأثیر دوزهای متفاوتی از نور مرئی که از منابع مختلف از قبیل میکروسکوپ و هود آزمایشگاه ساطع می‌شود قرار می‌گیرند. در مطالعه حاضر با ایجاد شرایط مشابه از نظر زمان و شدت نوری که جنین در جریان دستکاری‌های آزمایشگاهی در معرض آن قرار می‌گیرد، تأثیر نور در واحد زمان بر جنین‌های دو سلولی موش مورد بررسی قرار گرفت.

روش: برای انجام آزمایش‌ها از موش‌های سفید نژاد NMRI استفاده شد که پس از اطمینان از عدم حاملگی آنها، ۷/۵ واحد PMSG و ۴۸ ساعت بعد، ۱۰ واحد hCG به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. پس از جفت‌گیری با موش‌های نر، لوله رحم در شرایط حتی المقدور استریل خارج شد و جنین‌های دو سلولی با تکنیک فلاشینگ در محیط HTF قرارگرفتند. نور با شدت ۱۶۰۰ لوکس به مدت ۳۰ دقیقه به جنین‌ها تابانیده می‌شد و هر ۱۰ دقیقه تعدادی از جنین‌ها به محیط‌های HTF و MEM-α منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با۵٪CO_2 نگهداری می‌شدند. جنین‌های گروه کنترل همزمان در دو محیط فوق و در شرایط استاندارد کشت شدند. تکوین همه گروه‌ها تا روز پنجم بررسی شد. آزمایشات هشت بار تکرار و درصد تکوین گروه‌ها با آزمون χ^2 مقایسه شد.

یافته‌ها: تکوین جنین‌هایی که به مدت ۳۰ دقیقه نور دیده بودند و در محیط‌های HTF و MEM-α نگهداری شده بودند در روز پنجم به ترتیب ۲۷٪ و ۲۰٪ بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل(به ترتیب ۴۸٪ و ۵۲٪) داشت. جنین‌هایی که به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه در معرض نور بودند نیز تا حدی تحت تأثیر قرار گرفته بودند که از نظر آماری معنی‌دار نبود. میزان تکوین در گروه HTF نسبت به MEM-α بالاتر بود ولی اختلاف معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که تابش نور مرئی به مدت ۲۰ دقیقه بر جنین‌های دو سلولی موش تأثیر چندانی در روند تکامل آنها ندارد و این جنین‌ها قادرند استرس ناشی از نور را در این مدت تحمل کنند ولی افزایش زمان به ۳۰ دقیقه موجب تخریب جنین‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی : نور مرئی، جنین، تکوین، موش

۱- استادیار گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی افضلی پور و مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی کرمان ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۳- کارشناس آزمایشگاه جنین‌شناسی مرکز ناباروری، بیمارستان افضلی‌پور ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی —درمانی کرمان

* **نویسنده مسؤول:** گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ● **آدرس پست الکترونیک :** nnematollahi@kmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸٤/۱/۹ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸٤/۱۰/۲۸ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۴/۱۱/۱۲

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

حدود پنجاه سال از اولین لقاح آزمایشگاهی موفق [*in vitro* fertilization (IVF)] که به دنبال لقاح تخمک خرگوش رخ داد می‌گذرد. البته قبل از آن تلاش‌های وسیعی برای پرورش جنین در خارج از رحم و یا انتقال جنین از یک حیوان به حیوان هم گونه‌اش صورت گرفته بوده و ادامه تحقیقات در اوایل قرن نوزدهم منجر به انتقال موفقیت‌آمیز جنین خرگوش به رحم خرگوش دیگر و تولد نوزاد سالم شد (۱). مطالعات در حیوانات و شناخت دقیق‌تر خصوصیات بیولوژیکی اسپرم و تخمک انسان نهایتاً منجر به تولد اولین نوزاد حاصل از لقاح آزمایشگاهی (IVF) انسان توسط ادواردز و استپتو در سال ۱۹۷۸ شد. به هر حال با وجود این موفقیت، هنوز راه درازی برای رسیدن به شرایط مساعد و مشابه درون تنی *(in vivo)* وجود دارد (۸) و علی‌رغم پیشرفت‌های ارزشمند سال‌های اخیر همچنان شرایط برون تنی *(in vitro)* نسبت به شرایط بدن نامساعد بوده و منجر به اختلاف در میزان موفقیت سیکل‌های درمانی IVF می‌شود (۲۴). واقعیت این است که گامت نر و ماده و هم‌چنین جنینی که در شرایط آزمایشگاه لقاح یافته و رشد می‌کند تحت استرس‌های گوناگونی که خواسته و یا ناخواسته در شرایط آزمایشگاه وجود دارد قرار می‌گیرند. از دسته عوامل استرس‌زا می‌توان به تغییرات دما، pH، نسبت و ترکیب گازهای گوناگون و اشعه‌های مختلف به خصوص نورمرئی اشاره کرد. به طور معمول جنین هنگام دستکاری‌های اجتناب‌ناپذیر در محیط آزمایشگاه تحت تأثیر دوزهای متفاوتی از نور مرئی که از منبع نوری میکروسکوپ، هود و منابع روشنایی آزمایشگاه ساطع می‌شود قرار می‌گیرد. آزمایش‌ها نشان داده که تابش نور مرئی به اختلال تکمیل میوز تخمک‌های همستر می‌انجامد. درحالی که تابش نور مرئی به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه بر تخمک‌های خرگوش تأثیر چندانی در میزان لقاح و درصد حاملگی ندارد (۵) و همچنین تابش نور با شدت ۴۰۰۰ لوکس به تخمک‌های موش در زمان‌های یک الی چهار ساعت هیچ تغییری در میزان لانه‌گزینی و تکوین بعدی جنین‌ها ایجاد نمی‌کند(۴) و همچنین نشان داده شده که تابش نورسفید منجر به افزایش زمان خروج جنین جوجه از تخم (Hatching) می‌شود (۲۵). هر چند پاره‌ای مطالعات به بررسی اثرات زیان‌بار نورمرئی بر لقاح تخمک وتکوین جنین پرداخته‌اند و نتایج گوناگونی راگزارش کرده‌اند، لیکن در مطالعه حاضر تلاش شده تا با مدل‌سازی شرایط مشابه از نظر زمان و شدت نوری که جنین در جریان دستکاری‌های آزمایشگاهی در معرض آن قرار می‌گیرد، تأثیر نور در واحد زمان بر جنین‌های موش بررسی شود. بدین منظور جنین‌ها در معرض تابش نور سرد (که دمای محیط را تغییر نمی‌داد) قرار داده شدند و سپس چگونگی تکوین آنها به طور روزانه کنترل و گزارش شد.

روش بررسی

حیوان آزمایشگاهی: در این مطالعه موش سفیدآزمایشگاهی نژاد NMRI که درحیوان خانه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تکثیر می‌شد مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات ماده در زمان شروع آزمایش‌ها بین ۵ تا ۸ هفته سن داشتند و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص جوندگان نگهداری می‌شدند.

تهیه محیط کشت: محیط کشت HTF (Human Tubal Fluid) در محیط آزمایشگاه تهیه و قبل از استفاده به میزان ۱۵٪ سرم [Fetal Bovine serum (FBS) (Gibco, uk)] به آن اضافه شد (Tronsun 1999) (۲). محیط کشت Minimum Essential Medium- α Modification (MEM-α) به صورت پودر (Sigma) خریداری و پس از تهیه با روشی که دستورالعمل سازنده مشخص کرده بود، با افزودن ۱۵٪ FBS استفاده شد. قبل از انتقال جنین، هر یک از دو محیط کشت یاد شده، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C و ۵٪ CO_2 نگهداری می‌شدند.

تحریک تخمک‌گذاری: موش‌های ماده در دسته‌های ده‌تایی انتخاب و به مدت دو هفته جدا از موش‌های نر نگهداری شدند. پس از اطمینان از باردار نبودن موش‌ها، ۷/۵ واحد PMSG [Pregnant Mares Serum Gonadotropin (Intervet,Denmark)] و یا MG [human Menopausal Gonadotropin (Organon, Holland)] به صورت داخل صفاقی، به آنها تزریق شد. چهل وهشت ساعت بعد موش‌ها ۱۰ واحد hCG [human Chorionic gonadotropin (Organon, Holland)] به همان روش دریافت کرده و بلافاصله کنار موش‌های نر که توانایی بارورسازی آنها قبلاً کنترل شده بود قرار گرفتند.

جمع‌آوری جنین‌های دو سلولی: چهل و هشت ساعت پس از تزریق hCG، موش‌های ماده‌ای که جفت‌گیری کرده بودند (مشاهده پلاک واژن) با کشش گردن کشته شده و در شرایط حتی المقدور استریل، لوله رحم موش‌ها جدا و به قطره محیط کشت HTF+10%FBS زیر روغن پارافین مایع (Sigma) انتقال داده شدند. سپس به کمک میکروسکوپ استریو (stemi. SV6 Zeiss. Germany) و با پاشیدن حدود ۰/۱ میلی‌لیتر محیط کشت توسط سرنگ انسولین و سوزن ۳۰G، از انتهای دیستال (قیف) لوله رحم جنین‌ها از انتهای پروکسیمال لوله رحم

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خارج شده ودر قطره محیط کشت قرار گرفتند. جنین‌هایی که از نظر مرفولوژی سالم به نظر می‌رسیدند به کمک پیپت پاستوری که نوک آن به کمک شعله آتش به قطر ۱۵۰ میکرون باریک شده بود جمع‌آوری شده و پس از سه بار شستشو به قطرات محیط کشت HTF منتقل شدند.

منبع نورانی و میزان نوردهی: منبع نورانی یک لامپ هالوژن ۳۰ وات بود که نور آن از طریق فیبرنوری به ناحیه مورد نظر تابانیده می‌شد. با این روش از افزایش دمای محیط ناشی از گرم شدن لامپ هالوژن جلوگیری می‌شد. محاسبات اولیه نشان داده بود در صورتی که فیبر نوری در فاصلهٔ ۱۵ سانتی‌متری ظرف حاوی جنین‌ها قرار گیرد شدت نوری برابر با ۱۶۰۰ لوکس خواهد داشت و این نزدیک به شدت نوری است که معمولاً در زمان کارکردن در محیط آزمایشگاه جنین با آن روبرو است (۱۳). در آزمون نهایی، برای ثابت نگهداشتن دما و pH که می‌توانند بر تکوین جنین تأثیرگذاشته ونتا یج رامخدوش کنند، جنین‌ها به مدت ۳۰ دقیقه داخل انکوباتور۳۷ درجه سانتی گراد و۵٪ CO_2 تحت تابش اشعه قرار گرفته و هر ۱۰ دقیقه تعدادی از آنها به قطرات محیط HTF و MEM-α منتقل می‌شدند.

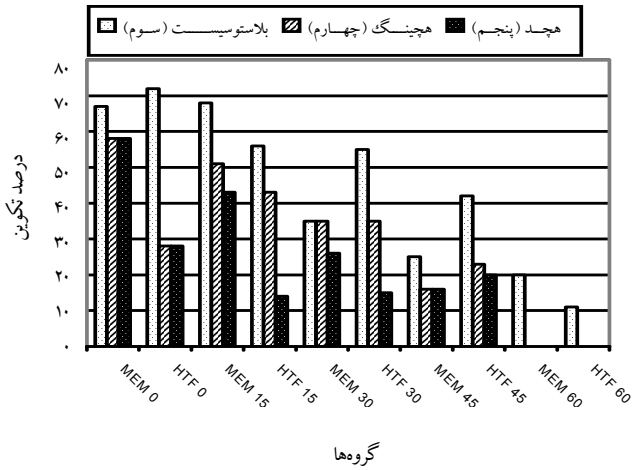
ارزیابی جنین‌ها: جنین‌های گروه آزمون همراه با گروه شاهد (که تحت تابش اشعه قرار نگرفته بودند) هر ۲۴ ساعت یکبار به مدت ۵ روز با میکروسکوپ معکوس (Nikon TS100) مشاهده شده و چگونگی تکوین آنها گزارش شد. گذر جنین از مراحل چهار و هشت سلولی (روزاول)، مورولا (روزدوم)، بلاستوسیست اولیه و بلاستوسیست ثانویه (روزسوم)، بلاستوسیست در حال خروج از زوناپلوسیدا Hatching Blastocyst(روزچهارم) و بلاستوسیست خارج شده از زونا Hatched Blastocyst (روزپنجم) مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین زمان مناسب نوردهی: برای تعیین زمان مناسب نوردهی به جنین‌ها، ابتدا در یک آزمایش مقدماتی جنین‌های دوسلولی به مدت ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت در معرض نور مریی با شدت ۱۶۰۰ لوکس قرار گرفتند و سپس به مدت ۵ روز در محیط‌های HTF و MEM-α در انکوباتور نگهداری شدند. بر اساس نتایج به دست آمده ۹۰٪ جنین‌هایی که به مدت ۲ ساعت در معرض نورمرئی بودند نتوانستند به تکوین ادامه دهند و تمام جنین‌هایی که به مدت ۳ ساعت و ۴ ساعت در معرض نور بودند در مرحله هشت سلولی ومورولا متوقف شدند(نتایج نشان داده نشده است).

جمع‌آوری و آنالیز آماری یافته‌ها: آزمایشات ۸ بار تکرار وتعداد جنین‌های تکوین یافته در هر روز جمع شد، سپس درصد تکوین محاسبه و گزارش شد. برای آنالیز آماری از تست χ^2 استفاده و $P \leq ۰/۰۵$ حد معنی‌داری آزمون‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

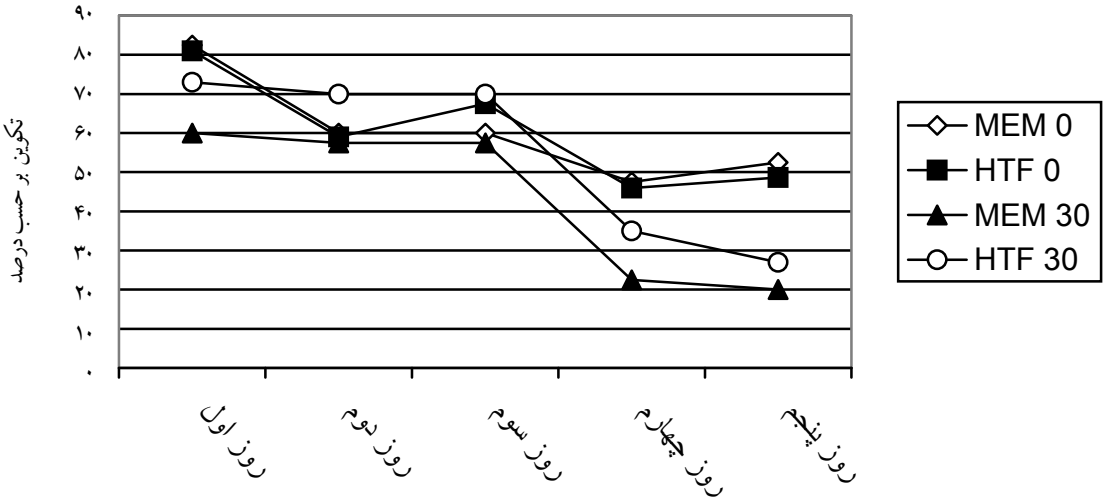
پس از این که مشخص شد جنین‌های مورد آزمایش قادر نیستند بیش ازیک‌ساعت نور را تحمل کنند، زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه انتخاب شدند و جنین‌ها پس از تابش نور مرئی در محیط‌های قبلی کشت داده شدند. به این ترتیب در فاصلهٔ زمانی ۱۵ تا ۳۰ دقیقه تعداد بیشتری جنین در روزهای بعد به مراحل بعدی تکوین رسیدند (نمودار ۱).



نمودار ۱: *میزان تکوین جنین‌ها پس از نوردهی در زمان‌های مختلف*

با تکیه بر نتایج اولیه، زمان‌های ۱۰، ۲۰و ۳۰ دقیقه برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب شدند. از تعداد ۲۶۵ جنین به دست آمده در ۸ نوبت آزمایش، ۲۲۸ جنین از نظر مرفولوژی سالم بودند که برای ادامه آزمایش‌ها استفاده شدند. جنین‌هایی که به مدت ۳۰ دقیقه نور دیده بودند و در محیط‌های HTF و MEM-α نگهداری می‌شدند به ترتیب ۲۷٪ و ۲۰٪ توانستند به مرحله خروج کامل از زونا پلوسیدا برسند که این نتیجه از نظر آماری با جنین‌های گروه کنترل (به ترتیب۶/ ۴۸٪ و ۵۲/۵ ٪) و جنین‌های گروه ده دقیقه و بیست دقیقه که میزان تکوین آنها به ترتیب در محیط HTF ۵۰٪ و ۴۲٪ و در محیط MEM–α ۴۵٪ و ۳۷٪ بود، اختلاف معنی‌دار داشت (جدول۱).

میزان تکوین جنین‌ها در دو محیط HTF و MEM-α اختلاف معنی‌داری نداشت. هر چند که در زمان‌های مورد آزمایش ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه میزان تکامل جنین‌ها دراغلب زمان‌های مورد مطالعه در محیط HTF از محیط MEM-α بالاتر بود (جدول۱).



نمودار ۲: *مقایسه روند تکوین جنین‌ها در محیط‌های HTF و MEM در گروه‌های شاهد و آزمون پس از ۳۰ دقیقه*

جدول ۱: *تکوین جنین‌های دو سلولی موش پس از نوردهی در محیط‌های MEM-α و HTF*

گروه			وضعیت تکوین جنین	تعداد جنین	تکوین جنین درروزهای متوالی*				
					اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم
شاهد			HTF	۳۷	۳۰(۸۱)	۲۲(۵۹)	۲۵(۶۷/۵)	۱۷(۴۵/۹)	۱۸(۴۸/۶)
شاهد			MEM	۴۰	۳۳(۸۲/۵)	۲۴(۶۰)	۲۴(۶۰)	۱۹(۴۷/۵)	۲۱(۵۲/۵)
آزمون	مدت نوردهی	۱۰دقیقه	HTF	۳۷	۳۰(۸۱)	۲۱(۵۶/۵)	۲۲(۵۹)	۱۷(۴۵/۹)	۱۹(۵۱/۳)
آزمون	مدت نوردهی	۱۰دقیقه	MEM	۴۰	۳۰(۷۵)	۲۷(۶۷/۵)	۲۵(۶۲/۵)	۱۸(۴۵)	۱۷(۴۲/۵)
آزمون	مدت نوردهی	۲۰دقیقه	HTF	۳۷	۲۷(۷۲/۹)	۲۶(۷۰)	۲۴(۶۴/۹)	۱۶(۴۳/۲)	۱۷(۴۵/۹)
آزمون	مدت نوردهی	۲۰دقیقه	MEM	۴۰	۲۶(۶۰)	۲۳(۵۷/۵)	۲۵(۶۲/۵)	۱۵(۳۷/۵)	۱۵(۳۷/۵)
آزمون	مدت نوردهی	۳۰دقیقه	HTF	۳۷	۲۷(۷۳)	۲۶(۷۰)	۲۶(۷۰)	۱۳(۳۵)	۱۰(۲۷)a
آزمون	مدت نوردهی	۳۰دقیقه	MEM	۴۰	۲۶(۶۰)	۲۳(۵۷/۵)	۲۳(۵۷/۵)	۹(۲۲/۵)b	۸(۲۰)c

*اعداد داخل پرانتز درصد تکوین را نشان می‌دهد.

a, b,c نسبت به گروه شاهد به ترتیب اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵ , P<۰/۰۱ , P<۰/۰۰۱) دارد.

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده جنین‌های دو سلولی که در شرایط استاندارد کشت شده بودند تکامل طبیعی داشتند و۴۸/۶٪ آنها در محیط HTF و ۵۲/۵٪ در محیط MEM – α ازونا پلوسیدا خارج شدند. به نظر می‌رسد جنین در مراحل اولیه کشت در صورتی که pH، دما، منبع انرژی و یون‌های ضروری را در حد مناسب داشته باشد تا حدود زیادی قادر به تکوین به مراحل بعدی است و نیازی به مواد کمکی همانند ویتامین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه که در محیط‌های مرکب مانند MEM –α استفاده می‌شود ندارد (۲،۳). در این مطالعه برای ثابت نگهداشتن دما و pH که می‌توانند اثرات زیانباری علیه جنین اعمال کرده و نتایج را تحت تأثیر قرار دهند، تمام عملیات نوردهی درون انکوباتور ۳۷ درجه و ۵٪ Co2 انجام شد. تابش نور مرئی به مدت ۳۰ دقیقه در گروه MEM باعث افت تکوین غیر

معنی‌داری نسبت به HTF شد. واکنش‌های فتوشیمیایی با اجزاء محیط کشت می‌تواند منجر به تجزیه مواد آلی محیط کشت و بروز اثرات زیانبار برتکوین جنین شود (۲۳). چنین آثاری در محیط‌های کشت مرکب مانند MEM – α به دلیل وجود مواد آلی مختلف در محیط بارزتر خواهد بود(نمودار ۲). جنین‌هایی که به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه در معرض نور بودند تا حدود زیادی توانستند بر اثرات زیانبار تابش نور مرئی غلبه کنند و درصدتکوین آنها نزدیک به جنین‌هایی بود که در معرض نور قرار نگرفته بودند (جدول۱). بر اساس یک مطالعه، جنین یک روزه خرگوش قادر است تا حدود ۱۲ ساعت تابش نور مرئی را تحمل کند (۷) و مطالعه دیگری حاکی از توانایی جنین ۲ سلولی خرگوش برای غلبه بر اثرات زیانبار تابش اشعه به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت است (۲۲) . البته باید در نظر داشت که مطالعات فوق با استفاده از نور لامپ نئون بوده در حالی که در مطالعه حاضر از لامپ هالوژن استفاده شده است. به نظر می‌رسد جنین موش نسبت به خرگوش حساسیت بالاتری نسبت به اشعهٔ مرئی دارد و گذر از زمان ۲۰ دقیقه به ۳۰ دقیقه مرحله بحرانی بوده است. چرا که پس از تابش نور مرئی به مدت ۳۰ دقیقه به جنین‌های ۲ سلولی موش، میزان تکوین به مرحله خروج از زونا (روز پنجم) نسبت به گروه شاهد و جنین‌هایی که به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه تحت تابش قرار گرفته بودند به طور معنی‌داری کاهش داشت. به عبارت دیگر بلاستومر جنین‌هایی که ۳۰ دقیقه نور دیده بودند فاقد توانایی لازم برای خروج از زونا پلوسیدا بودند، در حالی که جنین‌های یک سلولی خرگوش پس از ۸ ساعت تابش نور مرئی با شدت ۱۶۰۰ لوکس فقط تا حدی آثار افزایش دانسیته سیتوپلاسم و فراگمانتاسیون سلولی را نشان دادند (۱۳) و افزایش زمان نور دهی به ۲۰ ساعت، شدت تخریب سلولی را افزایش داده بود. در مطالعه دیگری، تکوین جنین‌ها در روز اول پس از تابش نور مرئی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشته است و آثار مولکولی تخریب سلول در روزهای بعد نمایان شده است (۱۵). یافته‌های مطالعه حاضر نیز حاکی از کاهش میزان تکوین در روزهای پایانی آزمایش است (جدول۱). به هر حال آسیب سلولی ناشی از اشعه به مدت زمان تابش اشعه و شدت اشعه بستگی دارد. تابش نور احتمالاً منجر به تخریب DNA می‌شود (۱۰) وتابش اشعه ماوراءبنفش به جنین‌های موش در مرحله پیش لانه‌گزینی(۱۸) و سلول‌های پستانداران(۱۷) منجر به افزایش قابل توجه در تبادل قطعات کروماتید می‌شود. واکنش‌های فتوشیمیایی بین نورو اجزاء محیط کشت منجر به اثرات زیانبار بر سلول‌های پستانداران می‌شود (۲۳). وقتی سلول‌های ریه موش به مدت ۲۴ ساعت در معرض نور باشند کروماتید آنها شکسته می‌شود(۲۱). افزایش غلظت اکسیژن در محیط کشت این اثر را افزایش می‌دهد (۱۲). به نظر می‌رسد که وقتی تعداد سلول‌های کشت شده بیشتر باشد اثر سمیت نور کمتر است زیرا مقدار سم حاصل از واکنش‌های فتوشیمیایی در محیط کشت به تعداد سلول‌ها تقسیم شده و با افزایش تعداد سلول‌ها میزان سم جذب شده توسط هر سلول کاهش می‌یابد (۶،۲۳). جنین در مراحل اولیه که از تمایز کمتری برخوردار است حساسیت بیشتری به شرایط نامساعد دارد و هر چه تمایز بیشتر شود این حساسیت کمتر می‌شود(۷). در یک مطالعه که جنین‌های ۴ و ۸ سلولی همستر در معرض ۱۶۰۰ لوکس نور قرار گرفتند درصد تکوین آنها در مقایسه با ۷۰ لوکس به شدت کاهش یافته بود و تابش نورمرئی به جنین ۱ سلولی حتی با به کار بردن یک فیلتر زرد و کاهش طول موج، منجر به توقف تکامل شده بود (۱۴)، در حالی که با قرار گرفتن تخمک‌های موش به مدت ۴ ساعت در معرض نورمرئی (۴۰۰۰ لوکس)، در روند تکامل و لانه‌گزینی و تولد طبیعی نوزادان آنها تغییری حاصل نشد (۴). این نتایج نشان می‌دهد که تخمک‌های موش احتمالاً به اثرات نورمرئی آزمایشگاه مقاوم‌ترند و نتایج ما نیز نشان داد وقتی جنین‌های دو سلولی موش به مدت ۲۰ دقیقه در معرض نور باشند تغییر واضحی در روند تکوین آنها پدید نمی‌آید و اگر زمان تابش به ۳۰ دقیقه برسد میزان تکوین افت شدیدی دارد. از سویی همراهی نور با غلظت بالای اکسیژن باعث ایست تکوینی جنین‌های ۲ سلولی موش (۱۱،۱۶) و هامستر (۱۹) در محیط آزمایشگاه می‌شود (۹،۱۴،۱۷).

وقتی نور مرئی با انرژی ۱۲ mw/cm^2 به سلول‌های ترابکولار گاو تابیده شود سیتوپلاسم چروکیده شده و تکثیر سلولی و فاگوسیتوزیته نیز کاهش می‌یابد و این سمیت با نور سفید شدت می‌یابد(۱۵). نتایج مطالعات ما (منتشر نشده) نیز نشان داد که تابش نور به مدت ۳۰ دقیقه به جنین‌های موش علاوه بر کاهش واضح میزان تکوین موجب چروکیده شدن بلاستومرها و افزایش فضای دور زرده (Perivitelline space) می‌شود.

با توجه به اثرات زیانبار نور مرئی بر جنین موش که از نظر تکوینی تشابه فراوانی با جنین انسان دارد، استفاده از حداقل نورمرئی در آزمایشگاه و بکارگیری فیلتر مناسب (سبز و زرد) تا حدودی خواهد توانست اثرات منفی نورمرئی (۲۰) را کاهش دهد. لیکن مطالعات تکمیلی بعدی برای دستیابی به روش‌های

مقابله با اثرات زیانبارتابش نورمرئی ضرورت دارد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی شماره ۸۱/۹ مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان است که بدین‌وسیله از دست اندرکاران محترم تشکر می‌شود. بخشی از مراحل طرح در آزمایشگاه کشت سلولی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان و قسمتی در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده پزشکی افضلی پور کرمان انجام شده است.

Summary

Effects of Visible Light on the Development of Mouse 2-Cell Embryos

Nematollahi Mahani S.N., PhD.[1], Pahang H. BSc.[2], Kiani M.A., BSc.[3],Nematollahi Mahani S.A.M, BSc[3].

1. Assistant Professor of Anatomy, Afzalipour School of Medicine, and Kerman Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran. 2. M.Sc Student of Anatomy, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran. 3. Laboratory Staff, Infertility Center, Afzalipour Hospital, Kerman, Iran.

Introduction: *Mammalian embryos as well as oocytes are prone to various doses of visible light during manipulations in laboratory. The present study was designed to investigate the effects of visible light on the development of mouse 2-cell embryos.*

Method: *Non-pregnant female NMRI mice were super-ovulated with i.p. injection of 7.5 iu PMSG followed 48 hours later with 10 iu hCG. Forty eight hours after mating, the uterine tubes were removed and 2-cell embryos were transferred into HTF medium by flushing method. Morphologically normal embryos were collected and exposed to 1600 Lux light for 30 minutes. Every 10 minutes a number of embryos were allocated into either HTF or MEM-α medium. Treated embryos as well as controls were incubated at 37°C with 5% CO_2 in air. Developmental stage of embryos was recorded every 24 hours for 5 days. Experiments were replicated 8 times and data were analyzed with χ^2 test.*

Results: *In the treatment group, the development of embryos that underwent 30 min. exposure to visible light was significantly lower (27% and 21% in HTF and MEM-α media respectively) compared with control group (49% and 52% in HTF and MEM-α media respectively). Development of embryos that underwent 10 and 20 min exposure to visible light was lower than controls but the difference was not statistically significant. Percentage of development in HTF and MEM-α was nearly identical.*

Conclusion: *It can be concluded that mouse 2-cell embryos are not able to withstand the deleterious effects of visible light when the time of exposure exceeds 20 min. However, lower doses of visible light may be tolerated particularly when simple media such as HTF are used.*

Key words: *Visible light, 2-cell embryos, Development, Mouse*

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2006; 13(1): 1-7

References

1. Anderson E, Condon W, Sharp D. A study of oogenesis and early embryogenesis in the rabbit,oryctolagus cuniculus, with special reference to the structural changes of mitochondria. *J Morphol* 1970; 130(1): 67-91.
2. Artini PG, Valentino V, Cela V, Cristello F, Vite A, Genazzani AR. A randomized control comparison study of culture media (HTF versus P1) for human *in vitro* fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 116(2): 195-200.
3. Augustin R, Pocar P, Navarrete-Santos A, wrenzycki C, Gandolfi F, Neimann H, *et al.* Glucose transporter expression is developmentally regulated in *in vitro* derived bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2001; 60(3): 370-376.
4. Barlow P, Puissant F, Van der Zwalmen P, Vanderomme J, Trigaux P, Leroy F. *In vitro* fertilization, development, and implantation after exposure of mature mouse oocytes to visible light. *Mol Reprod Dev* 1992; 33(3): 297-302.

5. Bedford JM, Dobrenis A. Light exposure of oocytes and pregnancy rates after their transfer in the rabbit. *J Reprod Fertil* 1989; 85(2): 477-81
6. Bradley MO, Sharkey NA. Mutagenicity and toxicity of visible Flourescent light to cultured mammalian cells. *Nature* 1977; 266(5604): 724-6.
7. Daniel JC. Clevage of mammalian ova inhibited by visible light. *Nature* 1964; 201: 316-7.
8. d'Estaing SG, lornage J, Hadj S, Boulieu D, salle B, Guerin J. Comparison of two blastocyst culture systems: coculture on Vero cells and sequential media . fertil steril 2001; 76(5): 1032-35.
9. Fischer B, Schumacher A, Hegele-Hartung C, Beier HM. Potential risk of light and room temperature exposure to preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1988; 50(6): 938-44.
10. Gantt R, Parshad R, Ewig RA, Stanford KK, Jones GM, Tarone RE *et al.*. Fluorescent light-induced DNA crosslinkage and chromatid breaks in mouse cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75(8): 3809-12.
11. 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.
12. Guerin P, EI Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod* update 2001; 7(2): 175-89.
13. Hegele-Hartung C, Schumacher A, Fischer B. Effects of visible light and room temperature on the ultrastructure of preimplantation rabbit embryos. *Anat Embryol (Berl)* 1991; 183(6): 559-71.
14. Hirao y, Yanagimachi R. Detrimental effect of visible light on meiosis of mammalian eggs *in vitro*. *J Exp Zool* 1978; 206(3): 365-9.
15. Jiang F, Hao F, Wei H, Xu D. Effects of visible light on cultured bovine trabecular cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004; 24(2): 178-80, 184.
16. Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*. *Bioessays* 1994; 16(1): 31-8.
17. Kato H. Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BUdR- labeling method. *Int Rev Cytol* 1977; 49: 55-97.
18. Muller WU, Spindle A. induction of sister chromatid exchange in preimplantation mouse embryos *in vitro* by 3H-thymidine or ultraviolet light in combination with caffeine. *Teratog Carcinog Mutagen* 1986; 6(2): 107-14.
19. Nakayama T, Noda Y, Goto Y, Mori T. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology* 1994; 41(2): 499-510.
20. Noda Y, Goto Y, Umaoka Y, Shiotani M, Nakayama T, Mori T. Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fertil steril* 1994; 62(5): 1022-7.
21. Parshad R, Sanford KK, Jones GM, Tarone RE. Fluorescent light-induced chromosome damege and its prevention in mouse cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75(4): 1830-3.
22. Schumacher A, Fischer B. Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. *J Reprod Fertil* 1988; 84(1):197-204.
23. Stoien JD, Wang RJ. Effect of near-ultraviolet and visible light on mammalian cells in culture II. Formation of toxic photoproducts in tissue culture medium by blacklight. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71(10): 3961-5.
24. Van der Auwera I, Pijnenborg R, Koninckx PR. The influence of *in vitro* culture versus stimulated and untreated oviductal environment on mouse embryo development and implantation. *Hum Reprod* 1999;14(10): 2570-4.
25. Veterany L, Toman R, Jedlicka J. The influence of non-Ionic radiation on the chicken hatching. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2002 ; 37(10): 1849-54.