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

تحقیقی

اثر توأم ملاتونین و آل- ترانس رتینوئیک‌اسید بر بلوغ، لقاح و تکوین رویانی تخمک‌های نارس موش در شرایط آزمایشگاهی

سمیه تدینی لهی[1]، دکتر مجید ملک زاده شفا رودی[2]، دکتر هاتف قاسمی حمیدآبادی[2]
دکتر امیر اسماعیل نژاد مقدم[3]، دکتر علیرضا خلیلیان[4]، دکتر نوراله رضائی*[5]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۲- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۳-دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ٤- استاد آمار حیاتی، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ٥- دانشیار، گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران.

چکیده

زمینه و هدف : *با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی ملاتونین و رتینوئیک‌اسید به‌نظر می‌رسد این دو در میزان بلوغ و تکوین رویانی موثرند. این مطالعه به منظور تعیین اثر توأم ملاتونین و آل- ترانس رتینوئیک‌اسید بر بلوغ، لقاح و تکوین رویانی تخمک‌های نارس موش در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید.*

روش بررسی : *مجموعه تخمک- کومولوس (COCs) از تخمدان موش‌های ماده نژاد NMRI جمع‌آوری شدند و به‌طور تصادفی در محیط کشت بلوغ در شش گروه قرار گرفتند. گروه‌ها شامل کنترل، شم، آزمون۱ (ملاتونین در غلظت‌های ۱۰۰ نانومولار، ۱ و ۲ میکرومولار)، آزمون ۲ (رتینوئیک‌اسید در غلظت‌های۱، ۲ ، ٤ و ٦ میکرومولار)، آزمون ۳ (ملاتونین ۲ میکرومولار و رتینوئیک‌اسید ٤ میکرومولار) و آزمون ٤ (ملاتونین ۱۰۰ نانومولار و رتینوئیک‌اسید ٤ میکرومولار) بودند. بعد از۲٤ ساعت تخمک‌های بالغ با اسپرم لقاح داده شدند و تکوین رویانی تا مرحله بلاستوسیست به مدت پنج روز بررسی شد.*

یافته‌ها : *میزان بلوغ تخمک‌ها در گروه کنترل ٥٠/٦ درصد و در گروه شم ٤٩/٤ درصد بود و بین دو گروه اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. در گروه ملاتونین با غلظت‌های ۱۰۰ نانومولار، ۱ و ۲ میکرومولار به ترتیب ٥٤/٣درصد، ٥٤/٨ درصد و ٥٩/٩ درصد، در گروه رتینوئیک‌اسید با غلظت‌های ٦،٤،٢،١ میکرومولار به ترتیب ٥١/٦ درصد، ٥١ درصد، ٥٩ درصد و ٤٩/٦ درصد و در گروه ۳ و ٤ توأم به ترتیب ٦٠/٤ درصد و ٥٤/٢ درصد بود. میزان بلوغ تخمک در گروه ۲ میکرومولار ملاتونین، گروه ٤ میکرومولار رتینوئیک‌اسید و در گروه ۳ توأم نسبت به گروه کنترل افزایش آماری معنی‌داری داشت (P<٠/٠٥). میزان تکوین در گروه ملاتونین در غلظت ۱۰۰نانومولار، گروه رتینوئیک‌اسید در غلظت ٤ میکرومولار و گروه ٤ توأم نسبت به گروه کنترل افزایش آماری معنی‌داری داشت (P<٠/٠٥). گرچه میزان تکوین در گروه ۳ توأم نسبت به گروه کنترل بیشتر بود؛ اما نسبت به غلظت ۱۰۰نانومولار ملاتونین و ٤ میکرومولار رتینوئیک‌اسید که به تنهایی استفاده گردید؛ کمتر بود.*

نتیجه‌گیری : *اضافه کردن ملاتونین و آل-ترانس رتینوئیک‌اسید با هم به محیط کشت بلوغ، سبب افزایش بلوغ و بهبود تکوین جنین‌های حاصل از آنها به صورت وابسته به دوز می‌شود.*

کلید واژه‌ها : *ملاتونین ، رتینوئیک‌اسید ، بلوغ رویان ، بلوغ تخمک ، لقاح آزمایشگاهی ، تخمک نارس*

* نویسنده مسؤول : دکتر نوراله رضائی ، پست الکترونیکی nourrezaei@gmail.com
نشانی : ساری، جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
تلفن ۰۱۱-۳۳٥٤۳۲٥۰ ، نمابر ۳۳٥٤۳۲٤۹

وصول مقاله : ۱۳۹۳/۱۰/٦ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۳/۱۲/۲٤ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٤/۲/۲

مقدمه

در روش‌های کمک باروری (Assisted Reproductive Technologies) (ART) اغلب پروتکل تحریک تخمک‌گذاری، به منظور افزایش تعداد تخمک‌های موجود برای لقاح مورد استفاده قرار می‌گیرد و در بعضی از بیماران منجر به سندرم تحریک بیش از حد تخمدانی (Ovarian Hyper Stimulation Syndrome: OHSS) می‌شود. روش بلوغ آزمایشگاهی تخمک (In Vitro Maturation: IVM) یک تکنیک جایگزین و امیدبخش برای بلوغ تخمک‌های نابالغ در شرایط آزمایشگاهی در مورد برخی از بیماران از جمله آنانی که در معرض OHSS هستند؛ می‌تواند به‌کار رود (۱). تفاوت عمده‌ای در

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

بلوغ هسته‌ای و یا لقاح و میزان کلیواژ تخمک‌های بالغ شده در in vivo با تخمک‌های بالغ شده در شرایط آزمایشگاهی دیده نشده است؛ اما میزان بارداری در شرایط آزمایشگاهی بسیار پایین‌تر از in vivo است (۲). از جمله عوامل موثر بر ظرفیت رشد ضعیف تخمک در شرایط آزمایشگاهی می‌توان به مطلوب نبودن شرایط محیط کشت در طول IVM و عدم بلوغ سیتوپلاسمی کافی در مقایسه با بلوغ هسته‌ای اشاره کرد (۲). به این دلیل بهبود شرایط کشت برای موفقیت بیشتر در بلوغ تخمک (هم سیتوپلاسمی و هم هسته‌ای) ضروری است تا منجر به بهبود پتانسیل تولید آزمایشگاهی جنین شود (۳). همچنین کشت در شرایط آزمایشگاه جنین‌ها را در معرض عوامل اکسیداتیو مختلفی قرار می‌دهد. از جمله این عوامل گونه‌های واکنش‌پذیراکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) هستند که خود شامل هیدروژن پراکسید (H2O2)، آنیون پراکسید (O2)، رادیکال هیدروکسید (OH) است (۴). این عوامل اکسیداتیو در اووسیت موجب پراکسیده شدن لیپید غشا و آسیب به DNA می‌شوند و می‌توانند اثرات نامطلوبی در تقسیم سلولی، انتقال متابولیت و عملکرد میتوکندری داشته باشند. از این رو ROS می‌تواند پیری اووسیت را شتاب دهد و منجر به کیفیت پایین اووسیت شود (۵). در حالت طبیعی درون فولیکول‌ها آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل Superoxide dismutase (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase: GPx)، کاتالاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از قبیل ویتامین E و C و گلوتاتیون، اوریک اسید، آلبومین، ملاتونین و رتینوئیک‌اسید حضور دارند (۶). در زنان با ناباروری ناشناخته، کاهش سطح آنزیمی آنتی‌اکسیدان‌ها از قبیل GPx گزارش شده است (۵و۷). بنابراین یک راه محافظت اووسیت‌ها از عوامل اکسیداتیو، مکمل نمودن محیط کشت با ترکیبات آنتی‌اکسیدان است (۶).

ملاتونین (N–اسیل ۵ متوکسی تریپتامین) یک مشتق ایندولامین است (۴و۸) که در مهره‌داران از قبیل انسان، علاوه برغده پینه‌آل در شبکیه، پوست و دستگاه گوارش سنتز می‌شود (۸). ملاتونین در تخمدان نیز سنتز می‌شود و به درون مایع فولیکولی ترشح می‌گردد (۸). مایع فولیکولی پیش از تخمک‌گذاری انسان غلظت بالاتری از ملاتونین را نسبت به پلاسما دارد و غلظت ملاتونین در مایع فولیکولی وابسته به رشد فولیکول افزایش می‌یابد (۸). ملاتونین هم در آب و هم در چربی قابل حل است و به‌صورت یک آنتی‌اکسیدان هیدروفیلیک و هیدروفوبیک عمل می‌کند (۴). ملاتونین اگزوژن اثرات مفیدی در بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی اووسیت‌های گاو (۹) و موش (۱۰) دارد. ملاتونین می‌تواند توقف جنین‌ها در مرحله دو سلولی را کاهش و میزان بلاستوسیست را افزایش دهد. بنابراین ملاتونین ممکن است در مراحل خاصی از تکوین رویانی اولیه برای تحریک تشکیل بلاستوسیست در متابولیسم دخالت داشته باشد (۱۰).

رتینوئیدها خانواده بزرگی از ترکیبات طبیعی و خویشاوند با ویتامین A هستند (۱۱). نتایج چندین مطالعه در گونه‌های مختلف انجام شده هم در in vivo و هم در شرایط آزمایشگاه نشان داده القای رتینوئیدها ممکن است در رویدادهای اولیه تولید مثلی از قبیل توسعه فولیکولی، بلوغ اووسیت و تکوین رویانی اولیه موثر باشد (۳و۱۰و۱۱). رتینوئیک‌اسید می‌تواند میزان بلوغ و میزان بلاستوسیست را افزایش داده (۱۲) و در جلوگیری از استرس اکسیداتیو در سلول نقش داشته باشد (۳). اثر سودمند ویتامین A طی رشد اووسیت در شرایط in vivo با اضافه کردن مشتقات رتینول به سیستم کشت آزمایشگاهی اووسیت‌هایی متوقف شده در مرحله میوز، به‌دست آمده است (۳). رتینوئیک‌اسید روی سلول‌ها از طریق تشکیل یا تغییر الگوی فعالیت ژن عمل می‌کند و می‌تواند بلوغ سیتوپلاسمی و ظرفیت تخمک را برای پیشرفت در رشد و نمو تحت تأثیر قرار دهد (۱۳).

با توجه به نقش ملاتونین و رتینوئیک‌اسید در جلوگیری از استرس‌های اکسیداتیو و بلوغ و ظرفیت‌گیری تخمک (۶و۱۷-۱۴)؛ گرچه محققین اثر هر یک از این مواد را به طور جداگانه بر میزان بلوغ و تکوین رویانی اولیه در گونه‌های مختلف گزارش کرده‌اند؛ اما اثرات توأم ملاتونین و آل-ترانس رتینوئیک‌اسید در محیط کشت بلوغ بر میزان بلوغ تخمک نارس و تکوین رویانی تاکنون بررسی نشده است. این مطالعه به منظور تعیین اثر ملاتونین و آل- ترانس رتینوئیک اسید روی بلوغ، باروری و تکوین جنینی قبل از لانه‌گزینی تخمک‌های نابالغ موش در محیط آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران در سال ۱۳۹۲ انجام شد. همه مواد مورد استفاده از شرکت Sigma تهیه گردید. پروتکل اخلاق پژوهشی کار بر روی حیوانات پس از کسب مجوز از کمیته مربوطه در دانشگاه رعایت شده است.

جمع‌آوری تخمک‌های نابالغ موش

از ۱۱۵ سر موش ماده سوری نژاد NMRI با سن ۶-۴ هفته نگهداری شده در حیوانخانه با شرایط استاندارد (۱۲ ساعت نور - تاریکی) استفاده شد. موش‌ها از طریق جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند و تخمدان‌های آنها در شرایط حتی‌المقدور استریل از بدن خارج و به درون قطرات ۳۰۰ میکرولیتری محیط hepes HTF دار حاوی ۵ درصد FCS منتقل شد و با استفاده از سرنگ انسولین زیر لوپ تشریح شد. چربی‌های اضافی اطراف

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

تخمدان حذف شد و تخمک‌های نابالغ در مرحله وزیکول زایا (Germinal vesicle:GV) همراه با سلول‌های کومولوس (Cumulus-Oocyte Complex: COCs) آزاد شدند. سپس به درون قطرات ۲۰۰ میکرولیتری محیط کشت (Minimal Essential Medium-Alpha, MEM-α) انتقال یافتند. با میکروسکوپ معکوس مجموعه کومولوس- تخمک‌های دارای سیتوپلاسم یکنواخت با سلول‌های پوشیده از کومولوس، تخمک‌های نارس هسته‌دار با اندازه تقریبی ۶۵-۶۰ میکرون و سیتوپلاسم روشن با فضای پیش زرده‌ای مناسب برای بلوغ آزمایشگاهی مورد استفاده قرارگرفت و به‌طور تصادفی به گروه‌های کنترل و آزمایش تقسیم شدند و در قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط کشت (در هر قطره ۱۵-۱۰ تخمک) قرارگرفتند و در دیش‌های ۶۰×۱۵ میلی‌متری، کشت داده شدند.

طراحی گروه‌ها برای کشت بلوغ تخمک

تخمک‌های نابالغ (GV) با کومولوس جمع‌آوری شده از موش به‌طور تصادفی به گروه‌های آزمایشی زیر اختصاص داده شد و به مدت ۲۴-۲۰ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO2 ۵درصد (ساخت آلمان) در داخل قطرات در زیر روغن کشت داده شدند. سپس با روش پیپت کردن، سلول‌های کومولوس اطراف آنها برداشته شد و با میکروسکوپ معکوس (ساخت آلمان) مراحل بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز در تمامی گروه‌ها بررسی شد و تخمک‌های بالغ لقاح داده شدند و تکوین رویانی در آنها مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین بلوغ تخمک‌ها

تخمک‌های بدون تغییر شکل در هسته (وجود غشا دور هسته) به عنوان تخمک‌های نابالغ، تخمک‌های با هسته شکسته شده (پراکنده شدن هسته و متراکم شده کروموزوم‌ها) و نشانه شروع تقسیم میوز را به عنوان (Germinal Vesicle Break down: GVBD) و تخمک‌های حاوی اولین جسم قطبی به عنوان تخمک‌های بالغ (MII) شناسایی شدند. حداقل ۶ تکرار جمع‌آوری تخمک‌های نارس و کشت آنها برای هر گروه انجام شد (۱۷و۱۸).

گروه‌بندی

گروه کنترل: محیط کشت پایه حاوی MEM-α، rFSH ۱۰۰mIU/ml، HCG ۷/۵mIU/ml و FCS ۵درصد.

گروه شم: محیط کشت پایه+ ۰/۲ درصد (v/v) اتانل مطلق.

گروه آزمون ۱: محیط کشت پایه + ملاتونین در غلظت‌های ۱۰۰ nM، ۱ و ۲μM.

گروه آزمون ۲: محیط کشت پایه + رتینوئیک‌اسید در غلظت‌های ۱،۲،۴ و ۶ μM.

گروه آزمون ۳: محیط کشت پایه توأم با ملاتونین و رتینوئیک‌اسید (Mel ۲μM و RA ۴μM).

گروه آزمون ۴: محیط کشت پایه توأم با ملاتونین و رتینوئیک‌اسید (Mel ۱۰۰nM و RA ۴ μM).

برای حل کردن ملاتونین و آل– ترانس رتینوئیک‌اسید از اتانول خالص استفاده شد که مقدار آن در محیط کشت بلوغ ۰/۲ درصد بود و هیچ اثر زیان‌آوری روی گسترش کومولوس و وضعیت هسته نداشت (۱۷).

لقاح و تکوین تخمک‌های بلوغ یافته

موش‌های نر نژاد NMRI به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند. دم اپیدیدم آنها جدا شد و به قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت T6 حاوی ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی (Albumin, BSA Bovine Serum) منتقل شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱/۵-۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO2 انکوبه شدند. اسپرم‌های فعال با تحرک بالا به کناره‌های قطره مهاجرت کردند. با انتقال اسپرم‌های سالم و فعال از کناره‌های قطره به داخل قطرات T6 حاوی ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA (1×10^6 اسپرم درهر میلی‌لیتر) ۵ عدد تخمک بالغ در هر قطره قرار داده شد و در انکوباتور قرار گرفت. پس از ۶-۴ ساعت انکوباسیون، اسپرم‌های اطراف تخمک‌ها در سه قطره محیط T6 شسته شدند و از نظر تشکیل پرونوکلئوس‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس کنترل شدند. زیگوت‌های پیش فرض به قطرات ۵۰ میکرولیتر محیط کشت T6 حاوی ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA در زیر روغن منتقل شدند. وضعیت جنین‌ها تا روز ششم بعد از لقاح به وسیله میکروسکوپ معکوس برای ثبت مراحل تکوین جنین مشاهده و ثبت شد. جنین‌های دژنره شده از محیط خارج شدند. جنین‌های متوقف شده به قطرات دیگرمنتقل و در محیط خود باقی مانده و جنین‌های سالم تا رسیدن به مرحله بلاستوسیست در محیط خود باقی ماندند و در نهایت مورد بررسی قرار گرفتند.

ثابت کردن (فیکس) تخمک‌ها

بعد از ۲۴ ساعت بلوغ، تعدادی از تخمک‌هایی که به وسیله پیپتاژ از سلول‌های کومولوس عاری شدند؛ روی لام قرار داده شدند و با لامل مونته شدند. سپس در محلول اسیداستیک و اتانل به نسبت ۱ به ۳ برای حداقل ۲۴ ساعت فیکس شدند. تخمک‌ها با اورسئین یک درصد که در ۴۵ درصد استیک اسید حل شده بود؛ رنگ‌آمیزی شدند و لام‌ها زیر میکروسکوپ فاز کنتراست از نظر بلوغ تخمک بررسی گردید (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 به‌صورت درصد میانگین و انحراف معیار درآمد توصیف شدند. برای درصد بلوغ تخمک، میزان لقاح، میزان کلیواژ و بلاستوسیست ازآزمون کای‌اسکوئر استفاده شد. هر آزمایشی حداقل شش بار تکرار شد و

مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

بلوغ تخمک و تکوین در گروه ملاتونین

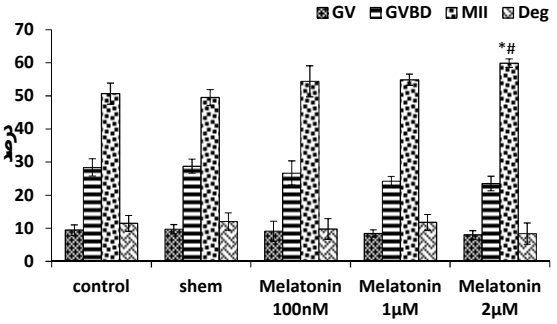
از مجموع ۱۴۸۵ تخمک نارس به دست آمده، میزان تخمک‌های باقیمانده در مرحله GV در گروه‌های کنترل، شم و ملاتونین در غلظت‌های ۱۰۰نانومولار، ۱ و ۲میکرومولار به ترتیب ۹/۴ درصد، ۹/۶ درصد، ۹/۱ درصد ، ۸/۴ درصد و ۸ درصد تعیین شد. گرچه نسبت به سایر غلظت‌ها در غلظت ۲ میکرومولارکمتر و در غلظت ۱۰۰ نانومولار بیشتر بود؛ اما اختلاف آماری معنی‌دار نبود. میزان تخمک‌های GVBD در گروه کنترل، شم و ملاتونین در غلظت‌های ۱۰۰نانومولار ، ۱ و ۲میکرومولار به ترتیب ۲۸/۳ درصد، ۲۸/۷ درصد، ۲۶/۶ درصد، ۲۴/۲ درصد و ۲۳/۵ درصد تعیین شد. گرچه در غلظت ۱۰۰ نانومولار از سایر غلظت‌ها بیشتر بود؛ اما اختلاف آماری معنی‌دارنبود. در این مطالعه در مقایسه بین گروه کنترل و شم در تمامی مراحل بلوغ، لقاح و تکوین اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید.

میزان بلوغ تخمک در گروه کنترل، شم و در غلظت‌های ۱۰۰نانومولار، ۱ و ۲ میکرومولار ملاتونین به ترتیب ۵۰/۶ درصد، ۴۹/۴ درصد، ۵۴/۳ درصد، ۵۴/۸ درصد و ۵۹/۹ درصد به‌دست آمد. این مقادیر در غلظت ۲ میکرومولار نسبت به گروه‌های کنترل (P<۰/۰۲) و شم (P<۰/۰۱) افزایش آماری معنی‌داری نشان داد؛ اما در غلظت ۱۰۰ نانومولار اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین درصد تخمک‌های دژنره در غلظت ۲میکرومولار نسبت به دیگر گروه‌ها به طور غیرمعنی‌داری کمتر بود (نمودار یک).

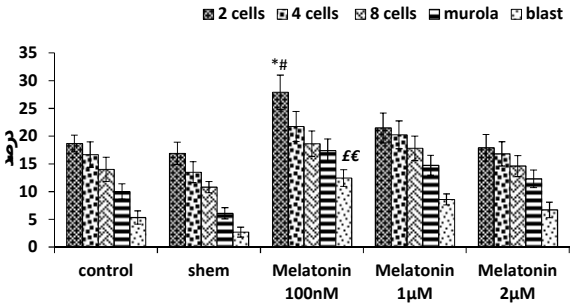
نتایج لقاح، کلیواژ و تکوین جنین‌های حاصل از تخمک‌های گروه ملاتونین نشان داد؛ گرچه درصد جنین‌های مرحله ۲ سلولی و بلاستوسیست در غلظت ۲ میکرومولار نسبت به سایر غلظت‌ها کمتر و نسبت به کنترل و شم بیشتر است؛ اما اختلاف آماری معنی‌داری به‌دست نیامد. در غلظت ۱۰۰ نانومولار درصد جنین‌های ۲سلولی در مقایسه با کنترل (P<۰/۰۵) و شم (P<۰/۰۲) افزایش آماری معنی‌دار داشت و نیز درصد بلاستوسیست در مقایسه با کنترل (P<۰/۰۲) و شم (P<۰/۰۰۰۱) افزایش آماری معنی‌داری داشتند و این تفاوت‌ها در مقایسه با سایر غلظت‌های ملاتونین اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد. همچنین در مرحله کلیواژ اختلاف آماری معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف با گروه کنترل و شم مشاهده نگردید (نمودار۲).

بلوغ تخمک و تکوین در گروه رتینوئیک‌اسید

از مجموع ۱۷۸۹ تخمک نارس به‌دست آمده، میزان تخمک‌های باقیمانده در مرحله GV در گروه کنترل، شم و غلظت‌های ۲،۴،۱و۶ میکرومولار رتینوئیک‌اسید به ترتیب ۹/۴ درصد، ۹/۶ درصد، ۹/۳ درصد، ۱۰/۷ درصد، ۷/۳ درصد و ۷/۷ درصد تعیین شد. گرچه این



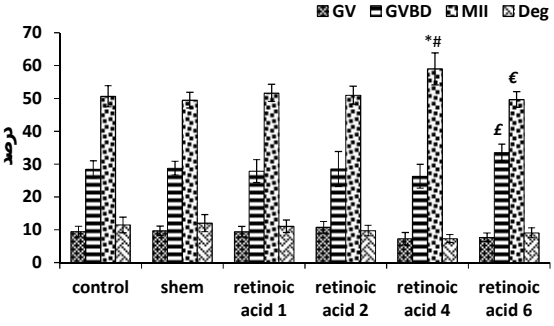
نمودار ۱ : مقایسه نسبت تخمک‌های باقیمانده در مرحله GV ، درصد تخمک‌های GVBD، درصد بلوغ تخمک و درصد تخمک‌های دژنره شده موش در گروه‌های کنترل، شم و غلظت‌های مختلف ملاتونین
**اختلاف با گروه کنترل (P<۰/۰۲)*
#اختلاف با گروه شم (P<۰/۰۱)



نمودار ۲ : مقایسه نسبت جنین‌های مرحله ۲ سلولی، مرحله کلیواژ و بلاستوسیست در گروه ملاتونین نسبت به گروه کنترل و شم
**اختلاف با گروه کنترل (P<۰/۰۵)، #اختلاف با گروه شم (P<۰/۰۲)، £اختلاف با گروه کنترل (P<۰/۰۲)*
€اختلاف با گروه شم (P<۰/۰۰۰۱)

میزان نسبت به دیگر گروه‌ها در غلظت ۴ میکرومولار کمتر و در غلظت ۲ میکرومولار بیشتر بود؛ اما اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. درصد تخمک‌های GVBD در گروه کنترل، شم و غلظت‌های ۲،۴،۱و۶ میکرومولار به ترتیب ۲۸/۳ درصد، ۲۸/۷ درصد، ۲۷/۸ درصد، ۲۸/۵ درصد، ۲۶/۳ درصد و ۳۳/۵ درصد بود. درصد GVBD در غلظت ۶ میکرومولار نسبت به دیگر گروه‌ها بیشتر بود و نسبت به غلظت ۴میکرومولار افزایش آماری معنی‌داری (P<۰/۰۵۵) نشان داد (نمودار ۳). میزان بلوغ تخمک در گروه کنترل، شم و غلظت‌های ۲،۴،۱و۶ میکرومولار به ترتیب ۵۰/۶ درصد، ۴۹/۴ درصد، ۵۱/۶ درصد، ۵۱ درصد، ۵۹ درصد و ۴۹/۶ درصد تعیین شد که در غلظت ۴میکرومولار نسبت به کنترل (P<۰/۰۴) و شم (P<۰/۰۱) اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد. میزان بلوغ در غلظت ۶میکرومولار نسبت به ۴ میکرومولار افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۲) (نمودار۳).

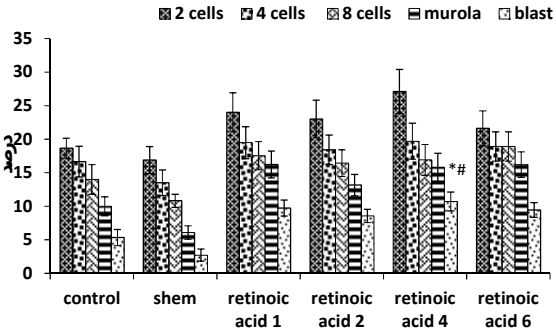
مقایسه نتایج به دست آمده از لقاح و تکوین جنین‌های حاصل از تخمک‌های گروه رتینوئیک‌اسید نشان داد که درصد جنین‌های



نمودار ۳ : مقایسه نسبت تخمک‌های باقیمانده در مرحله GV ، درصد تخمک‌های GVBD، درصد بلوغ تخمک و درصد تخمک‌های دژنره شده موش در گروه‌های کنترل، شم و غلظت‌های مختلف رتینوئیک‌اسید

**اختلاف با گروه کنترل (P<۰/۰٤)، #اختلاف با گروه شم (P<۰/۰۱)، £اختلاف بین ٤ µM و ٦ µM (P<۰/۰۵۵)*

€اختلاف بین ٤ µM و ٦ µM (P<۰/۰۲)



نمودار ٤ : مقایسه نسبت جنین‌های مرحله ۲ سلولی، مرحله کلیواژ و بلاستوسیست در گروه رتینوئیک‌اسید نسبت به گروه کنترل و شم

**اختلاف با گروه کنترل (P<۰/۰٤)*

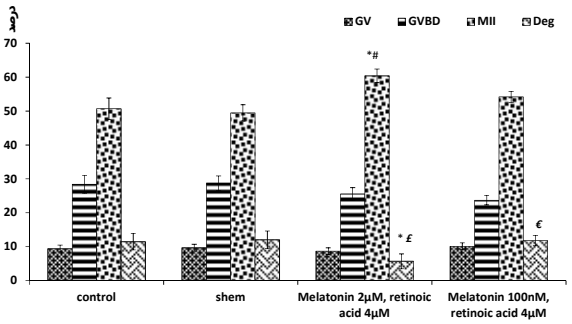
#اختلاف با گروه شم (P<۰/۰۰۲)

مرحله ۲سلولی در غلظت‌های ۱ و ۲ و ۶ میکرومولار نسبت به ۴میکرومولارکمتر و نسبت به کنترل و شم به‌طور غیرمعنی‌داری بیشتر است. درصد کلیواژ در غلظت‌های مختلف با گروه کنترل و شم اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند. همچنین درصد بلاستوسیست در غلظت ۴ میکرومولار نسبت به سایر غلظت‌های رتینوئیک‌اسید معنی‌دار نبود؛ اما در مقایسه با کنترل (P<۰/۰۴) و شم (P<۰/۰۰۲) افزایش آماری معنی‌داری نشان داد (نمودار۴).

بلوغ تخمک و تکوین در گروه‌های توأم

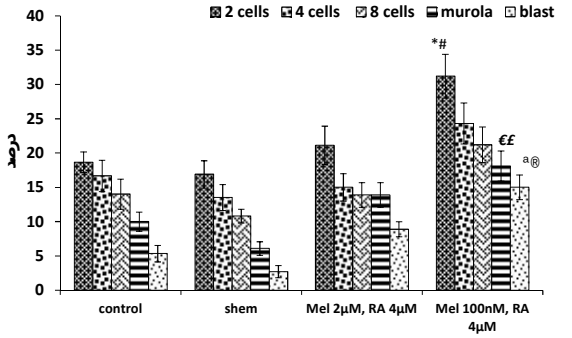
از مجموع ۱۱۸۸ تخمک نارس به‌دست آمده، میزان تخمک‌های باقیمانده در مرحله GV در گروه کنترل، شم و توأم ۳ و توأم ۴ به ترتیب ۹/۴ درصد، ۹/۶ درصد، ۸/۶ درصد و ۱۰/۱ درصد بود که در مقایسه با گروه کنترل و شم در گروه توأم ۳ کمتر و در گروه توأم ۴ به‌طور غیرمعنی‌داری بیشتر بود. درصد تخمک‌های GVBD در گروه کنترل، شم، توأم ۳ و توأم ۴ به ترتیب ۲۸/۳ درصد، ۲۸/۷ درصد، ۲۵/۵ درصد و ۲۳/۷ درصد بود که اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند.

میزان بلوغ تخمک در گروه‌های کنترل، شم و توأم ۳ و توأم ۴ به ترتیب ۵۰/۶ درصد، ۴۹/۴ درصد، ۶۰/۴ درصد و ۵۴/۲ درصد بود که در گروه توأم ۳ نسبت به کنترل (P<۰/۰۱) و شم (P<۰/۰۰۸) افزایش آماری معنی‌داری نشان داد؛ اما در گروه توأم ۴ اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین درصد تخمک‌های دژنره شده در گروه توأم ۳ نسبت به کنترل (P<۰/۰۱) و شم (P<۰/۰۰۶) کاهش آماری معنی‌دار داشت و در گروه توأم ۴ اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار۵).



نمودار ۵ : مقایسه نسبت تخمک‌های باقیمانده در مرحله GV ، درصد تخمک‌های GVBD، درصد بلوغ تخمک و درصد تخمک‌های دژنره شده موش در گروه‌های کنترل، شم و ۲ گروه توام (۲µM Mel ، µM ٤RA) (۱۰۰nM Mel و ٤µM RA)

**اختلاف با گروه کنترل (P<۰/۰۱)، #اختلاف با گروه شم (P<۰/۰۰۸)، £اختلاف با گروه شم (P<۰/۰۰٦)، €اختلاف بین توام (۲µM Mel ٤µM RA) و (۱۰۰nM Mel و ٤µM RA) (P<۰/۰۰۷)*



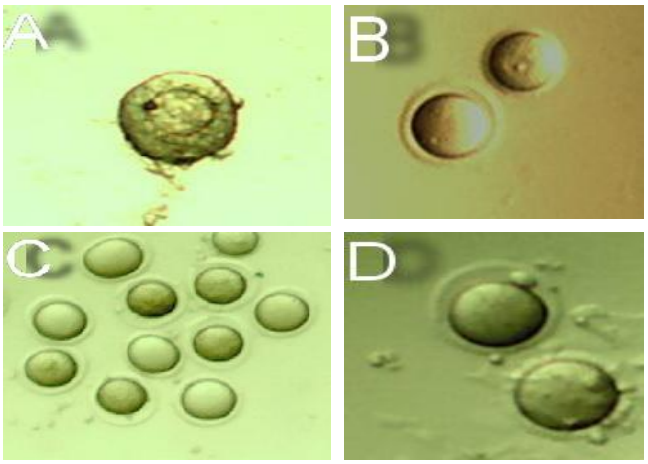
نمودار ٦ : مقایسه نسبت جنین‌های مرحله ۲سلولی، مرحله کلیواژ و بلاستوسیست در ۲ گروه توام (۲µM Mel، ٤µM RA) و (۱۰۰nM Mel و µM ٤RA) نسبت به گروه کنترل و شم

**اختلاف با گروه کنترل (P<۰/۰۱)، #اختلاف با گروه شم (P<۰/۰۰۳)، £اختلاف با گروه کنترل (P<۰/۰۰۲)، €اختلاف با گروه شم (P<۰/۰۰۱)، aاختلاف با گروه کنترل (P<۰/۰۰۵)*

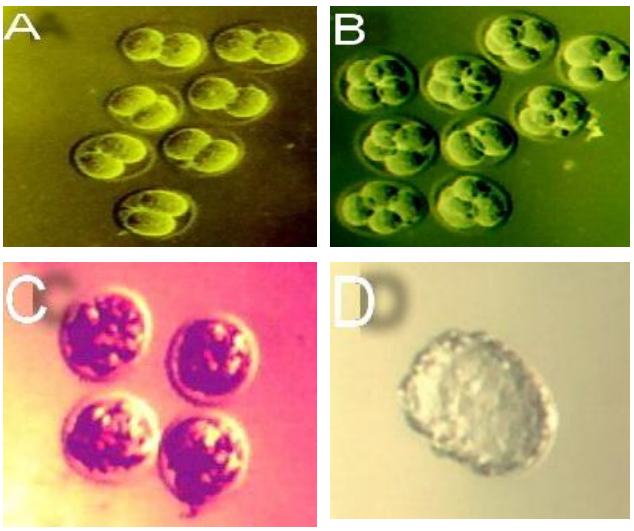
®اختلاف با گروه شم (P<۰/۰۰۰۱)

نتایج به دست آمده از لقاح وتکوین جنین‌های حاصل از تخمک‌هایی که در معرض محیط توأم۳ و ۴ قرار گرفتند؛ نشان داد درصد جنین‌های مرحله ۲ سلولی در گروه توأم ۳ نسبت به کنترل و شم بیشتر است که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود؛ اما در گروه توأم ۴ نسبت به کنترل (P<۰/۰۱) و شم (P<۰/۰۰۳) افزایش

آماری معنی‌داری داشت (نمودار۶). درصد کلیواژ و بلاستوسیست در گروه توأم ۳ نسبت به کنترل و شم به طور غیرمعنی‌داری بیشتر بود. این اختلاف در گروه توأم ۴ نسبت به کنترل (P<۰/۰۰۲) و شم (P<۰/۰۰۱) افزایش آماری معنی‌داری داشت. درصد بلاستوسیست در گروه توأم ۴ نسبت به کنترل (P<۰/۰۰۵) و شم (P<۰/۰۰۰۱) افزایش آماری معنی‌داری نشان داد (نمودار ۶).



شکل ۱ : تخمک موش در مراحل مختلف بلوغ
A) مجموعه تخمک-کومولوس ۴۰۰ò، B) تخمک GV ۴۰۰ò
C) GVBD ۱۰۰ò، D) MII ۴۰۰ò
(گروه توام با غلظت Mel 2µM و RA 4µM)



شکل ۲ : جنین موش در مراحل مختلف تکوین
A) جنین‌های ۲ سلولی ۲۰۰ò، B) جنین‌های ٤ سلولی ۲۰۰ò
C) مورلا ۲۰۰ò، D) بلاستوسیست ۴۰۰ò
(گروه توام با غلظت Mel100nM و RA 4µM)

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر اضافه کردن ملاتونین و رتینوئیک‌اسید هم به صورت جداگانه و هم به صورت توأم به محیط کشت بلوغ تخمک توانست سبب افزایش قابل توجه در میزان بلوغ هسته‌ای تخمک‌های نابالغ موش گردد و در ادامه میزان لقاح و باروری را افزایش دهد. در گروه ملاتونین با غلظت‌های مختلف مشخص شد میزان بلوغ در غلظت ۲میکرومولار از سایر غلظت‌ها بیشتر بوده و نسبت به گروه کنترل و شم افزایش معنی‌داری داشته است. در مطالعه بهادری و همکاران میزان بلوغ و لقاح تخمک در محیط‌های تیمار شده با دوزهای میکرومولار نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت؛ در صورتی که میزان تکوین جنین‌ها با دوزهای نانومولار افزایش یافت (۲۰). اما در مطالعه فرح‌ور و همکاران ملاتونین نتوانست گسترش سلول‌های کومولوس و بلوغ هسته‌ای تخمک‌های گاوی را بهبود دهد (۸). علت تفاوت مطالعه حاضر با مطالعه فرح‌ور و همکاران (۸) را می‌توان با بررسی مطالعات انجام شده در این خصوص که نشان دادند میزان موفقیت بلوغ آزمایشگاهی وابسته به نوع گونه است و در گونه‌های مختلف متفاوت است (۱۰)؛ جستجو کرد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد میزان لقاح و تکوین در غلظت ۱۰۰نانومولارملاتونین از سایر غلظت‌ها بیشتر است و نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد که مطابق با نتایج مطالعه بهادری و همکاران (۲۰) است. همچنین اصغری و همکاران نشان دادند اضافه کردن ۱۰ و ۱۰۰ نانومولار ملاتونین به محیط کشت ۶ Tجنین دو سلولی موش، این جنین‌ها را تا مرحله بلاستوسیست پیش می‌برد و تعداد سلول‌های آنها را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (۲۱).

یافته‌های این مطالعه در بررسی تاثیر رتینوئیک‌اسید به تنهایی بر بلوغ و تکوین تخمک‌های نابالغ نشان داد دوزهای ۱ و ۲ میکرومولار در مقایسه با دوز ۴میکرومولار درصد بلوغ را به میزان کمتری افزایش داده و در دوز ۶میکرومولار هم میزان بلوغ کمتر بود؛ اما غلظت ۴میکرومولار علاوه بر بلوغ، لقاح و تکوین رویانی را تا رسیدن به مرحله بلاستوسیست نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش داد. در مطالعه نصیری و همکاران بررسی اثر غلظت‌های مختلف (۸،۶،۴،۲،۱میکرومولار) آل- ترانس رتینوئیک‌اسید بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های موش نشان داد که میزان بلوغ تخمک با ۲ و ۴ میکرومولار و میزان لقاح تخمک با ۴ میکرومولار در مقایسه با کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (۱۸). در مطالعه واحدی و همکاران روی اثر غلظت‌های مختلف (۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میکرومولار) آل- ترانس رتینوئیک‌اسید بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو، میزان بلوغ تخمک با ۱ میکرومولار در مقایسه با دیگر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (۳)؛ اما در مطالعه ما غلظت ۱ میکرومولار اثر قابل ملاحظه‌ای بر میزان بلوغ نداشت. همچنین در مطالعه Livingston و همکاران روی اثر غلظت‌های مختلف (۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار) آل - ترانس رتینوئیک‌اسید بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های گاو؛ ۱ میکرومولار در مقایسه با کنترل اثری روی بلوغ نداشت. ۵ میکرومولار در مقایسه با کنترل به‌طور معنی‌داری میزان بلوغ و بلاستوسیست را افزایش داد و غلظت ۱۰ میکرومولار از نظر میزان

کلیواژ و بلاستوسیست با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت (۱۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان لقاح در غلظت ۴میکرومولار از بقیه بیشتر است که با مطالعه نصیری و همکاران (۱۸) موافق است. نتایج مربوط به تکوین هم نشان داد که میزان تکوین در غلظت ۴میکرومولار از بقیه بیشتر است که با مطالعه Livingston و همکاران (۱۲) که غلظت ۵ میکرومولار را موثر دانستند؛ تقریباً همخوانی دارد. مطالعه حاضر نشان داد اثرات رتینوئیک اسید در بلوغ و تکوین وابسته به دوز است. به‌نظر می‌رسد این ماده نه در دوزهای خیلی پایین و نه خیلی بالا بلکه در دوزهای متوسط (۴میکرومولار) میزان بلوغ و تکوین را افزایش می‌دهد.

در گروه ۳ توأم که مخلوط غلظت‌های موثر ملاتونین (۲میکرومولار) و رتینوئیک‌اسید (۴ میکرومولار) بود؛ نشان داد میزان بلوغ هم نسبت به کنترل و هم نسبت به سایر غلظت‌ها بیشتر است. میزان تکوین در این گروه توأم نسبت به گروه کنترل بیشتر بود؛ اما نسبت به غلظت ۱۰۰نانومولار ملاتونین و غلظت ۴میکرومولار رتینوئیک اسید که به تنهایی استفاده شدند؛ کمتر بود. لذا برای بررسی روند تکوین در گروه ۴ توأم دو غلظت ۱۰۰نانومولار ملاتونین و ۴میکرومولار رتینوئیک‌اسید نشان دادند میزان تکوین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته و نسبت به سایر غلظت‌های استفاده شده به تنهایی، بیشتر است.

با توجه به یافته‌های این مطالعه و مطالعات دیگری که اثر ملاتونین و رتینوئیک‌اسید را مثبت ارزیابی کرده‌اند؛ نظرات مختلفی در توجیه مکانیسم اثر این مواد پیشنهاد شده است. ملاتونین یک پاک کننده قوی رادیکال آزاد و یک آنتی‌اکسیدان وسیع‌الطیف محسوب می‌شود که در محیط کشت نه تنها منجر به لقاح می‌شود؛ بلکه تکوین رویانی اولیه را از طریق عملش به عنوان پاک‌کننده قوی رادیکال آزاد حمایت می‌کند (۶). زیرا رادیکال‌های آزاد سبب از کارافتادن میتوکندری‌ها، آسیب DNA و RNA و پروتئین‌ها می‌شود (۵) و سطوح بالای ROS می‌تواند به اسپرماتوزا، تخمک و رویان آسیب بزند و منجر به بلوک دو سلولی در موش شود (۲۱و۲۲). بنابراین ملاتونین ممکن است از طریق از بین بردن رادیکال‌های آزاد شرایط را برای بهبود تکوین تخمک فراهم کند و در موش از توقف در مرحله دو سلولی جلوگیری کند و یا ممکن است ملاتونین از طریق گیرنده‌هایش به‌طور مستقیم در فعالیت تخمدانی موثر باشد. گیرنده ملاتونین MT1 و MT2 در سلول‌های گرانولوزای لوتئال انسانی و در تخمدان‌های موش صحرایی (فولیکول آنترال و کورپوس لوتئوم) شناسایی شده‌اند (۲۳و۲۴). علاوه بر این ملاتونین عامل هسته‌ای β- kappa (NFk-B) را فعال می‌کند که عامل مهمی برای تکوین رویانی موش از مرحله یک سلولی به چهارسلولی است (۶). بنابراین می‌توان ملاتونین را با داشتن چنین عواملی به عنوان عامل مهمی در فرایند بلوغ هسته‌ای، بلوغ سیتوپلاسمی تخمک و مراحل تکوین مطرح کرد. همچنین مکانیسم اثر القای رتینوئیک‌اسید در بلوغ تخمک و اثرات مثبت تکوین رویانی اولیه هنوز به‌درستی شناسایی نشده و مطالعات در این زمینه ادامه دارد؛ اما با بررسی زمینه‌ای تحقیقات به‌عمل آمده تئوری‌های مختلفی مطرح شده است. رتینوئیک‌اسید ممکن است از طریق اثر روی بیان گیرنده FSH یا LH سلول‌های گرانولوزا که در خوک (۱۲) و موش صحرایی (۱۳) اثبات شده؛ در بلوغ تخمک موثر باشد و یا رتینوئیک‌اسید از طریق افزایش پلی‌آدنیلاسیون سبب افزایش کیفیت mRNA و پیشبرد بلوغ اووسیت گردد (۱۲). ممکن است از طریق مهار سنتز نیتریک اکساید و مهارسیکلواکسی ژناز در رشد نهایی فولیکول‌های تخمدانی موثر باشد و ممکن است از طریق شرکت در یک مکانیسم محافظتی درونی استرس اکسیداتیو سبب بلوغ تخمک شود (۱۲). بنابراین رتینوئیک‌اسید همانند ملاتونین با اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند تخمک‌ها را در برابر عوامل اکسیداتیو محافظت کند و منجر به افزایش کیفیت تخمک و در نتیجه منجر به بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی کافی شود که این خود افزایش لقاح و بهبود در مراحل تکوین را به همراه دارد (۱۸). انتخاب ملاتونین و رتینوئیک‌اسید با هم، به دلیل حضور طبیعی در فولیکول‌های در حال رشد و نیز به عنوان مواد آنتی‌اکسیدان می‌توانند از طریق گیرنده‌هایشان در تخمک‌های نابالغ نقش مهمی در بلوغ تخمک ایفا کنند (۷و۱۲). برای دستیابی محیط کشت مطلوب با ملاتونین و رتینوئیک‌اسید به منظور بلوغ آزمایشگاهی تخمک و تکوین رویانی اولیه و شناخت مکانیسم دقیق بررسی‌های بیشتری پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد اضافه کردن ملاتونین و آل-ترانس رتینوئیک اسید با هم به محیط کشت بلوغ، سبب افزایش بلوغ و بهبود تکوین جنین‌های حاصله به‌صورت وابسته به دوز می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم سمیه تدینی لهی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریح از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران بود. همچنین مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی (شماره ۲۳۷-۹۱) مصوب مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی آن دانشگاه به انجام رسید. بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از همه کارکنان آن مراکز و نیز همکاری آقای روح الله ابراهیم‌پور اعلام می‌داریم.

References

1. Yalçınkaya E, Çalışkan E, Budak Ö. In vitro maturation may prevent the cancellation of in vitro fertilization cycles in poor responder patients: A case report. J Turk Ger Gynecol Assoc. 2013; 14(4): 235-7. doi:10.5152/jtgga.2013.68335.

2. Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S. Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. Hum Reprod. 2000 Dec; 15(Suppl 5):11-7.

3. Vahedi V, Zeinoaldini S, Kohram H, Farahavar A. Retinic acid effects on nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. Afr J Biotechnol. 2009; 8(6): 3974-8.

4. Kang JT, Koo OJ, Kwon DK, Park HJ, Jang G, Kang SK, et al. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. J Pineal Res. 2009 Jan; 46(1):22-8. doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00602.x.

5. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, et al. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. J Ovarian Res. 2012 Jan; 5:5. doi: 10.1186/1757-2215-5-5.

7. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. Endocr J. 2013; 60(1):1-13.

6. Imani H, Tahaei LS, Parivar K, Kazemi Ashtiani S, Shahverdi A, et al. [Effects of retinoic acid on maturation and development of immature mouse oocytes in vitro]. Cell Journal (Yakhteh). 2007; 9(1): 7-14. [Article in Persian]

8. Farahavar A, Zare Shahne A, Kohram H, Vahedi V. Effect of melatonin on in vitro maturation of bovine oocytes. Afr J Biotechnol. 2010; 9(17): 2579-83.

9. Poleszczuk O, Papis kwenta-Muchalska E: An effect of melatonin on development of bovine embryos cultured in vitro under optimal or enhanced oxygen tensions. Reprod Fertil Dev. 2005; 17(1): 224. doi: 10.1071/RDv17n2Ab148.

10. Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K, Amemiya A, Itoh MT. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. J Pineal Res. 2000 Jan;28(1):48-51.

11. Duque P, Díez C, Royo L, Lorenzo PL, Carneiro G, Hidalgo CO, et al. Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. Hum Reprod. 2002 Oct; 17(10):2706-14.

12. Livigston T, Eberhardt D, Edwards JL, Godkin J. Retinol improves bovine embryonic development in vitro. Reprod Biol Endocrinol. 2004; 2: 83. doi:10.1186/1477-7827-2-83.

13. Morriss-Kay GM, Ward SJ. Retinoids and mammalian development. Int Rev Cytol. 1999;188:73-131.

14. Biabani K, Zare Shahneh A, Kohram H, Khodaei Motlagh M. [Effect of H_2O_2 and melatonin on in vitro oocyte maturation]. Journal of Cell and Tissue. 2012; 2(4): 387-93. [Article in Persian]

15. Adriaens I, Jacquet P, Cortvrindt R, Janssen K, Smitz J. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. Toxicology. 2006 Dec; 228(2-3):333-43.

16. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. Life Sci. 1994;55(15):PL271-6.

17. Eimani H, Tahaei L S, Parivar K, Rezazadeh M, Kazemi S, Shahverdi A, et al. [The effect of Granulosa cells co-culture and retinoic acid on maturation and development of immature mouse oocytes in vitro]. Journal of Iranian Anatomical Sciences. 2007; 5(19): 137-46. [Article in Persian]

18. Nasiri E, Mahmoudi R, Bahadori MH, Amiri I. The effect of retinoic acid on in vitro maturation and fertilization rate of mouse germinal vesicle stage oocytes. Cell J. 2011; 13(1):19-24.

19. Rezaei N, Chian RC. Effects of essential and non_essential amino acids on in-vitro maturation, fertilization and development of immature bovine oocytes. Iranian Journal of Reproductive Medicine (IJRM). 2005; 3(1): 36-41.

20. Bahadori MH, Ramezani M, Asghari Nohadani Z. [Melatonin dose-dependent effects on oocyte maturation capacity,in vitro fertilization and blastocyst development in mouse]. Kowsar Medical Journal. 2011; 16 (2):67-71. [Article in Persian]

21. Asgari Z, Ghasemian F, Ramezani M, Bahadori MH. The effect of melatonin on the developmental potential and implantation rate of mouse embryos. Cell J. 2012; 14(3):203-8.

22. Casao A, Abecia JA, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Vázquez MI, Forcada F. The effects of melatonin on in vitro oocyte competence and embryo development in sheep. Span J Agric Res. 2010; 8(1): 35-41. doi:10.5424/sjar/2010081-1141.

23. Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. Fertil Steril. 2009 Jul;92(1):328-43. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.05.016.

24. Sampaio RV, Conceição S, Miranda MS, Sampaio Lde F, Ohashi OM. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro. Reprod Biol Endocrinol. 2012 Dec; 10:103. doi: 10.1186/1477-7827-10-103.

Original Paper

Effect of combination of Melatonin and All-Trans retinoic acid on maturation, fertilization and embryonic development of immature mouse oocytes

Tadayoni S (M.Sc)[1], Malekzadeh Shafarodi M (Ph.D)[2], Ghasemi Hamidabadi H (Ph.D)[2] Esmailnejad Moghaddam A (Ph.D)[3], Khalilian A (Ph.D)[4], Rezaei N (Ph.D)*[5]

[1]M.Sc Student of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Mazandaran Univercity of Medical Sciences, Sari, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Mazandaran Univercity of Medical Sciences, Sari, Iran. [3]Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Mazandaran Univercity of Medical Sciences, Sari, Iran. [4]Professor of Biostatistics, Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Research Center for Molecular Medicine, Mazandaran Univercity of Medical Sciences, Sari, Iran. [5]Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Research Center for Molecular Medicine, Mazandaran Univercity of Medical Sciences, Sari, Iran.

Abstract

Background and Objective: With respect to the antioxidant role of melatonin and retinoic acid, it seems to be effective both in the maturation and embryonic development. This study was done to investigate the effect of combination of melatonin and All-Trans retinoic acid (RA) on maturation, fertilization and embryonic development of immature mouse oocytes.

Methods: In this experimental study, cumulus - oocyte complex (COCs) were recovered from 4-6 week old female mice NMRI and were divided into 6 maturation medium groups including control, sham, experiment 1(melatonin 100 nM, 1 and 2 µM), experiment 2 (retinoic acid 1, 2, 4, 6 µM), experiment 3 (melatonin 2 µM+RA 4 µM), experiment 4 (Mel 100nM + retinoic acid 4µM). The maturation rate was recorded after 24 hours of culture in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37°C. The matured oocytes were fertilized with sperm. Fertilization and embryonic development rates to the blastocyst stage were recorded.

Results: Maturation rate in the control and sham groups were 50.6% and 49.4%, respectively. Maturation rate were 54.3%, 54.8%, 59.9% in melatonin group with concentrations of 100 nM, 1 and 2 µM, respectively. Maturation rate were 51.6%, 51%, 59% and 49.6% in t-RA group with concentrations of 1, 2, 4, 6 µM. Maturation rate were 60.4% and 54.2% in the experiment 3 and 4 groups, respectively. The maturation rates in the melatonin 2 µM, retinoic acid 4 µM and experiment 3 significantly increased in compare to control ($P<0.05$). The embryonic development rate in the melatonin with 100nM concentration and 4 µM of retinoic acid increased significantly compared to controls ($P<0.05$). Although, embryonic development rate in experiment 3 was higher than control, but lower in compare to melatonin 100 nM and the retinoic acid 4 µM. The embryonic development rate in experiment 4 significantly increased in compare to control ($P<0.05$).

Conclusion: Combination of melatonin and All-Trans retinoic acid in medium culture increase maturation rate and improved embryonic development in dose dependent manner.

Keywords: Melatonin, Retinoic acid, In-vitro maturation, Immature oocytes, Embryonic development, Maturation rate, Mouse

*** Corresponding Author: Rezaei N (Ph.D), E-mail: nourrezaei@gmail.com**

Received 27 Dec 2014 **Revised** 15 Mar 2015 **Accepted** 22 Apr 2015

Cite this article as: Tadayoni S, Malekzadeh Shafarodi M, Ghasemi Hamidabadi H, Esmailnejad Moghaddam A, Khalilian A, Rezaei N. [Effect of combination of Melatonin and All-Trans retinoic acid on maturation, fertilization and embryonic development of immature mouse oocytes]. J Gorgan Uni Med Sci. 2015; 17(3): 46-54. [Article in Persian]