مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۱، شماره۴ (شماره پیاپی ۴۵)، زمستان ۱۳۸۷، ۶۶-۵۹

تأثیراتانول برمیزان رشد و تکوین جنین‌های دو سلولی متوقف شده موش

دکتر محمدرضا دارابی[1*]، دکتر عبدالحسین شیروی[2]، آذین دخت نژادی[3]، دکترمحمد رفیعی[4]

۱- استادیار، دکترا آناتومی، گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲- استادیار، دکترا بیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان ، دامغان، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان ، ایران

۴- استادیار، دکترا آماری حیاتی، گروه بهداشت پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت ۸۷/۴/۲۶، تاریخ پذیرش ۸۷/۶/۲۰

چکیده

مقدمه: توقف در مرحله دو سلولی از جمله علل وجود ناباروری در گروهی از زوج ها است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر اتانول بر میزان رشد و تکوین جنین‌های دو سلولی متوقف شده موش است.

روش کار: در این مطالعه تجربی موش‌های ماده پس از تحریک تخمک گذاری با موش نر هم‌قفس شدند. موش‌های پلاک مثبت ۴۸ ساعت پس از تزریق گونادوتروپین جفتی انسانی کشته و جنین های دوسلولی آنها در محیط M16 جمع‌آوری و به سه گروه شاهد ۱، شاهد ۲ و آزمایش تقسیم شدند. گروه‌های شاهد ۲ و آزمایش به منظور القاء توقف به مدت ۲۴ ساعت در معرض دمای $۴^{\circ c}$ قرار گرفتند. گروه شاهد ۲ بعد از خروج از دمای فوق به انکوباتور منتقل شد، گروه آزمایش به مدت ۵ دقیقه در معرض اتانول۰/۱ درصد قرار گرفت و گروه شاهد ۱ بدون قرار گرفتن در معرض دمای $۴^{\circ c}$ انکوبه شدند.

نتایج: قرار گرفتن جنین‌ها در معرض دمای $۴^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد به طور معنی‌داری باعث کاهش میزان تکوین و ایجاد تأخیر و توقف آن شد(p=۰/۰۰۱). میانگین تسهیم بین گروه‌ها دارای اختلاف آماری معنی‌داری نبوده ولی اختلاف میانگین درصد جنین‌های دژنره شده بین گروه‌ها با یکدیگر متفاوت بود(p=۰/۰۴۵). میانگین درصد مورولا بین گروه‌ها اختلاف آماری معنی‌دار نشان داد(p=۰/۰۰۵). هم‌چنین آنالیز نتایج بعد از ارزیابی ۱۲۰ ساعته بیانگر این بود که میانگین درصد بلاستوسیست و بلاستوسیست شکوفا شده بین گروه‌ها دارای اختلاف آماری معنی‌داری است. به ترتیب(p=۰/۰۱۴) و (p=۰/۰۰۱).

نتیجه گیری: با تأثیر الکل اتیلیک ۰/۱ درصد بر جنین‌های متوقف شده در مرحله دو سلولی احتمالا می‌توان میانگین درصد مورولا و میزان تکوین تا مرحله بلاستوسیست و بلاستوسیت شکوفا شده را نسبت به گروه شاهد در حد معنی‌داری افزایش داد در حالی که میزان تسهیم نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد.

واژگان کلیدی: اتانول، موش، جنین، ناباروری، تسهیم، بلاستوسیست

*__نویسنده مسئول:__ اراک، سردشت، میدان بسیج، دانشکده پزشکی

Email: m_darabi36@yahoo.com

مقدمه

ناباروری مشکلی است که در سراسر جهان تمامی جوامع با آن روبه رو هستند. این مسئله پیامدهای روانی-اجتماعی زیادی را به دنبال دارد(۱). در راستای حل این مشکل کشورهای مختلف از جمله کشور ما توانسته‌اند با انجام مطالعات مختلف در جهت شناخت علل ناباروری و راه های درمان آن گام‌های موثری بردارند. فعال نشدن تخمک توسط اسپرم(۲، ۳)، کاهش سرعت رشد و تکوین در جنین‌ها و ماندن آنها در یک مرحله از تکوین مانند توقف در مرحله دو سلولی(۴) و... را می‌توان از جمله علل وجود ناباروری در گروهی از زوج‌ها دانست. توقف جنین در مرحله دو سلولی مسئله‌ای است که امروزه بخش وسیعی از مطالعات را به خود اختصاص داده است. از جمله نشان داده شد که اکثر جنین‌های خالص(inbred) و ناخالص (outbred) نژادهای مختلف موش در مرحله دو سلولی دچار توقف در تکوین می‌شوند(۵، ۶). انجام مطالعات بر روی ۵۵ نژاد مختلف موش نشان داد که بین نژادهای مختلف از نظر توقف در مرحله دو سلولی تفاوت قابل ملاحظه ای وجود داشته است. در این میان فاکتورهای - مادری نسبت به پدری از اهمیت بیشتری برخوردار هستند. هم‌چنین مطالعات نشان داده است که میزان تسهیم اولیه بستگی به پروتئین‌ها و mRNA ذخیره شده در اووسیت دارد. توقف سبب یک تغییر موثر و قوی در سنتز پروتئین‌های جنین می‌شود. در طی این مراحل سیگنال‌های درونی مادری که سبب تسهیم می شوند متوقف شده و کنترل رشد به جنین محول می‌گردد، به‌طوری که هنگام شروع توقف جنین‌ها نمی‌توانند نجات پیدا کنند و می‌میرند (۴). از طرفی قرار گرفتن جنین در معرض دماهای پایین را می‌توان از جمله عوامل ایجاد توقف و تأخیر در تکوین دانست.

در مطالعه بختیاری و همکاران تأثیر دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر میزان رشد و لانه گزینی جنین موش بررسی شد. در بخشی از این مطالعه مشخص شد که تقسیم سلولی در جنین‌های دو سلولی در این دما متوقف شده و این جنین-ها پس از خروج از این دما و قرارگیری در دمای مناسب نسبت به گروه کنترل که در این دما قرار نگرفته بودند، سرعت رشد و تکوین کمتری داشتند(۷). در مطالعات گذشته ثابت گردیده است که عموما در آزمایشگاه به علت وجود انواع استرس و بهینه نبودن شرایط میزان مرگ سلولی(Apoptosis) افزایش می‌یابد(۸). هم‌چنین نگه‌داری جنین در دماهای پایین سبب افزایش مرگ سلول‌های جنینی در مقایسه با جنین‌های تازه می‌گردد(۹). بررسی‌ها نشان داده است که قرارگرفتن جنین‌ها در سرما، موجبات آسیب به جنین و فراگمانتاسیون DNA رافرهم می‌آورد(۱۰). در راستای به حداقل رساندن آثار زیانبار مذکور، دانشمندان از روش جدیدی به نام شیشه‌سازی (Vitrification) استفاده کردند. در این روش میزان ایجاد توقف و صدمه به سلول از روش نگه‌داری در سرما (Cryopreservation) به مراتب کمتر است(۱۱). بررسی تحقیقات مشابه نشان داد که اکثریت آنها یا اثر اتانول بر تخمک و فعال‌سازی آن را مورد بررسی قرار داده تا با ایجاد بکرزایی توانایی فعال سازی آن را در مقایسه با سایر روشها (اعم از فیزیکی یا شیمیایی) مقایسه نمایند و یا اثر اتانول و کلسیم یونوفور را بر میزان حفره سازی در مرحله بلاستوسیست مطالعه نموده‌اند که با پژوهش حاضر متفاوت است زیرا در این مطالعه تأثیر اتانول در مرحله دو سلولی مورد آزمایش قرار گرفته است. دانشمندان از راه‌های مختلف سعی دارند تا بر توقف جنین‌ها در مرحله دوسلولی غلبه کنند. از جمله آنها میتوان به انتقال جنین به لوله رحم(۱۲) و افزودن شلاتورهای حاوی فلزات سنگین مانند (Ethylen diamine tetraacetic acid) (EDTA) و سیتوپلاسم جنین‌های هیبرید F1 (گروهی که توانسته‌اند با موفقیت تکوین یابند) به محیط کشت جنین-هایی که در مرحله دو سلولی متوقف شده‌اند، اشاره کرد(۱۳، ۱۴).

امروزه روش‌های متعددی برای فعال نمودن تخمک و جنین مورد بررسی قرار گرفته است که به دو

گروه فیزیکی و شیمیایی تقسیم می‌شوند. فعال‌سازی الکتریکی(۲) نمونه‌ای از روش‌های فیزیکی می‌باشد. از دیگر روش‌های به کار رفته در فرآیند فعال‌سازی تخمک استفاده از ترکیبات شیمیایی مانند اتانول(۱۵، ۱۶)، متانول(۱۷، ۱۸)، کلسیم یونوفور(۱۹) و استرونشیم(۲۰) می‌باشد که با فعال سازی موفق تخمک همراه بوده است. در مطالعه‌ای دیگر گروهی از فاکتورهای رشد توانستند سیستم‌های هدایت سیگنال در سلول را تحت تأثیر قرار دهند. این سیستم‌ها در تنظیم رشد و تمایز دخالت دارند، بنابراین افزودن این فاکتورها به محیط‌های کشت می‌تواند سبب تحریک تکوین گردد. اتانول با ایجاد تغییر در مسیر هدایت سیگنال‌هایی که سرعت جنین‌زایی را کنترل می‌کنند، می‌تواند تکوین جنین-های پیش از مرحله لانه گزینی را تحت تأثیر قرار دهد. این ماده در غلظت‌های بالاتر از ۵ درصد سبب فعال‌سازی تخمک به صورت بکرزایی می‌گردد. علاوه بر اتانول سایر الکل‌ها از جمله بنزیل الکل، پروپاندیول و متانول جزو فعال-کننده‌های پارتنوژنیک هستند. با قرار گرفتن تخمک در معرض اتانول، نفوذپذیری غشای سلولی به کلسیم بالا رفته و موجب افزایش موقتی کلسیم داخل سلولی و فعال‌شدن تخمک خواهد شد. نوساناتی که به طور طبیعی در غلظت کلسیم اتفاق می‌افتد موجب بلوغ تخمک، فعال شدن سلول تخم و در نهایت تنظیم واکنش آکروزومی در اسپرم می‌شود. اتانول با دخالت در کار مولکول‌های پیامبر ثانویه نظیر کلسیم موجب تحریک تکوین جنین‌ها در مرحله‌ی پیش از لانه گزینی و افزایش میزان تکوین می‌گردد(۲۱).

از آنجایی که فعال‌سازی الکتریکی و سایر روش‌های به کارگرفته شده نیازمند استفاده از دستگاه‌های گران قیمت هستند، نیاز به وجود روشی آسان که بتواند هزینه تمام شده درمان بیماران نابارور را کاهش دهد، احساس می‌گردد. بدین منظور این مطالعه با هدف پاسخ به این سوال است که تا چه حد فعال کننده(Activator) اتانول قادر است جنین‌های متوقف شده در مرحله دوسلولی را فعال سازد طراحی و انجام گردید.

روش کار

این مطالعه یک مطالعه تجربی بوده که در آن تعداد ۱۵۰ سر موش نژاد NMRI با سن ۶ تا ۸ هفته از موسسه سرم سازی رازی خریداری و به منظور تطابق با محیط جدید به مدت یک هفته در سالن حیوانات دانشکده پزشکی اراک، در شرایط استاندارد از نظر نور (۱۲ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) و دما (۵ ±۲۱ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری و سپس مورد آزمایش قرار گرفتند(۲۲، ۲۳). به منظور تحریک تخمک‌گذاری موش‌های ماده، به طریق داخل صفاقی مقدار ۱۰ واحد PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin) (Intervet Holland) و ۴۸ ساعت بعد ۱۰ واحد هورمون جفتی انسانی (Human Chorionic Gonadotropin) (HCG) (Organon Holland) تزریق شد. سپس موش‌های ماده با موش‌های نر هم نژاد خود هم قفس شده و صبح روز بعد موش‌های پلاک مثبت تفکیک و در قفس جداگانه‌ای نگهداری شدند(۲۴). موش‌های پلاک مثبت ۴۸ ساعت پس از تزریق HCG با رعایت ملاحظات اخلاقی به روش جابجایی مهره‌های گردنی (Cervical dislocation) کشته شده و لوله رحمی آن‌ها به محیط کشت RPMI 1640,(Gibco) منتقل شدند. جنین‌های دو سلولی به روش شستشوی (Flushing) لوله های رحمی جمع آوری و پس از سه بار شستشو در محیط RPMI، به قطرات ۲۵ میکرولیتری از محیط M16 (Sigma,M-7292) که توسط پارافین مایع پوشیده شده بود منتقل گردیدند. سپس جنین‌ها به سه گروه ۱ و ۲ و ۳ تقسیم‌بندی شدند. جنین‌های گروه ۱ (شاهد ۱) بدون قرار گرفتن در معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ساعت در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. مابقی جنین‌های دوسلولی به منظور القاء توقف (Arrest) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد (یخچال) قرار گرفتند و تعدادی از آنها بعد از خروج از دمای فوق به عنوان گروه شاهد ۲ به انکوباتور

منتقل شدند و بقیه آنها به عنوان گروه ۳ (گروه آزمایش) به مدت ۵ دقیقه در معرض اتانول۰/۱ درصد قرار گرفتند.

کلیه آنالیزهای آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5 انجام شد. پارامترهای رشد و تکوین جنینی با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه محاسبه گردید. داده‌های معنی‌دار با استفاده از آنالیز پست هاک (Post Hoc) مورد ارزیابی دقیق قرار گرفتند و تفاوت بین گروه‌ها محاسبه شد(۲۵).

نتایج

جنین‌های گروه‌های ۲ و ۳ که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند، ۲۴-۱۸ ساعت دیرتر از گروه شاهد ۱ به مرحله بلاستوسیست رسیدند. نتایج حاصل از ارزیابی رشد و تکوین جنین‌های گروه‌های ۱ و ۲ و ۳ در جدول ۱ ارائه شده است.

نتایج مقایسه میانگین تسهیم در ارزیابی ۷۲ ساعته نشان داد که بین گروه‌ها اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد(p=۰/۸۴۴) میانگین درصد جنین‌های دژنره شده در همین زمان بین گروه‌ها متفاوت بود(p=۰/۰۴۵). هم‌چنین میانگین درصد جنین‌های دژنره شده بین گروه ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری داشت(p=۰/۰۳۷) ولی بین گروه ۱ و ۳ و گروه ۲ و ۳ تفات معنی‌داری مشاهده نشد. بررسی‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه بین گروه ۱ و ۲ نشان داد که میانگین مورولا در زمان ۷۲ ساعت و میانگین درصد مورولا بین گروه‌ها اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد. به ترتیب(p=۰/۰۴۷) و(p=۰/۰۰۵) (جدول ۱) اما این اختلاف بین گروه‌های ۲ و ۳ و گروه‌های ۱ و ۳ معنی‌دار نبود. آنالیز نتایج بعد از ارزیابی ۱۲۰ ساعته جنین‌ها نشان داد که میانگین درصد بلاستوسیست‌ها در گروه ۱ و ۲ و ۳ به ترتیب ۵/۹±۷۷/۷ و ۱۰/۹± ۶۱ /۰۶ و ۷ /۲±۷۲/۳ بود که به لحاظ آماری بین سه گروه اختلاف معنی‌داری وجودداشت(p=۰/۰۱۴) ولی این اختلاف به تنهایی بین گروه ۲ و ۳ مشاهده نشد. هم‌چنین نتایج نشان داد که میانگین درصد بلاستوسیست شکوفا شده بین گروه‌ها با یکدیگر متفاوت بود(p=۰/۰۰۱) به گونه‌ای که این اختلاف تنها بین گروه‌های ۱ و ۳ وجود نداشت.

جدول۱. میانگین درصد جنین‌های دژنره، تسهیم، مورولا، بلاستوسیست، بلاستوسیست شکوفا شده بین گروه‌های شاهد (۱ و ۲) و آزمایش (۳)

	۷۲ ساعت			۱۲۰ ساعت		
	دژنره	تسهیم	مورولا	بلاستوسیست	بلاستوسیست شکوفا	جمع
گروه۱	۹±۵/۹ (۹)	۳۱/۷±۱۳/۴ (۲۹)	۵۹/۳±۱۶/۵(۵۴)	۷۷/۷±۵/۹ (۷۱)	۶۰/۲±۶/۵ (۵۵)	۲۳۸
گروه۲	۳۴±۱۴ (۵۱)	۳۴/۶±۱۳/۹ (۴۸)	۳۱/۳±۸/۷ (۴۶)	۶۱±۱۰/۹ (۸۸)	۹±۱۳/۴ (۱۹)	۲۵۲
گروه۳	۲۲/۲±۸ (۱۲)	۳۷/۶±۱۴/۸ (۲۳)	۴۰/۲±۱۲/ (۲۴)	۷۲/۳±۲/۷ (۵۳)	۵۱/۴±۱۶/۴ (۲۹)	۱۴۱
	p=۰/۰۴۵	p=۰/۸۴۴	p=۰/۰۰۵	p=۰/۰۱۴	p=۰/۰۰۱	

عدد داخل پرانتز نشان دهنده تعداد جنین است.

بحث

در مطالعات انجام گرفته از روش کشت آزمایشگاهی به عنوان مدلی مناسب جهت مطالعه‌ی تکوین جنین‌های پیش از مرحله لانه‌گزینی استفاده شد. سرعت رشد جنین‌ها در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با شرایط طبیعی(In vivo) کندتر بود که علت آن را می‌توان به فقدان فاکتورهای رشد و پشتیبانی‌کننده مادری و مواد غذایی مرتبط دانست. این ترکیبات فرآیند جنین‌زایی (Embryogenesis) را تنظیم می‌کنند. در مطالعه بختیاری و همکاران گروهی از جنین‌های دو سلولی موش که در

معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند دچار تأخیر و توقف شده و میزان دژنره شدن آنها نسبت به حالت عادی افزایش یافت هم‌چنین این جنین‌ها پس از انتقال به محیط کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعت پس از گروه کنترل که در معرض این دما قرار نگرفته بودند به مرحله بلاستوسیست رسیدند که این یافته با یافته‌های مطالعه ما مطابقت دارد. امروزه در مورد علت کاهش میزان رشد و تکوین جنین‌ها در صورت نگه‌داری آنها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در زمانهای مختلف بین محققین اختلاف نظر وجود دارد. چنین به نظر می‌رسد که در این دما متابولیسم سلولی در جنین کاهش یافته و ضمن کاهش (یا توقف) سنتز پروتئین‌های جنینی، سیستم انتقال متابولیتی نیز تحت تأثیر قرار میگیرد. احتمالاً در این شرایط پس از مدت کوتاهی عوامل امبریوتروفیک به امبریوتوکسیک تبدیل شده و در نتیجه حساسیت جنین‌ها نسبت به ترکیبات نامطلوب محیط کشت افزایش می‌یابد. از طرفی آثار فقدان ترکیبات ضروری جهت رشد در هر مرحله با گذشت زمان شدت می‌یابد. در این مرحله می‌توان با تغییر ترکیبات محیط کشت و نگه‌داری جنین و افزودن فاکتورهای رشد و تنظیم دقیق سیستم بافرینگ مدت زمان نگه‌داری جنین در این دما و قابلیت‌های آن را ارتقاء داد(۷). با این وصف احتمالا می توان علت افزایش تعداد جنین‌های دژنره در گروه ۲ (شاهد ۲) نسبت به گروه ۱ (شاهد ۱) را قرارگرفتن در معرض دمای۴ درجه سانتی گراد مربوط دانست. از طرفی کاهش درصد جنین های دژنره در گروه ۳ (آزمایش) نسبت به گروه ۲ را می‌توان به تأثیر فعال کنندگی اتانول مرتبط دانست. در مطالعه‌ی روگرس و همکاران از اتانول به منظور فعال‌سازی جنین‌های بکرزایی‌شده در مرحله پیش از لانه گزینی استفاده شد که میزان تسهیم، مورولا و بلاستوسیست به ترتیب ۸۳ درصد و ۷۹ درصد و ۷۲ درصد بود. در حالی که با انجام مطالعه حاضر این مقدار در ارزیابی ۷۲ و ۱۲۰ ساعته به ترتیب ۳۷ درصد و ۴۰ درصد و ۷۲ درصد به دست آمد، که علت افت در میزان تسهیم و مورولا را می‌توان به دژنره شدن تعدادی از جنین‌ها در نتیجه قرارگیری در دمای۴ درجه سانتی‌گراد و کند شدن روند تسهیم در اثر الکل مرتبط دانست. اما در مورد تکوین علیرغم وجود اختلاف غلظت اتانول (۷ درصد) و زمان در معرض قرار گیری جنین‌ها (۷ دقیقه) نتایج وی با نتایج حاصله از مطالعه ما مطابقت داشت. احتمالاً می‌توان علت آن را به حساسیت و آسیب پذیری بیشتر مراحل تکوینی به غلظت‌های بالاتر الکل مرتبط دانست. این در حالی است که صرف نظر از زمان ارزیابی میزان تسهیم و مورولا (۷۲ یا ۱۲۰ ساعت) اختلاف آماری معناداری بین گروه‌ها وجود نداشت(۲۶). لیچ و همکاران با استفاده از سیستم کشت آزمایشگاهی جنین به بررسی تأثیر مستقیم اتانول بر تکوین جنین‌های پیش از لانه گزینی پرداختند. نتایج نشان داد که کشت جنین‌های یک تا دو سلولی به مدت ۲۴ ساعت در محیط حاوی ۱/۶ درصد اتانول، تکوین جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست را با مشکل مواجه می‌سازد(۲۷)، که با نتایج به دست آمده در مطالعه ما به‌دلیل اختلاف در غلظت الکل و زمان در معرض قرار گیری مطابقت ندارد. در مطالعه دیگری نشان داده شد که قرار گرفتن جنین‌های پیش از مرحله لانه گزینی در معرض غلظت‌های بین ۰/۱ درصد تا ۰/۸ درصد اتانول در شرایط آزمایشگاهی در میانگین درصد بلاستوسیست اختلال ایجاد نخواهد کرد(۲۸) که نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر را تأیید می‌نماید. نتایج مطالعه ویبولد نشان داد که غلظت ۰/۱ درصد اتانول میزان پیشرفت جنین‌های دو سلولی موش به مرحله بلاستوسیست را تا ۸۶ درصد افزایش می‌دهد(۲۹) که با نتایج به دست آمده در مطالعه ما اختلاف دارد. این تفاوت را می‌توان به تأثیر دمای پایین بر توانایی تکوینی جنین‌ها نسبت داد.

در پایان پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی تأثیر سایر فعال کننده‌ها بر روی تکوین جنین‌های دو سلولی بررسی و مقایسه شود.

نتیجه‌گیری

با تأثیر الکل اتیلیک ۰/۱ درصد بر جنین‌های متوقف شده در مرحله دو سلولی احتمالا می‌توان میانگین درصد مورولا و میزان تکوین تا مرحله بلاستوسیست و بلاستوسیست شکوفا شده را نسبت به گروه شاهد در حد معنی‌داری افزایش داد، در حالی که میزان تسهیم با تأثیر اتانول بر جنین‌های دوسلولی تغییر معنی‌داری پیدا نمی‌کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم آموزشی- پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک آقای دکتر قاسم مسیبی و مدیر محترم گروه علوم تشریح سرکارخانم دکتر بیات و هم‌چنین از همکاری دانشگاه آزاداسلامی واحد دامغان اعلام می‌دارند. هم‌چنین از آقای بهرام نژادی به علت همکاری‌های بی‌دریغ و تأمین هزینه‌های این طرح کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Vahidi S, Ardalan A, Mohammad K. The study of primary infertility in Islamic Republic of Iran on 2003-2004. Fertility & Sterility 2005; 7(28):243-251.
2. Zang J, Wang CW, Blaszcyzk A, James A. Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Fer and Steril 1999; 72(3): 509-512.
3. Yamano S, Nakagawa K, Nakasaka H, Aono T. Fertilization failure and oocyte activation. J of Med Invest 2000; 47(1,2):1-8.
4. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. 2nd ed. Walligford: CABI. 2003. p.242-261.
5. Biggers JD. Metabolism of mouse embryos. J Reprod Fertil. 1971;14: Suppl 41-54
6. Witten WK, Biggers JD. Complete development in vitro of preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. J Reprod Fertil 1968;17(2):399-401.
7. Bakhtiari M, Eneie s, Hoseini A, Sadeghi Y, Karimipor M. Effect of 4^{oc} on growth and implantation of mouse embryo. Yakhteh 2002;4(15):141-145.
8. Betts DH, King WA. Genetic regulation of embryo death and senescence. Theriogenology 2001; 55(1):171-91.
9. Marquez-Alvarado YC, Galina CS, Castilla B, Leon H, Moreno Mendoza N. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the TUNEL technique. Reprod Domest Anim 2004;39(3):141-5.
10. Rajaei F, Karja NW, Agung B, Wongsrikeao P, Taniguchi M, Murakami M, et al. Analysis of DNA fragmentation of porcine embryos exposed to cryoprotectants. Reprod Domest Anim. 2005;40(5):429-432.
11. Kito S, Noguchi Y, Ohta Y, Ohhata T, Abe M, Shiomi N. Evaluation of developmental competence of vitrified-warmed early cleavage stage embryos and their application for chimeric mouse production. Exp Anim. 2003;52(2):179–183.
12. Whittingham DG, Biggers JD. Fallopian tube and early cleavage in the mouse. Nature 1967; 213(5097): 942-943.
13. Muggleton-Harris A, Whittingham DG, Wilson L. Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse. Nature 1982;299(5882):460-462.
14. Abramczuk J, Solter D, Koprowski H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. Dev Biol 1997;61(2):378-383.
15. Shiina Y, Kaneda M, Matsuyama K, Tanaka K, Hroi M. Role of the extracellular Ca^{2+} on the intracellular Ca^{2+} changes in fertilized and activated mouse oocytes. J Reprod Fertil 1993;97(1):143-150.
16. Ducibella T, Huneau D, Angelichio E, Xu Z, Schultz RM, Kopf GS, Fissore R, Madoux S, Ozil JP, et al. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca^{2+} oscillation number. Dev Biol 2002; 250(2):280-291.
17. Roy Cuthbertson KS, Whittingham DG, Cobbold PH. Free Ca^{2+} increases in exponential

phase during mouse oocyte activation. Nature 1981;294(5843):754-757.
18. Cuthbberston KSR. Partenogenetic activation of mouse oocytes in vitro with Ethanol and Benzyl alcohol. J Exp Zool 1983; 226(2):311-314.
19. Kline D, Kline JT. Repetitve calcium transients and the role of Calcium in exocytosis and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. Dev Biol 1992;149(1):80-89.
20. Walt Y, Christina R. Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic cell nuclear transfer. Zygote 2005; 13(4): 295–302.
21. Stachecki JJ, Yelian FD, Schultz JF, Leach RE, Armant DR. Blastocyst cavitation is accelerated by ethanol or calcium ionophore induced elevation of intracellular calcium. Biol of Reprod 1994; 50(1):1-9.
22. Biggers JD, Summers MC. Impact of hyperglycemia on early embryo development and embryopathy: in vitro experiments using a mouse model, Human Reproduction 2008; 23(9): 2080–85.
23. Fukuhara R, Fujii S, Nakamura R, Yuzawa E, Kimura H, Fukui A, et al. Erythrocytes counteract the negative effects of female ageing on mouse preimplantation embryo development and blastocyst formation. Hum Reprod 2008; 23(9):2080-5.
24. Huzng JC, Wun-WSA, Goldsby JS, Egan K, Fitz Gerald GA, Wu KK. Chen H. Prostacyclin receptor signaling and early embryo development in the mouse. Human Reproduction 2007; 22(11): 2851–2856.
25. Yajun X, Zhaofeng Z, Yong L. Effect of acid and Vitamin B12 on ethanol-induced developmental toxicity in mouse. Toxicology Letters 2006; 167(3):167-172.
26. Rogers NT, Halet G, Piao Y, Carroll J, Ko MS, Swann K. The absence of a Ca^{2+} signal during mouse egg activation can affect partenogenetic preimplantation development, gene expression patterns and blastocyst quality. Reproductioin 2006; 132(1):45-57.
27. Leach RE, Stachecki J, Armant DR. Development of in vitro fertilized mouse embryos exposed to ethanol during the preimplantation period: Accelerated embryos ogenesis at subtoxic levels. Teratology 1993; 47(1): 57-64.
28. Kalmus GW, Buckenmaier CC. Effects of ethanol and acetaldehyde on cultured pre-implantation mouse embryos. Experientia 1989; 45(5):484-487.
29. Wiebold JL, Becker WC. In-vivo and in-vitro effects of ethanol on mouse preimplantation embryos. J Reprod Fertil 1987; 80(1):49-57.

Journal of Arak University of Medical Sciences
Winter 2009; 11(4): 49-66

Original Article

The effect of Ethanol on growth and development of two-cell arrested mouse embryo

Darabi MR[1*], Shiravi AH[2], Nezhadi A[3], Rafiei M[4]

1- Assistant professor, Anatomiest, Anatomy Department, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2 - Assistant professor, Biologist, Biology Department, Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.
3- M.Sc Student of Biotechnology, Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.
4- Assistant professor, Medical Staticstic, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Received 16 Jul, 2008 Accepted 10 Sep, 2008

Abstract

Background: Arresting in certain step of developing like two cell block, could be the reason of infertility in some couples. Evaluate the effect of ethanol on growth and development of mouse two-cell arrested embryo is aimed of this study.

Methods and Materials: In this experimental study 4-6 weeks old female mice were coupled with male mice following superovulation. Positive vaginal plaque mice were killed 48 hour after HCG injection. Two cell embryos were collected in RPMI medium and cultured in M16 medium and divided in three groups. The 2nd and 3rd groups were exposed to 4°C for 24 hour in order to delay and arrest for cleavage and developmental rate. The 2nd group (2nd control) were incubated immediately, while the 3rd group (experiment) were exposed to % 0.1 Ethanole for 5 minutes and the 1st group (1st control) without any exposure to low temperature were incubated.

Results: The developmental rate of embryos exposed to low temperature (4°C) significantly decreased and induce, retardation and arrest (p=0.001). There were not significant difference between the groups mean of cleavage rate, but the mean percent of degenerated embryos between groups have significant differences (p=0.045). The mean percent of morulla were significantly different between groups (p=0.005). The mean percent of blastocyst and hatched blastocyst after 120 hr evaluation have significant differences between others groups (p=0.014) (p=0.001).

Conclusion: Effect of % 0.1 ethyl-alchol on arrested two cell embryos can significantly increase the mean percent of morulla and development of blastocyst and hatching blastocyst stage in compare to control group, without any significant effect on cleavage rate.

Key words: Ethanol, Mouse, Embryoe, Infertility, Cleavage, Blastocyst

*Corresponding author;
Email: m_darabi36@yahoo.com
Address: Anatony Department, Arak University of Medical Sciences, Sardasht, Arak, Iran.