



## تأثیر استروئیسوم بر میزان رشد و تکوین جنین‌های دو سلولی متوقف شده موش سوری

محمد رضا دارابی<sup>۱\*</sup>، پرویندخت بیات<sup>۲</sup>، آذین دخت نژادی<sup>۳</sup>

۱-۲- استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

۳- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات انستیتو پاستور، شعبه اراک

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۶/۳۱

### چکیده

مقدمه: کاهش سرعت رشد و تکوین در جنین‌ها و ماندن آنها در یک مرحله از تکوین مانند توقف در مرحله دو سلولی از دلایل ناباروری در بعضی زوج‌های مراجعه کننده به مراکز باروری و ناباروری است. هدف این مطالعه بررسی میزان تأثیر استروئیسوم بر میزان رشد و تکوین جنین‌های دو سلولی متوقف شده موش نژاد سوری بود.

روش بررسی: موش‌های ماده پس از تحریک تخمک گذاری با موش نر هم‌قفس و موش‌های پلاک مثبت ۴۸ ساعت پس از تزریق HCG به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته و جنین‌های دو سلولی آنها در محیط کشت جمع‌آوری و تعدادی از آنها (گروه ۱ یا شاهد) به منظور کشت در محیط M16 به انکوباتور منتقل شدند. جنین‌های گروه ۲ و ۳ به منظور القاء توقف به مدت ۲۴ ساعت در معرض دمای ۴°C قرار گرفته و گروه ۲ بعد از خروج از دمای فوق به انکوباتور منتقل شد، در حالی که گروه ۳ ابتدا به مدت ۵ دقیقه در معرض استروئیسوم ۱۰ mM قرار گرفت و سپس به انکوباتور منتقل شد.

نتایج: آنالیز نتایج با استفاده از واریانس یکطرفه نشان داد قرار گرفتن جنین‌ها در معرض دمای ۴°C درجه سانتیگراد به‌طور معنی‌داری باعث افزایش میزان جنین‌های دژنره و اختلاف معنی‌دار ( $P=0/006$ ) بین گروه‌ها شد. کاهش میزان تکوین در گروه دو (۳۳/۴۷٪) نسبت به گروه یک (۷۷/۷٪) و کاهش میزان تسهیم (۴۵/۲٪) در مقایسه با گروه یک (۹۰/۹٪)، از نتایج این تحقیق بود. به طوری که با کاربرد استروئیسوم در گروه سه میزان تسهیم دارای اختلاف معنی‌داری با گروه دو نبود ولی میزان تکوین تا ۶۱٪ افزایش یافت ( $P=0/00$ ).

نتیجه‌گیری: میزان تکوین جنین‌های دو سلولی متوقف شده موش با تأثیر استروئیسوم بطور معناداری نسبت به گروه شاهد افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: استروئیسوم، جنین دوسلولی، موش، ناباروری، جنین

\* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۸۶۱-۴۱۷۳۵۰۱-۰۸۶۱، پست الکترونیکی: m.darabi@arakmu.ac.ir

## مقدمه

فاکتورهای بسیاری بر رشد جنین و توقف آن در شرایط آزمایشگاهی اثر دارند. توقف رشد جنینی ممکن است ناشی از یک سری عوامل درونی یا بیرونی باشد. مطالعات نشان داده است که زایگوت‌های بسیاری از نژادهای موش در مرحله دو سلولی متوقف می‌شوند که مکانیسم آن به درستی شناخته نشده است. گرچه بطور طبیعی توقف از طرف مادری کنترل می‌شود، اما در صورت بروز می‌توان با تزریق سیتوپلاسم نژادهای متوقف نشونده بر این توقف فائق آمد (۱). امروزه به منظور به حداقل رساندن تأثیر عوامل بالقوه بیرونی بر ایجاد توقف رشد جنینی تلاش‌های فراوانی شده است. از جمله عوامل بیرونی می‌توان از ترکیب محیط کشت و متابولیت‌های اکسیداتیو نام برد. برخی فاکتورهای درونی که می‌توانند به توقف منجر شوند شامل ژن‌ها، فاکتورهای سیتوپلاسمی و بازسازی کروموزوم می‌باشند (۲). توقف جنین ممکن است یکی از چندین مکانیسمی باشد که از تکوین بیشتر جنین‌های دارای کروموزوم ابنورمال و یا ژنوم غیرفعال جلوگیری می‌کند (۳). از طرفی رشد غیر طبیعی جنین از علل اصلی نقص در لانه‌گزینی و کاهش میزان لقاح و ناباروری در پستانداران به شمار می‌آید. تاکنون ژن‌های زیادی شناخته شده‌اند که برای گذر از یک مرحله از رشد جنینی به مرحله دیگر ضروری می‌باشند. همچنین نشان داده شد که با تزریق مستقیم اووپلاسم از یک تخمک سالم به جنین متوقف شده در مرحله دو سلولی می‌توان از این مرحله نیز گذر کرد (۴).

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 نمونه‌ای از روش‌های فیزیکی می‌باشد (۵). از دیگر روش‌های به کار رفته در فرآیند فعال‌سازی که بر روی تخمک بررسی شده است استفاده از ترکیبات شیمیایی مانند اتانول (۶،۷)، متانول (۸،۹) و کلسیم یونوفور (۱۰) و استروئیدیوم (۱۱) می‌باشد. در حال حاضر به منظور تحریک و فعال‌سازی تخمک‌ها به پارتنوژنز و ارتقاء توان تکوینی آنها استفاده از استروئیدیوم رایج می‌باشد.

استروئیدیوم عضوی از خانواده فلزات معدنی است که به علت واکنش بالای آن نمی‌توان آنرا بصورت آزاد در طبیعت یافت و فقط بصورت ترکیب با عناصر دیگر یافت می‌شود. یکی از اشکال مختلف آن استروئیدیوم کلراید است که به دلیل داشتن دو اتم الکترون در پوسته خارجی خود دارای انرژی یونیزان پایین بوده و به راحتی یک الکترون از هر اتم کلر خود از دست می‌دهد. علیرغم آنکه مدت طولانی از کاربرد استروئیدیوم بعنوان فعال‌کننده تخمک‌ها می‌گذرد اما هنوز مکانیسم ملکولی دقیق آن شناخته نشده است. مطالعات اخیر نشان داده است که استروئیدیوم می‌تواند به روش آدنیلیل سیکلاز موجب آزادسازی کلسیم و فعال‌سازی شود (۱۲).

اکثر محققین بر این باورند که استروئیدیوم در مقایسه با سایر فعال‌کننده‌ها از توان بیشتری جهت القاء فعال‌سازی پارتنوژنیک تخمک‌ها برخوردار بوده و موجب افزایش یکباره  $Ca^{++}$  داخل سلولی، نوسانات کلسیمی و نهایتاً فعال‌سازی می‌گردد. همچنین مشخص شده است که انکوبه نمودن تخمک در محیط کشت حاوی  $10\text{mM}$  استروئیدیوم می‌تواند بطور موثری سبب تحریک آن شده و در بیش از ۹۰٪ تخمک‌ها دومین گویچه قطبی و پیش هسته را تشکیل دهد (۱۳).

در مطالعه Bakhtiari و همکاران تأثیر دمای  $4^{\circ}\text{C}$  بر میزان رشد و لانه‌گزینی 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 جنین‌ها 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 (۱۴). در مطالعات قبلی ثابت شده است که عموماً در آزمایشگاه به علت وجود انواع استرس و بهینه نبودن شرایط کشت، میزان مرگ سلولی (Apoptosis) افزایش می‌یابد (۱۵). همچنین نگهداری جنین در دماهای پایین به واسطه آسیب به جنین و فراگمانتاسیون DNA سبب افزایش مرگ و میر سلول‌های جنینی در مقایسه با جنین‌های تازه می‌گردد (۱۶). لذا قرار گرفتن جنین در معرض دماهای پایین را می‌توان از

ملاحظات اخلاقی به روش جابجایی مهره‌های گردنی (Cervical dislocation) کشته شده و اوبدکت‌های آنها به محیط کشت (Gibco), RPMI 1640 منتقل شدند.

جنین‌های دو سلولی به روش شستشوی (Flushing) اوبدکت جمع‌آوری و پس از سه بار شستشو، به قطرات  $25 \mu\text{l}$  از محیط M16 (Sigma, M-7292) که توسط پارافین مایع پوشیده شده بود منتقل شدند. نهایتاً از حدود ۳۲۷ جنین دوسلولی، حدود یک سوم طی ۳ الی ۵ تکرار به هر یک از گروه‌های سه گانه اختصاص یافت. جنین‌های گروه ۱ (شاهد ۱) بدون قرار گرفتن در معرض دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای  $38^{\circ}\text{C}$  انکوبه شدند. جنین‌های گروه ۲ (شاهد ۲) و ۳ (آزمایش) به منظور القاء توقف به مدت ۲۴ ساعت در معرض دمای  $4^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند. جنین‌های گروه ۲ بعد از خروج از دمای فوق به انکوباتور منتقل شدند و گروه ۳ به مدت ۵ دقیقه در معرض استرونیسیوم  $10 \text{ mM}$  قرار گرفتند (۱۳) و بعد از ۳ بار شستشو در قطرات محیط M16 به انکوباتور منتقل شدند. لازم به ذکر است که تعداد جنین‌های دو سلولی در هر گروه بین ۱۵-۱۰ عدد بود و هر آزمایش بین ۵ - ۳ مرتبه تکرار شد.

#### روش ارزیابی جنین‌ها:

در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از کشت، جنین‌های هر یک از گروه‌ها توسط استریومیکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت و تعداد جنین‌های دژنره، میزان کلیواژ، مورولا و بلاستوسیست ثبت شد. در مرحله بعد ۷۲ ساعت پس از کشت میزان تسهیم و بلاستوسیست‌های اولیه مورد ارزیابی قرار گرفت. در زمان ۱۲۰ ساعت پس از لقاح نیز میزان جنین‌های شکوفا شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

کلیه آنالیزهای آماری این مطالعه با استفاده از ویرایش ۱۱/۵ نرم افزار SPSS 11.5 انجام شد و پارامترهای رشد و تکوین جنینی با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه محاسبه گردید. داده‌های معنادار با استفاده از آنالیز Post Hoc مورد ارزیابی دقیق قرار گرفتند تا تفاوت بین گروه‌ها محاسبه شود. سطح معناداری گفته شود.

جمله عوامل ایجاد توقف و تأخیر در تکوین دانست.

از آنجا که علت عدم موفقیت درمان در بعضی زوج‌های مراجعه کننده به مراکز باروری و ناباروری توقف جنین‌های آنها در مرحله دو سلولی است، هدف این مطالعه آن است که با تحریک شیمیایی جنین‌های دو سلولی متوقف شده و باز مانده از تکوین به واسطه قرار گرفتن در معرض دمای  $4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد، میزان رشد و تکوین آنها را با گروه‌های شاهد مقایسه نموده و راهی ایمن، آسان و ارزان برای بالا بردن میزان کلیواژ و سرعت تکوین بیابیم. همچنین قصد داریم به این سوال پاسخ دهیم که آیا فعال کننده استرونیسیوم (Activator) قادر است در حد معنی‌داری، جنین‌های متوقف شده در این مرحله را فعال سازد یا خیر؟ در نهایت همچنین می‌توان در صورت معنی‌دار بودن نتایج و انجام مطالعات تکمیلی یافته‌های حاصل را به انسان تعمیم داد و در مراکز باروری و ناباروری و معالجه زوج‌های نابارور از آن استفاده نمود.

#### روش بررسی

این مطالعه یک مطالعه تجربی بوده که در آن تعداد ۱۵۰ سر موش نژاد سوری با سن ۶ تا ۸ هفته حضور داشتند، این موش‌ها در طی ۳ مرحله ۵۰ تایی از موسسه سرم سازی رازی خریداری شدند که از این تعداد ۵۰ سر نر و ۱۰۰ سر ماده بوده است به منظور تطابق با محیط جدید موش‌ها به مدت یک هفته در سالن حیوانات دانشکده پزشکی اراک در شرایط استاندارد از نظر نور (۱۲ ساعت روشنایی از ساعت ۸ صبح تا ۸ شب و  $12^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) و دما ( $21 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) نگهداری شدند و سپس مورد آزمایش قرار گرفتند (۱۷، ۱۸).

به منظور تحریک تخمک گذاری موش‌های ماده، به طریق داخل صفاقی مقدار  $10 \text{ IU}$ ، PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) و  $48 \text{ IU}$  (Intervet Holland) و  $10 \text{ IU}$  (Organon Holland) HCG (Human Chorionic Gonadotropin) تزریق شد. سپس ۲ موش ماده با یک موش نر هم قفس شده و صبح روز بعد موش‌های پلاک مثبت تفکیک و در قفس جداگانه‌ای نگهداری شدند (۱۹).

موش‌های پلاک مثبت ۴۸ ساعت پس از تزریق HCG با رعایت

## نتایج

نتایج این مطالعه نشان داد قرار گرفتن جنین‌ها در دمای پایین میزان جنین‌های دژنره را افزایش داده و اثر بازدارنده بر میزان تسهیم و تکوین جنین‌ها دارد، بطوریکه میزان تکوین جنین‌ها بین دو گروه ۱ و ۲ دارای اختلاف آماری معناداری نسبت به هم بود. جنین‌ها در گروه‌های ۲ و ۳ نیز دیرتر از جنین‌های گروه ۱ به مرحله بلاستوسیست رسیدند. نتایج حاصل از ارزیابی جنین‌ها، ۷۲ ساعت پس از لقاح در گروه‌های سه‌گانه به شرح زیر است:

بر اساس یافته‌های این مطالعه میانگین درصد جنین‌های دژنره شده بین گروه‌ها دارای اختلاف آماری معنادار می‌باشد ( $P=0/024$ )، همچنین از نظر میانگین درصد جنین‌های دژنره شده بین گروه ۱ و ۲ اختلاف معناداری وجود داشت ( $P=0/032$ )، ولی بین گروه ۱ و ۳ و گروه ۲ و ۳ اختلاف معنادار مشاهده نشد. جزئیات بیشتر در جدول ۱ ارائه شده است.

نتایج مقایسه میانگین تسهیم در ارزیابی ۷۲ ساعته نشان داد که بین گروه ۱ از یک سو و گروه‌های ۲ و ۳ از سوی دیگر

اختلاف آماری معناداری وجود دارد ( $P=0/007$ ) این مقایسه بین گروه ۲ و ۳ نیز نشان دهنده وجود اختلاف معنادار ( $P=0/044$ ) بین آنهاست. میانگین درصد تسهیم بین گروه‌ها با استفاده از آزمون Kruskal-wallis نیز نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنادار بین آنها می‌باشد ( $P=0/005$ ). جزئیات بیشتر در جدول ۱ ارائه شده است.

بررسی‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه نتایج بعد از ارزیابی ۱۲۰ ساعته جنین‌ها نشان داد میانگین درصد بلاستوسیست‌ها در گروه ۱ و ۲ و ۳ به ترتیب  $77/7 \pm 5/9$  و  $61 \pm 10/9$  و  $33/4 \pm 9$  می‌باشد که از این لحاظ بین سه گروه اختلاف آماری معناداری وجود دارد ( $P=0/000$ ) و این اختلاف بین گروه‌های ۱ با ۲ و ۱ با ۳ و ۲ با ۳ معنادار است ( $P=0/019$ ).

همچنین نتایج نشان داد که از نظر میانگین درصد بلاستوسیست شکوفا شده بین گروه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد ( $P=0/000$ ). اما این اختلاف فقط بین گروه‌های ۱ و ۲ معنادار است.

جدول ۱: میانگین درصد دژنره شدن و کلیوژ جنین‌ها در گروه‌های شاهد (۱ و ۲) و آزمایش (۳) در طی ارزیابی ۷۲ ساعت پس از لقاح

گروه	دژنره	تسهیم	جمع کل
گروه ۱	۹ ± ۵/۹ (۹) *	۹۰/۹۹ ± ۵/۹ (۲۹)	۳۸
گروه ۲	۳۴ ± ۱۴ (۵۱) *	۴۵/۵ ± ۱۴/۳ (۴۸)	۹۹
گروه ۳	۲۵ ± ۱۰ (۱۲)	۴۵/۲ ± ۱۳ (۲۳)	۳۵

- عدد داخل پرانتز تعداد جنین در هر گروه را نشان می‌دهد و مواردی که با ستاره مشخص شده اختلاف آن با گروه‌های دیگر معنی‌دار است.

جدول ۲: میانگین درصد جنین‌های مرحله بلاستوسیست و بلاستوسیست شکوفا شده در گروه‌های شاهد (۱ و ۲) و آزمایش (۳) در طی ارزیابی ۱۲۰ ساعته پس از لقاح

گروه	بلاستوسیست	بلاستوسیست شکوفا	جمع کل
گروه ۱	۷۷/۷ ± ۵/۹ (۷۱) *	۶۰/۲ ± ۶/۵ (۵۵)	۷۱
گروه ۲	۳۳/۴۷ ± ۹ (۸۹) *	۱۳/۴ ± ۳ (۱۹) *	۸۹
گروه ۳	۶۱ ± ۱۰/۹ (۲۸) *	۱۹/۴ ± ۱۷ (۱۴)	۲۸

- عدد داخل پرانتز تعداد جنین در هر گروه را نشان می‌دهد و مواردی که با ستاره مشخص شده اختلاف آن با گروه‌های دیگر معنی‌دار است.

## بحث

نمود، البته این روش به مراتب ساده‌تر از انجام داده بطوریکه میزان زیست‌پذیری را می‌توان با افزودن سوکروز به محیط

مطالعات نشان داده است که می‌توان برای مدت محدود جنین‌های مرحله مورولا را در دماهای بالای صفر درجه ذخیره

شده در محیط متوقف‌کننده نیز قادرند بطور طبیعی پروتئین سایکلین B1 را سنتز نمایند. به علاوه در جنین‌های دوسلولی متوقف شده موش، سایکلین B1 در سیتوپلاسم تجمع یافته که فعال نمودن Cdc2 کیناز موجب القاء تجمع هسته‌ای آن در همین جنین‌ها (در صورت کشت شدن در محیط غیر متوقف کننده) و نیز جنین‌های متوقف شده دو سلولی که در محیط حاوی اسید اکادئیک (متوقف کننده) کشت شده‌اند می‌گردد. به عبارتی انتقال هسته‌ای سایکلین B1 اهمیت زیادی در گذر از G2 به M داشته و Cdc2 کیناز استقرار سلولی سایکلین B1 را کنترل می‌کند. احتمالاً در مطالعه حاضر نیز روند توقف جنین‌های دوسلولی از روند فوق تبعیت نموده و استرونیوم نیز قادر است در فعال نمودن Cdc2 کیناز ایفای نقش نماید (۲۳).

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 (۱۴). در این خصوص علت افزایش تعداد جنین‌های دژنره در گروه ۲ و ۳ (آزمایش) نسبت به گروه ۱ را می‌توان به قرارگرفتن در معرض دمای ۴°C، مربوط دانست.

در مطالعه دیگری Liu و همکاران میزان فعال‌سازی، تکوین و آپوپتوز حاصل از استرونیوم و سایر فعال‌کننده‌ها در جنین‌های موش را با هم مقایسه نمودند، ایشان نتیجه گرفتند با اثر استرونیوم نوسانات افزایش داخل سلولی کلسیم بر خلاف سایر فعال‌کننده‌ها (یکبار) بطور متوالی و مکرر ایجاد می‌شود که این شبیه آن چیزی است که با ورود اسپرم به تخمک اتفاق می‌افتد (۲۴). این موضوع را می‌توان به افزایش توانایی جنین‌های دو سلولی متوقف شده متعاقب کاربرد محیط کشت حاوی استرونیوم در این مطالعه مرتبط دانست.

در مطالعه Krivokharchenko و همکاران از استرونیوم با غلظت ۲ mM به مدت دو ساعت به منظور فعال‌سازی جنین‌های پارتنوژنیک در مرحله پیش از لانه‌گزینی استفاده

نگهداری جنین‌ها ارتقا داد (۲۰). در مطالعه حاضر از روش کشت آزمایشگاهی به عنوان مدلی مناسب جهت مطالعه تکوین جنین‌های پیش از مرحله لانه‌گزینی استفاده شد. یقیناً سرعت رشد جنین‌ها در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با شرایط طبیعی (In vivo) کندتر است، که علت آن را می‌توان به فقدان فاکتورهای رشد و پشتیبانی‌کننده مادری و مواد غذایی مربوط دانست. این ترکیبات فرآیند جنین‌زایی (Embryogenesis) را تنظیم و پشتیبانی می‌کنند. تاکنون مطالعات زیادی در مورد فاکتورها و مکمل‌های محیط کشت صورت گرفته است که نهایتاً منجر به ارتقاء کیفیت محیط کشت شده است.

در مطالعه Bakhtiari و همکاران جنین‌های دو سلولی موش که در معرض دمای ۴°C قرار گرفتند دچار تأخیر و توقف در رشد 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 حاضر مطابقت دارد (۱۴). امروزه در مورد علت کاهش میزان رشد و تکوین جنین‌ها در صورت نگهداری آنها در دمای ۴°C 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 (۲۱).

مطالعه Zhang و همکاران برای اولین بار نشان داد که استرونیوم قادر است به واسطه رسپتورهای InsP3 موجب راه-اندازی نوسانات کلسیمی در تخمک‌ها و جنین‌های اولیه شده، بطوریکه در جنین‌های یک سلولی تأثیرات آن وابسته به سیکل سلولی بوده و نیازمند فعال‌سازی فسفولیپاز C و عمل سینرژستی InsP3 می‌باشد (۲۲).

مطالعه Ohashi و همکاران نشان داد جنین‌های موش کشت

در مطالعات نشان داده شده است که اثر استرانشیوم بر میزان تکوین به گونه حیوانی وابسته است (۲۷).

در مطالعه دیگری که در آن اثر غلظت‌های متفاوت استرانشیوم بر فعال سازی تخمک موش مورد مطالعه قرار گرفت نشان داده شد که بیشترین میزان بلاستوسیست (۴۴٪) مربوط به تخمک‌هایی است که به مدت ۳ ساعت در معرض استروئیدیوم با غلظت ۱۰mM قرار داشته‌اند (۲۸) که علت تفاوت آن با نتایج مطالعه حاضر را می‌توان به اختلاف در غلظت و مرحله‌ای که تحت تأثیر استرانشیوم قرار می‌گیرد، نسبت داد.

در پایان پیشنهاد می‌شود که در مطالعات مشابه به بررسی جنبه‌های مولکولی این مطالعه و همچنین تأثیر غلظت‌های مختلف استرانشیوم بر فعال‌سازی جنین‌های دوسلولی متوقف شده مورد بررسی قرار گیرد و به ابنورمالیتی‌های کروموزومی و جنینی حاصل از آن پرداخته شود.

شد که ۱۴-۱۲ ساعت پس تزریق HCG میزان درصد تسهیم ۹۳٪ و در مطالعه حاضر ۱۳±۴۵٪ بود، که علت می‌تواند تفاوت در پارتنوژنیک بودن و نبودن جنین‌ها بین دو مطالعه و نیز تفاوت در غلظت استروئیدیوم بکار رفته بین دو مطالعه و نیز توقف اعمال شده بر روی جنین‌های دو سلولی در مطالعه حاضر باشد (۲۵).

در مطالعه دیگری Yamazaki و همکاران با استفاده از کشت آزمایشگاهی جنین به بررسی تأثیر ۲۰mM استرانشیوم بر تکوین جنین‌های انتقال هسته شده گاو پرداختند و نتیجه گرفتند میزان تسهیم ۴۲/۹٪ بود که ۱۲/۶٪ آنها به مرحله بلاستوسیست رسیدند، که نتایج وی با مطالعه حاضر از نظر تسهیم یکسان ولی از نظر بلاستوسیست اختلاف دارد که احتمالاً معلول تاثیر مانیپولاسیون‌ها و استرس‌های وارده در طی روند انتقال هسته و مراحل نهایی تکوین و اختلاف در نوع حیوان بکار رفته جهت آزمایش می‌باشد (۲۶) و یا به دلیل تفاوت در نوع حیوان آزمایشگاهی بین دو مطالعه می‌باشد، زیرا

#### منابع:

- 1- Downs SM, Dow MP. *Hypoxanthine-maintained two-Cell block in mouse embryos: dependence on glucose and effect of hypoxanthine phosphoribosyltransferase inhibitors*. Biol Reprod 1991; 44(6): 1025-39.
- 2- Sharan SK, Pyle A, Coppola V, Babus J, Swaminathan S, Benedict J, et al. *BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility*. Development 2004; 131(1): 131-42.
- 3- Betts DH, Madan P. *Permanent embryo arrest: Molecular and Cellular concepts*. Molecular Human Reproduction 2008; 14(8): 445-53.
- 4- Levy R, Elder K, Menezo Y. *Cytoplasmic transfer in oocytes: biochemical aspects*. Human Reprod Updates 2004; 10(3): 241-50.
- 5- Zhang J, Wang CW, Blaszczyk A, Grifo JA, Ozil J, Haberman E, et al. *Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilize after intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril 1999; 72(3): 509-12.
- 6- Shiina Y, Kaneda M, Matsuyama K, Tanaka K, Hroi M. *Role of the extraCellular Ca<sup>2+</sup> on the intraCellular Ca<sup>2+</sup> changes in fertilized and activated mouse oocytes*. J Reprod Fertil 1993; 97(1): 143-50.
- 7- Ducibella T, Huneau D, Angelichio E, Xu Z, Schult Z, Kopf GS, et al. *Egg-to-embryo transition is driven by*

- differential responses to Ca<sup>2+</sup> oscillation number*. Dev Biol 2002; 250(2): 280-91.
- 8- Roy Cuthbertson KS, Whittingham DG, Cobbold PH. *Free Ca<sup>2+</sup> increases in exponential phase during mouse oocyte activation*. Nature 1981; 294(5843): 754-57.
- 9- Cuthbberston KSR. *Parthenogenetic activation of mouse oocytes in vitro with Ethanol and Benzyl alcohol*. J Exp Zool 1983; 226(2): 311-14.
- 10- Kline D, Kline JT. *Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and Celll cycle activation in the mouse egg*. Dev Biol 1992; 149(1): 80-9.
- 11- Walt Y, Christina R. *Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic Celll nuclear transfer*. Zygote 2005; 13(4): 295-302.
- 12- Kishigami S, Wakayama T. *Efficient strontium-induced activation of mouse oocytes in standard culture media by chelating calcium*. Reprod Dev 2007; 53(6): 1207-15.
- 13- Yoshimizu T, Obata Y, Carrol J, Kono T. *Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium*. J Mamm Ova Res 1998; (15): 146-52.
- 14- Bakhtiari M, Eneie S, Hoseini A, Sadeghi Y, Karimipor M. *Effect of 4°C on growth and implantation of mouse embryo*. Yakhteh 2002; 4(15): 141-45.[Persian]
- 15- Betts DH, King WA. *Genetic regulation of embryo death and senescence*. Theriogenology 2001; 55(1): 171-91.
- 16- 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.
- 17- 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.
- 18- 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.
- 19- Huang JC, Wun WS, Goldsby JS, Egan K, FitzGerald GA, Wu KK. *Prostacyclin receptor signaling and early embryo development in the mouse*. Human Reproduction 2007; 22(11): 2851-6.
- 20- Kasai M, Niwa K, Iritani A. *Protective effect of sucrose on the survival of mouse and rat embryos stored at 0 degree C*. Reprod Fertil 1983; 68(2): 377-80.
- 21- Nakamura K, Tsunoda Y. *Viability of nuclei of two-Celll mouse embryos stored at 4 degrees C and fused with blastomeres of fresh two-Celll embryos*. Cryobiology 1992; 29(4): 493-9.
- 22- Zhang D, Pan L, Yang LH, He XK, Huang XY, Sun FZ. *Strontium promotes calcium oscillations in mouse meiotic oocytes and early embryos through InsP3 receptors, and requires activation of phospholipase and the synergistic action of InsP3*. Hum Reprod 2005; 20(11): 3053-61.

- 23- Ohashi A, Minami N, Imai H. *Nuclear accumulation of cyclin B1 in mouse two-Cell embryos is controlled by the activation of Cdc2*. Biol Reprod 2001; 65(4): 1195-200.
- 24- Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL. *Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos*. Biol Reprod 2002; 66(1): 204-10.
- 25- Krivokharchenko A, Popova E, Zaitseva I, Vil'ianovich L, Ganten D, Bader M. *Development of parthenogenetic rat embryos*. Biol Reprod 2003; 68(3): 829-36.
- 26- Yamazaki W, Ferreira CR, Méo SC, Leal CL, Meirelles FV, Garcia JM. *Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic Cell nuclear transfer*. Zygote 2005; 13(4): 295-302.
- 27- Tateno H, Kamiguchi Y. *How long do parthenogenetically activated mouse oocytes maintain the ability to accept sperm nuclei as a genetic partner?* J Asisted Reproduction and Genetics 2005; 22(2): 89-93.
- 28- Loren J, Lacham-Kaplan O. *The employment of strontium to activate mouse oocytes: effects on spermatid-injection outcome*. Reproduction 2006; 131(2): 259-67.



## *The Effect of Strontium on Growth and Development of Arrested Two-Cell NMRI Mouse Embryos*

*Darabi MR(PhD)<sup>\*1</sup>, Bayat P(PhD)<sup>2</sup>, Nezhadi A(MSc)<sup>3</sup>*

<sup>1,2</sup>*Department of Anatomy, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*

<sup>3</sup>*Department of Biology, Research Center of Razi Institute, Arak Branch, Arak, Iran*

**Received:** 22 Sep 2010

**Accepted:** 3 Mar 2011

### **Abstract**

**Introduction:** Decrease in the rate of the growth and development embryos and their arrest in a certain developmental step e.g. two- Cell block, could be the reason of infertility in some couples referring to fertility and infertility center. The aim of this study is the evaluation of the effect of strontium on growth and development of two-Cell arrested NMRI mouse embryos.

**Methods:** Following superovulation, female mice were coupled with males and mice with positive vaginal plaque were killed 48 hours after HCG injection by cervical dislocation. Subsequently, two-Cell embryos were collected in RPMI(Roswell Park Memorial Institute) and were divided into 3 groups. The 1st group (control) were washed and incubated without any exposure in order to be cultured in M16 medium. The 2nd and 3rd groups were exposed to 4°C temperature for 24 hours. The 2nd group was incubated immediately, while the 3rd group was exposed to 10 mM strontium for 5 minutes before incubation.

**Results:** The data analysis by one-way Anova showed that exposure to 4°C temperature caused a significant increase in degenerated embryos and a significant difference between groups(P=0.006). Our results showed that the mean percent of blastocyst formation(33.4%) and cleavage rate(45.2%) was decreased in 2nd group in comparison to 1st group(%77.7 versus 90.9%). Use of strontium in 3rd group didn't have any effect on the cleavage rate(45.2% versus 45.5% in 3<sup>rd</sup> and 2<sup>nd</sup> groups, respectively), while the blastocyst formation rate was significantly increased in 3<sup>rd</sup> group(61%) comparing 2nd group(P=0.019).

**Conclusion:** Developmental rate of arrested two-Cell mice embryos was significantly increased by strontium.

**Keywords:** Strontium, Embryonic Structures; Embryonic Development; Mice; Infertility

**This paper should be cited as:**

Darabi MR, Bayat P, Nezhadi A. *The effect of strontium on growth and development of arrested two-Cell nmri mouse embryos*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 19(4):463-71.

**\*Corresponding author: Tel: +98 861 4173501, Email: m.darabi@arakmu.ac.ir**