

## تاثیر فسفودی استراز یک بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش NMRI

سیمین محمدی گرجی

مری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری

## چکیده

**سابقه و هدف:** هدف از این تحقیق بررسی تاثیر فسفودی استراز یک بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش نژاد NMRI بود. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، تخمک‌های نارس موش ۶-۴ هفته‌ای نژاد NMRI جدا شدند و در یک گروه کنترل و ۱۰ گروه آزمایشی طبقه‌بندی شدند. تخمک‌های گروه کنترل در محیط MEM- $\alpha$  حاوی FCS ۵ درصد، ۱۰۰ میلی‌واحد بر میلی‌لیتر FSH ۷/۵ واحد بر میلی‌لیتر hCG و گروه‌های آزمایشی در محیط ذکر شده به همراه غلظت‌های متفاوت از فسفودی استراز قرار داده شدند. تخمک‌های هر گروه به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO<sub>2</sub> ۵ درصد قرار گرفتند و سپس با میکروسکوپ معکوس مراحل بلوغ آزمایشگاهی در تمام گروه‌ها بررسی شد. تخمک‌های بدون تغییر شکل در هسته به عنوان تخمک‌های GV یا نارس و تخمک‌های با هسته شکسته شده به عنوان GVBD با نشانه شروع میوز و تخمک‌های دارای جسم قطبی با عنوان تخمک‌های بالغ یا MII شناسایی شدند.

**یافته‌ها:** درصد تخمک‌هایی که در مرحله GV باقی ماندند، در گروه کنترل، گروه اول (۸۰ nIu/ $\mu$ u) و گروه هشتم (۰/۵ nIu/ $\mu$ u) به ترتیب ۱۸/۵، ۳۲/۵ و ۷/۵ درصد بود (۰/۱ < p). درصد تخمک‌هایی که به مرحله متافاز ۲ رسیدند در گروه آزمون یک و هشت به ترتیب ۱۰ و ۷۷ درصد بود که نسبت به گروه کنترل (۶۰/۷ درصد) اختلاف معنی‌داری را نشان داد (۰/۱ < p).

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که فسفودی استراز یک نوع ۴ میزان بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش نژاد NMRI را افزایش می‌دهد و دوز ۰/۵ nIu/ $\mu$ u بهترین دوز بود.

**واژگان کلیدی:** بلوغ آزمایشگاهی، تخمک نارس، موش، فسفودی استراز.

## مقدمه

این مسئله به خوبی مشخص شده است که cAMP (آدنوزین مونوفسفات حلقوی) نقش مهمی در تنظیم بلوغ تخمک‌های پستانداران بازی می‌کند (۲،۱). مقدار کل cAMP درون تخمک بستگی به میزان ساخت آن توسط آدنیلات سیکلاز (AC) و میزان تجزیه آن توسط فسفودی استراز (PDE) دارد (۳). استفاده از مهارکننده‌های غیراختصاصی فسفودی استراز مانند 3-Isobutyl-1-Imetyle-xanthine و تتوفیلین باعث بلوک میوز خودبه

خودی در تخمک می‌شود. این مساله نشان می‌دهد که فسفودی استراز در تنظیم بلوغ تخمک دخالت دارد (۴). در طول بلوغ القاء شده به وسیله LH در آزمایشگاه افزایشی در فعالیت PDE مشاهده می‌شود و مشخص می‌کند که این یک مسیر عمومی برای شروع میوز در تخمک است (۵). حداقل ۱۱ خانواده متفاوت از فسفودی استراز وجود دارد (۶). فسفودی استرازها دارای یک زیر واحد کاتالیتیکی هستند که این زیر واحد بین PDE‌های همان خانواده مشترک است و زیر واحدهای دیگر نقش تنظیمی دارند (۷). همان طور که ذکر شد میوز خود به خودی به وسیله مهارکننده‌های غیراختصاصی PDEs بلوک خواهد شد. اما مهارکننده اختصاصی PDE3 به طور قابل ملاحظه‌ای قوی‌تر است (۵). مشخص شده است که PDE3A قبل از

آدرس نویسنده مسئول: ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، سیمین محمدی گرجی

(email: simmohamady@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۳/۱۸

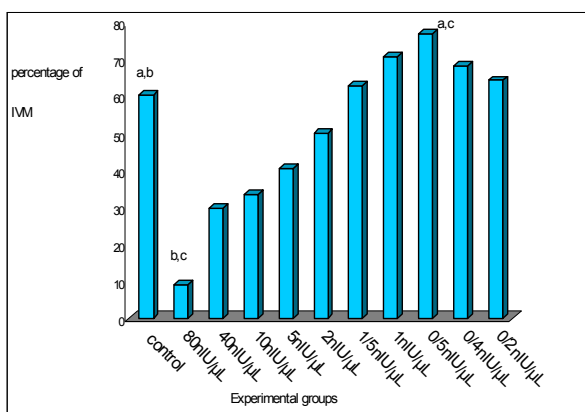
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۸/۱۷

- گروه ۸: تعداد ۱۳۰ تخمک، دوز فسفودی استراز ۰/۵ nIU/μL
  - گروه ۹: تعداد ۱۳۰ تخمک، دوز فسفودی استراز ۰/۴ nIU/μL
  - گروه ۱۰: تعداد ۱۳۰ تخمک، دوز فسفودی استراز ۰/۲ nIU/μL
- تخمک‌های هر گروه به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO<sub>2</sub> قرار داده شدند و سپس با میکروسکوپ معکوس مراحل بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز در تمام گروه‌ها بررسی شد. تخمک‌های بدون تغییر شکل در هسته به عنوان تخمک‌های GV یا نارس و تخمک‌های با هسته شکسته شده به عنوان GVBD (Germinal vesicle break down) باناشانه شروع میوز و تخمک‌های دارای جسم قطبی با عنوان (Metaphase II) MII شناسایی شدند.

تفاوت آماری بین گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با فسفودی استراز یک به وسیله آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی بررسی شد.

### یافته‌ها

همانطور که در جدول و نمودار ۱ نشان داده شده است، نسبت تخمک‌هایی که در مرحله GV باقی ماندند، در گروه کنترل ۱۸/۵ درصد و در گروه‌های آزمایشی در گروه هشت (۰/۵ nIU/μL) کمترین مقدار و در گروه یک (۸۰ nIU/μL) بیشترین مقدار به ترتیب به میزان ۷/۵ و ۳۲/۵ درصد بود. این میزان دوباره در گروه ۹ (۴ nIU/μL) و گروه ۱۰ (۰/۲ nIU/μL) افزایش یافت (۱۵ درصد). نسبت تخمک‌هایی که به مرحله MII (متافاز ۲) رسیدند در گروه ۸ (PDE ۰/۵ nIU/μL) به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که به ترتیب ۷۷ و ۶۰/۷ درصد بود و مجدداً در غلظت‌های پایین‌تر کاهش یافت (p < ۰/۰۰۱).



نمودار ۱- میزان بلوغ بین گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی.

<sup>a</sup> p < ۰/۰۱, <sup>b</sup> p < ۰/۰۰۱, <sup>c</sup> p < ۰/۰۰۰۱

شروع میوز در تخمک موش بزرگ صحرایی فعال می‌شود. این امر نشان می‌دهد که PDE3A یک ترکیب ضروری از مسیری است که بلوغ تخمک را کنترل می‌کند. گزارش شده است که ۹۰ درصد از PDE فعال درون تخمک حساس به Cilostamide می‌باشد که این ماده مهار کننده مخصوص PDE<sup>۳</sup> می‌باشد. به علاوه گزارش شده است که کسر کوچکی از PDE فعال درون تخمک ممکن است PDE1 باشد (۸). با توجه به مطالب ارائه شده هدف از این تحقیق بررسی تاثیر فسفودی استراز ۱ به عنوان آنزیم تجزیه کننده cAMP بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش نژاد NMRI بود.

### مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، از موش‌های نژاد NMRI ۶-۴ هفته‌ای تهیه شده از انستیتو رازی کرج استفاده شد. موش‌ها به وسیله قطع نخاع کشته شدند و تخمدان آنها در شرایط استریل خارج شد و پس از انتقال به درون قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM-α حاوی Fcs ۵ درصد چربی‌های اضافی اطراف تخمدان را گرفته و با سرنگ انسولین تشریح شد و تخمک‌های نارس حاوی ژرمنال وزیکول همراه با سلول‌های گرانولوزا جدا شدند. سپس با روش پیپتینگ کردن، سلول‌های گرانولوزای اطراف آنها برداشته شدند. تخمک‌های نارس هسته‌دار (GV: Germinal vesicle) با سیتوپلاسم روشن و منطقه شفاف (ZP: Zona pellucida) یک‌نواخت و مناسب انتخاب شدند. تخمک‌های نارس در یک گروه کنترل و ۱۰ گروه آزمایشی طبقه‌بندی شدند. در گروه کنترل، ۲۸۱ تخمک نارس از موش‌های طبیعی گرفته و در محیط حاوی FCS ۵ درصد و ۱۰۰ میلی‌واحد بر میلی‌لیتر rFSH و ۷/۵ واحد بر میلی‌لیتر HCG قرار داده شدند. در هر گروه آزمایشی به محیط پایه IVM که در قسمت فوق ذکر شد، دوز خاصی از فسفودی استراز به شرح زیر اضافه شد:

- گروه ۱: تعداد ۱۲۸ تخمک، دوز فسفودی استراز ۸۰ nIU/μL
- گروه ۲: تعداد ۱۴۰ تخمک، دوز فسفودی استراز ۴۰ nIU/μL
- گروه ۳: تعداد ۱۵۵ تخمک، دوز فسفودی استراز ۱۰ nIU/μL
- گروه ۴: تعداد ۱۴۰ تخمک، دوز فسفودی استراز ۵ nIU/μL
- گروه ۵: تعداد ۱۳۰ تخمک، دوز فسفودی استراز ۲ nIU/μL
- گروه ۶: تعداد ۱۳۰ تخمک، دوز فسفودی استراز ۱/۵ nIU/μL
- گروه ۷: تعداد ۱۳۰ تخمک، دوز فسفودی استراز ۱ nIU/μL

جدول ۱- مقایسه بلوغ آزمایشگاهی گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها	GV (%)	GVBD (%)	MII (%)	کل
کنترل	۲۴(۱۸/۵)	۲۷(۲۰/۷)	۶۰(۶۰/۷) <sup>a</sup>	۱۳۰ ۷۹
گروه ۱ (۸۰ nIU/μL)	۴۲(۳۲/۵)	۷۶(۵۲/۵)	۱۰(۱۰) <sup>ab</sup>	۱۲۸ ۱۳
گروه ۲ (۴۰ nIU/μL)	۴۲(۳۰)	۵۰(۳۵/۵)	۳۰(۳۰)	۱۴۰ ۴۲
گروه ۳ (۱۰ nIU/μL)	۴۲(۲۷)	۵۷(۳۶/۵)	۳۳(۳۳/۵)	۱۵۵ ۵۲
گروه ۴ (۵ nIU/μL)	۲۵(۱۷/۵)	۴۶(۳۲)	۵۸(۴۰/۵)	۱۴۳ ۵۸
گروه ۵ (۲ nIU/μL)	۲۲(۱۷)	۳۳(۲۵)	۶۵(۵۰)	۱۳۰ ۶۵
گروه ۶ (۱/۵ nIU/μL)	۱۷(۱۳)	۳۰(۲۳)	۸۲(۶۳)	۱۳۰ ۸۲
گروه ۷ (۱ nIU/μL)	۱۲(۹/۵)	۲۴(۱۸/۵)	۹۲(۷۰/۵)	۱۳۰ ۹۲
گروه ۸ (۰/۵ nIU/μL)	۱۰(۷/۵)	۱۸(۱۴)	۷۷(۷۷) <sup>bc</sup>	۱۳۰ ۱۰۰
گروه ۹ (۰/۴ nIU/μL)	۲۰(۱۵)	۱۹(۱۴/۵)	۶۸(۶۸/۵)	۱۳۰ ۸۹
گروه ۱۰ (۰/۳ nIU/μL)	۱۳(۱۰)	۲۸(۲۱/۵)	۶۴(۶۴/۵)	۱۳۰ ۸۴

GV: Germinal Vesicle Breakdown; GVBD: Germinal Vesicle Breakdown; MII: Metaphase II; p<۰/۰۰۰۱<sup>c</sup>, p<۰/۰۰۱<sup>b</sup>, p<۰/۰۰۱<sup>a</sup>

## بحث

تحقیق حاضر برای اولین بار تاثیر فسفودی استراز ۱ را بر روی بلوغ تخمک مورد مطالعه قرار داده است. در این پژوهش به منظور بررسی تاثیر فسفودی استراز ۱ بر روند بلوغ تخمک، این آنزیم با غلظت‌های مختلف در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفته است. این مطالعه نشان می‌دهد که فسفودی استراز ۱ میزان بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش نژاد NMRI را افزایش می‌دهد و از میان دوزهای مورد استفاده، دوز ۰/۵ nIU/μL بیشترین تاثیر را در افزایش بلوغ دارد. علی‌رغم اینکه مطالعه حاضر بر اساس مورفولوژی هسته تخمک استوار است، اما به نظر می‌رسد که فسفودی استراز ۱ از طریق کاهش cAMP درون تخمک عمل می‌کند. نتایج حاصل از این تحقیق تاکید بر مطالعه Masciarelli و همکارانش در سال ۲۰۰۴ است که بیان کردند کاهش cAMP درون تخمک روند بلوغ تخمک را افزایش می‌دهد (۱). Conti نیز در سال ۱۹۹۹ نشان داد که فورسکولین تخمک را در توقف میوزی ثابت نگه می‌دارد که این عمل از طریق فعال کردن آدنیلات سیکلاز و افزایش سطح cAMP انجام می‌شود (۸). به علاوه گزارش شده است که گوانوزین منوفسفات (GMP) نیز نقش ضروری در حفظ توقف میوزی بازی می‌کند. در حقیقت GMP خود به گوانوزین تری فسفات (GTP) تبدیل می‌شود و GTP با G

پروتئین موجود در سیتوپلاسم تخمک و غشاء سلول‌های کومولوس واکنش نشان می‌دهد و باعث افزایش سطح cAMP درون تخمک می‌شود (۷). هم‌چنین Anwar در سال ۲۰۰۲ نشان داد که استفاده از مهار کننده‌های کانال‌های کلسیم به طور موقت میوز را با افزایش سطح cAMP درون تخمک مهار می‌کند (۹). همان طور که می‌دانیم تخمک پستانداران در مراحل اولیه زندگی جنینی وارد میوز می‌شود و این فرآیند در مرحله دیپلوتن پروفاز میوز I متوقف می‌شود (۱۰). در بدن، میوز با تحریک LH در تعدادی از فولیکول‌های پیش از تخمک گذاری آغاز می‌شود و در آزمایشگاه جدا شدن اووسیت از سلول‌های فولیکولی اطرافش موجب شروع میوز می‌شود (۱۱). در حقیقت، cAMP با اتصال به زیر واحد تنظیمی پروتئین کیناز A موجب جدایی آن از زیر واحد کاتالیکی می‌شود و در نتیجه پروتئین کیناز A فعال می‌شود و پروتئین‌های ضروری برای میوز مانند Maturation MPF (Promoting Factor) را فسفریله می‌کند. فسفریلاسیون مداوم این پروتئین‌ها، توقف میوزی را ثابت نگه می‌دارد و میوز زمانی آغاز می‌شود که سطوح داخل سلولی cAMP به واسطه عمل فسفودی استراز کاهش یابد (۱۲). فسفودی استراز ارتباط مجدد بین زیر واحدهای کاتالیتیکی و تنظیمی پروتئین کیناز A را برقرار می‌کند و بدین طریق مانع عملکرد آن می‌شود. در نتیجه پروتئین‌های ضروری دفسفریله می‌شوند و میوز دوباره از سر گرفته می‌شود. مطالبی که در فوق بیان شد از نقش cAMP و فسفودی استراز در روند بلوغ تخمک حمایت می‌کند. تحقیق حاضر نیز نشان می‌دهد که افزودن فسفودی استراز ۱ به محیط کشت همانند استفاده از فسفودی استراز ۳ از طریق کاهش cAMP باعث افزایش بلوغ تخمک‌های نارس موش نژاد NMRI می‌شود (۱۳). ولی سوال باقی مانده این است که آیا فسفودی استراز ۱ بر روند تکوین جنین‌های حاصل نیز اثر مثبت دارد؟ و آیا در گونه‌های دیگر از جمله انسان نیز موثر است؟ که نیازمند تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

کلیه هزینه‌های طرح حاضر به وسیله معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تامین شده است.

## REFERENCES

- Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. Clin Invest 2004; 114: 196-205.

2. Nogueira D, Albano C, Adriaenssens T, Cortvrindt R, Bourgain C, Devroey P, et al. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. *Biol Reprod* 2003; 69: 1042–52.
3. Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005; 130: 791–99.
4. Aktas H, Wheeler MB, Rosenkrans CF Jr, First NL, Leibfried – Rutledge ML. Maintenance of bovine oocytes in prophase of meiosis I by high [cAMP]. *J Rprod Fertile* 1995; 105: 227-35.
5. Kuyte JR, Kruip TA, de Jong-Brink M. Cytochemical localization of adenylate cyclase in bovine cumulus – oocyte complex. *Exp cell rep* 1988; 174: 139-45.
6. Nogueira D, Cortvrindt R, Everaerd B, Smitz J. Effects of long-term in vitro exposure to phosphodiesterase type-3 inhibitors on follicle and oocyte. *Dev Reprod* 2005; 130: 177–86.
7. Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, ST. Denis SH, Cheng JB. Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP- specific phosphodiesterase. *J Biol Chem* 1998; 273: 15559-64.
8. Conti M, Hin SL. The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1999; 63: 1-38.
9. Anwar A. In vitro maturation of oocytes. A Review article. *Anat J* 2002; 25: 1-70.
10. Conti M, Jin SL, Monaco L, Repaske DR, Swinen JV. Hormonal regulation of cyclic nucleotid phosphodiesterase. *Endocr Rev* 1991; 12: 218-34.
11. Richard FJ, Tsafiriri A, Conti M. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biol Reprod* 2001; 65: 1444-51.
12. Sasseville M, Côté N, Guillemette C, Richard FJ. New insight into the role of phosphodiesterase 3A in porcine oocyte maturation. *BMC Dev Biol* 2006; 6: 47.
13. Bornslaeger EA, Mattei P, Schultz RM. Involvement of cAMP dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 1996; 114: 462-53.