مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ۵، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۳، ٤١٦-٤٠٩

بررسی تاثیر لپتین بر بلوغ، لقاح و تکوین رویانی تخمک‌های نابالغ موش در شرایط آزمایشگاهی

روح اله ابراهیم پور ملکشاه .M.Sc [1]، مجید ملک زاده شفارودی .Ph.D [2]، هاتف قاسمی حمید آبادی .Ph.D [2]، امیر اسماعیل نژاد مقدم .Ph.D [2]، نوراله رضایی .Ph.D [2*]

۱- کارشناس ارشد علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران
۲- گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: nourrezaei@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۲۰

چکیده

هدف: هدف این مطالعه بررسی تاثیر لپتین بر میزان بلوغ، لقاح و تکوین رویانی تخمک‌های نابالغ موش در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: تخمک‌های نا بالغ موش (GV) از موش‌های ماده NMRI جدا شده و به‌طور تصادفی درگروه‌های: کنترل (لپتین ۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)، اول (لپتین ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)، دوم (لپتین۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و سوم (لپتین۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) قرارداده شدند. ۲۴ ساعت بعد تخمک‌های بالغ شده (MII) شناسایی و با اسپرم انکوبه شده لقاح داده شدند. تکوین رویانی هر ۲۴ ساعت با استفاده از میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرارگرفت.

نتایج: از مجموع تخمک‌های GV جدا شده ۵۳/۱ درصد در گروه کنترل ۵۶/۲ درصد در گروه اول، ۴۲/۴ درصددر گروه دوم و۳۸/۳ درصد در گروه سوم به مرحله متافاز II رسیدند. میزان GVBD ، ۳۱/۲۷ درصد در گروه اول، ۴۰/۶۳ درصددر گروه دوم و۳۶/۳۹ درصد در گروه سوم بود که در مقایسه با گروه کنترل ۲۲/۰۵ درصد تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). غلظت فیزیولوژیک لپتین (۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) میزان MII را در مقایسه با غلظت‌های بالاتر لپتین به‌صورت معنی‌داری افزایش داد. درحالی‌که میزان وقوع GVBD در غلظت‌های بالای لپتین بیشتر از غلظت فیزیولوژیک لپتین بود.

نتیجه‌گیری: تفاوت معنی‌داری در میزان تاثیر غلظت‌های مختلف لپتین بر مراحل مختلف تکوین رویانی بعد از IVF در بین گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نگردید.

واژگان کلیدی: لپتین، اووسیت‌های نابالغ ، بلوغ، لقاح، تکوین رویانی

مقدمه

لپتین یک پپتید ۱۶ کیلو دالتونی و فراورده ژن (obesity; ob) می‌باشد که عمدتا از بافت چربی سفید و نیز به‌میزان کمتر از هیپوفیز، هیپوتالاموس، کبد، چربی قهوه‌ای و برخی بافت‌های دیگر ترشح می‌شود. شواهد و مدارک شاخص‌هایی را آشکار ساخته است که نشان‌دهنده نقش مستقیم لپتین در تنظیم عمل‌کرد تخمدانی پستانداران و همچنین تکوین جنینی قبل از لانه گزینی می‌باشد (۱). لپتین در عمل‌کرد تولید مثلی گونه‌های مختلف از طریق مداخله در آبشاری از رخدادهای مرتبط با بلوغ تخمک (۲)، باروری، کسب توانایی تکوین جنینی، کلیواژ، میزان بلاستوسیست و آپوپتوزیس (۳) دارای نقش به‌سزایی می‌باشد. لپتین و یا mRNA آن در تخمک موش (۴ و ۵) و انسان، در سلول‌های احاطه کننده آن از قبیل گرانولوزا، کومولوس و تکا (۶)، تخمدان‌ها (۷ و ۸)، جنین قبل از لانه گزینی (۹) و نیز در سلول‌های جفت با غلظت‌های مشابه سرم (۱۰) یافت می‌شوند. علاوه بر این رسپتورهای لپتین در سلول‌های تکا، گرانولوزا، تخمک و جنین (۱۱) شناسایی شده‌اند. مایع فولیکولی (۱۱ و ۱۲) و رحمی هم شامل لپتین می‌باشند که حاکی از در دسترس بودن این هورمون برای تاثیر بر رسپتورهای لپتین در فولیکول و جنین قبل از لانه گزینی می‌باشد. از آنجایی‌که جنین و تخمک هر دو دارای رسپتور لپتین هستند مطالعات اخیر روی توانایی تاثیر مستقیم لپتین بر روی بلوغ تخمک و تکامل زودرس جنینی متمر کز شده است (۱۳ و ۱۴).

همچنین مشاهده شده است که بیان ob-Rb در تخمدان رت در پاسخ به تجویز HCG (Human Chorionic Gonadotropin) تغییر می‌کند و در هنگام تخمک‌گذاری به اوج خود می‌رسد. این رخداد پیشنهاد کننده نقش احتمالی لپتین در عملکرد تخمدانی در این نقطه زمانی می‌باشد لپتین به‌دست آمده از بافت چربی می‌تواند سیستم تولید مثلی را از این نظرکه آیا ذخیره مناسب انرژی برای تولید مثل نرمال در دسترس می‌باشد یا خیر، مورد پیام رسانی قرار دهد (۱۵) .

از طرفی غلظت سیستمیک لپتین در هنگام هضم غذا و در افرادی که دارای چربی های اضافی در بدن هستند بالا می‌باشد (۱۶). تحقیقات نشان داده است که موش‌های فاقد لپتین (ob/ob) و یا رسپتور لپتین (db/db) هم چاق و هم غیر بارور می‌باشند (۱۷و ۱۸) و نیز درمان موش‌های ob/ob با استفاده از لپتین اگزوژن باروری آن‌ها را بهبود می‌بخشد (۱۸ و ۱۹).

گرچه در سال‌های اخیر نقش عملکردی یک میانجی تهیه شده از این هورمون جهت القا بلوغ تخمک در محیط آزمایشگاهی درگونه‌های مختلف نظیر خوک و اسب (۲۰ و ۲۱) مورد مطالعه قرار گرفته است اما علیرغم تحقیقات انجام شده در این خصوص، به‌علت تناقضات موجود پژوهش‌ها در این زمینه همچنان ادامه دارد. Kun و همکاران (۲۱) نیز ارتقا تکوین جنینی تخمک‌های خوک را در حضور لپتین گزارش کردند. یافته‌های Fabíola و همکاران (۲۲) حاکی از آن است که غنی سازی با ۱ و ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر لپتین تاثیر مثبتی بر بلوغ تخمک دارد . Jason و همکاران (۲۳) نشان دادند که پیشرفت MII به‌طور واضحی تحت تاثیر هورمون لپتین قرار نگرفت و افزایش هورمون لپتین منجر به کاهش وقوع MII در تخمک‌های فاقد کومولوس می‌گردد.

با توجه به اینکه در مطالعات قبلی تاثیر دوزهای مختلف لپتین در تمام مراحل بلوغ، لقاح و تکوین رویانی قبل از لانه گزینی تخمک نابالغ موش در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) به‌طور یک‌جا مورد بررسی قرار نگرفته است و نیز به‌علت وجود تناقضات فوق الذکر، دوز مناسب و نهایی لپتین در بلوغ، لقاح و تکوین رویانی قبل از لانه گزینی تعین نشده است. لذا این مطالعه با هدف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف لپتین بر روی بلوغ میوزی، لقاح و تکوین رویانی قبل از لانه گزینی تخمک‌های نابالغ موش در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

جمع آوری تخمک‌ها: دراین مطالعه ازموش های ماده NMRI، ۴ تا ۶ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۰ الی ۲۵ گرم که در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) نگه‌داری می‌شدند استفاده گردید. تحریک تخمک‌گذاری از طریق تزریق ۷/۵ واحد بین المللی (Pregnant Mare Serum Gonadotropine) PMSG (Sigma G4877) به‌صورت داخل صفاقی (Intraperitoneal) انجام شد. بعد از ۴۶ تا ۴۸ ساعت، موش‌ها از طریق جابه‌جایی مهره‌های گردنی (Cervical Dislocation) کشته شده وسپس تخمدان‌های آن‌ها در شرایط حتی المقدور استریل از بدن خارج و به‌درون قطرات ۲۰۰ میکرولیتری محیط کشت (Minimal Essential α (Gibco 11900-073)

- MEM (Medium- Alpha حاوی پنج درصد FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma F2442) منتقل گردید. پس از حذف چربی‌های اضافی، تخمدان‌ها به‌درون قطرات ۳۰۰ میکرولیتری منتقل شده و با استفاده از سرنگ انسولین زیر لوپ تشریح و تخمک‌های نابالغ در مرحله وزیکول زایا GV (Germinal vesicle) با یا بدون سلول‌های کومولوس آزاد شدند. سپس با روش پیپت کردن سلول‌های کومولوس اطراف تخمک‌ها جدا شدند. تخمک‌های نابالغ هسته‌دار با اندازه تقریبی ۶۰ تا ۶۵ میکرون و سیتوپلاسم روشن با فضای دور زرده‌ای مناسب با استفاده از میکروسکوپ معکوس شناسایی و برای بلوغ آزمایشگاهیIVM (In Vitro Maturation) مورد استفاده قرارگرفتند.

بلوغ تخمک‌ها IVM: برای تهیه محلول استوک لپتین (Sigma L 4146,1mg)ویال آن را با Tris-HCL,PH 8.0 20 mM حل کردیم تا محلول ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. سپس غلظت‌های کاری مختلف تهیه شده ودر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و استفاده شد. تخمک‌های GV جمع آوری شده به‌شرح ذیل به‌طور تصادفی بین گروه‌های کنترل و تیمار تقسیم شدند:

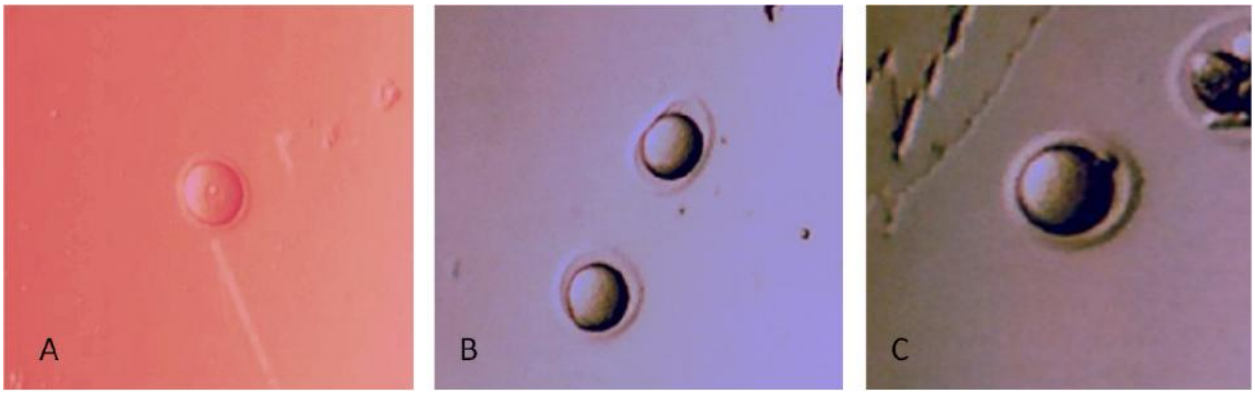
گروه کنترل (۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر لپتین): تخمک‌های نابالغ درون محیط بلوغ پایه شامل MEM-α غنی شده با FBS پنج درصد، 100 mIU/ml rFSH (recombinant Follicle Stimulating Hormone)، HCG ۷/۵ IU/ml، ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین.

گروه تیمار۱ (۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر لپتین): تخمک‌ها در محیط بلوغ پایه حاوی ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر لپتین کشت داده شدند.

گروه تیمار۲ (۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر لپتین): تخمک‌ها در محیط بلوغ پایه حاوی ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر لپتین کشت داده شدند.

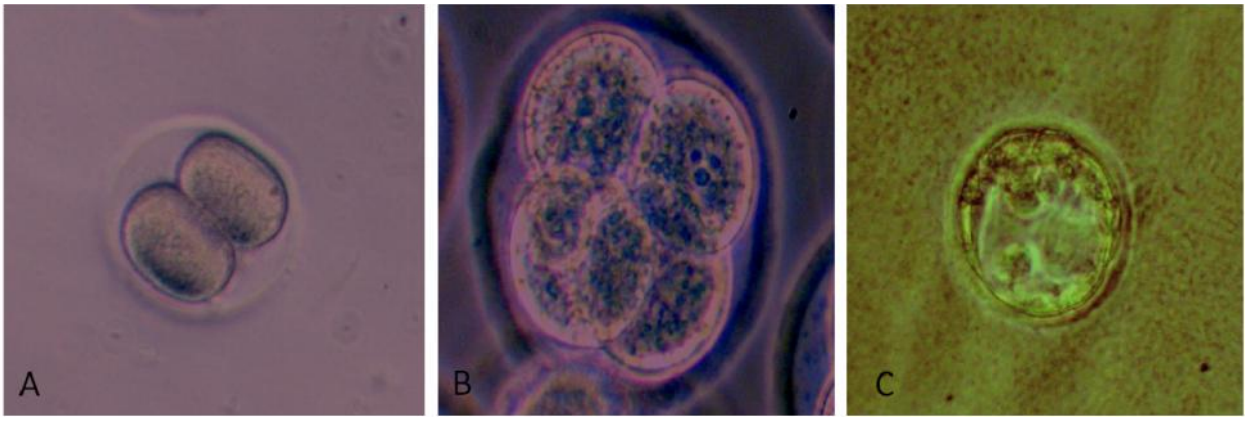
گروه تیمار ۳ (۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر لپتین): تخمک‌ها در محیط بلوغ پایه حاوی۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر لپتین کشت داده شدند.

تخمک‌های هر گروه به مدت ۲۴ ساعت در زیر روغن (Sigma M8410) داخل انکوباتور CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس مراحل بلوغ آزمایشگاهی در تمام گروه‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Nikon Eclipse TS 100) بررسی و با لنز Moticam 2000 2 Mpixel مورد عکس‌برداری قرار گرفت. تخمک‌های بدون تغییر شکل در هسته به‌عنوان GV، تخمک‌های با هسته شکسته شده و نشانه شروع میوز به‌عنوان (Germinal Vesicle Break GVBD Down) و تخمک‌های دارای اولین جسم قطبی به‌عنوان تخمک‌های بالغ یا MII (Metaphase II) در نظر گرفته شدند. تخمک‌هایی که اولین جسم قطبی را آزاد کردند برای لقاح آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱).



شکل ۱: مراحل بلوغ تخمک: A؛ وزیکول زایا × ۱۰۰ . B. (GV)؛ از سرگیری میوز (GVBD) × ۱۰۰ . C؛ بلوغ تخمک (MII) ×۲۰۰.

لقاح آزمایشگاهی(IVF) : اسپرم‌ها از دم اپی‌دیدیم موش‌های نر نژاد NMRI جدا شده و به قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط T6 حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma A3311-10G) منتقل شدند و قبل از عمل تلقیح برای ظرفیت‌گیری به‌مدت ۱/۵ ساعت در همان محیط درون انکوباتور۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد انکوبه شدند. تخمک‌های بالغ در قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط لقاح شامل محیط T6 حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA درگروه‌های ۴ تا ۶ تایی در زیر روغن قرار گرفتند. سپس اسپرم انکوبه با غلظت 1×10^{6} اسپرم بر میلی‌لیتر به‌قطرات حاوی تخمک اضافه شدند. ۴ الی ۶ ساعت بعد از آن تخمک‌ها در قطراتی از همان محیط شستشو شده و با استفاده از میکروسکوپ معکوس جهت بررسی وجود دو پیش هسته به‌منظور ارزیابی میزان لقاح مورد بررسی قرار گرفتند. سپس تخمک‌های دارای دو پیش هسته جدا شده و به محیط کشت T6حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA در گروه‌های ۸ تا ۱۰تایی درون قطرات ۵۰ میکرولیتری منتقل و کشت داده شدند. جنین‌ها ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از تلقیح به‌وسیله میکروسکوپ معکوس برای ثبت مراحل تکوین جنینی مورد ارزیابی و عکس‌برداری قرارگرفتند (شکل۲).



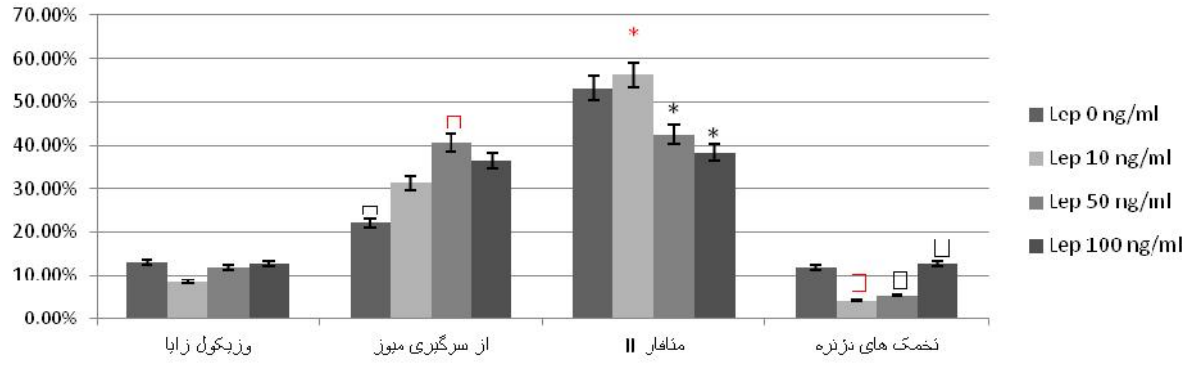
شکل ۲: مراحل تکوین رویانی بعد از لقاح : A: جنین دو سلولی، بزرگنمایی ×۲۰۰، B : جنین چهار سلولی، بزرگنمایی ×۴۰۰، C: بلاستوسیست، بزرگنمایی ×۲۰۰.

آنالیز آماری: نتایج حاصل از تاثیر لپتین بر میزان درصد بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک و نیز تکوین جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست با استفاده از آزمون کوای دو تجزیه و تحلیل شد. هر آزمایش حداقل شش بار تکرار شد و در تمامی موارد $p<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

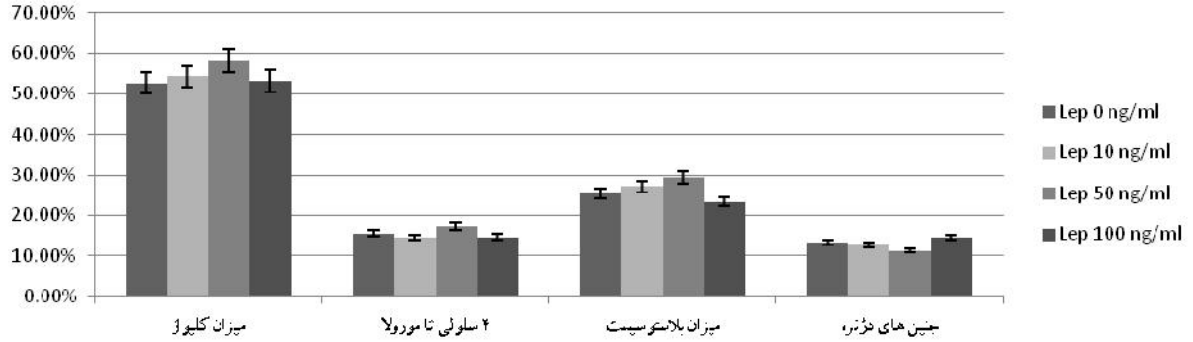
نتایج

اضافه کردن لپتین به محیط کشت بلوغ تخمک‌های نابالغ موش منجر به افزایش میزان GVBD در دوزهای بالاتر این هورمون گردید به‌طوری‌که بیشترین میزان افزایش در غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید. درحالی‌که میزان تخمک‌هایی که به مرحله MII رسیدند با افزایش غلظت هورمون لپتین کاهش پیدا کرد. اضافه سازی غلظت فیزیولوژیک لپتین ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر منجر به افزایش بلوغ تخمک‌های نابالغ موش تا مرحله MII گردید که در مقایسه با سایرگروه‌های تیمار وگروه کنترل تفاوت معنی‌داری داشت ($p<0/05$). میزان وقوع GVBD با حضور ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر لپتین در مقایسه با سایر گروه‌های تیمار و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را به‌دنبال داشت. میزان دژنراسیون تخمک‌های نابالغ موش در محیط بلوغ با حضور ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر لپتین کاهش چشمگیری در مقایسه با سایر گروه‌های تیمار داشت. در حالی‌که میزان دژنراسیون تخمک‌ها در محیط بلوغ با افزایش غلظت هورمون لپتین افزایش پیدا کرد (نمودار ۱).

ارزیابی‌های انجام شده در فواصل زمانی معین بعد از لقاح نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان کلیواژ جنین‌ها تا مرحله مورولا، وقوع بلاستوسیست و دژنراسیون جنین‌ها ما بین گروه‌های تیمار و نیز در مقایسه با گروه کنترل وجود نداشت (نمودار ۲).



نمودار ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف لپتین بر بلوغ تخمک‌های نابالغ موش در شرایط آزمایشگاهی. تخمک‌های بالغ شده در مرحله IVM (In Vitro Maturation) توانستند پس از انجام IVF ، تکوین رویانی قبل از لانه گزینی را در محیط آزمایشگاهی تا مرحله بلاستوسیست طی کنند.



نمودار ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف لپتین بر لقاح و تکوین رویانی قبل از لانه گزینی اووسیت‌های نابالغ موش در شرایط آزمایشگاهی

بحث

در این مطالعه ابتدا تاثیر غلظت‌های مختلف لپتین بر بلوغ تخمک‌های نابالغ موش (GV) در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل حاکی از آن بود که اضافه سازی غلظت فیزیولوژیک لپتین ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر منجر به افزایش بلوغ تخمک‌های نابالغ موش تا مرحله MII گردید که در مقایسه با سایرگروه‌های تیمار وگروه کنترل تفاوت معنی‌داری داشت و میزان تخمک‌هایی که به‌مرحله MII رسیدند با افزایش غلظت لپتین کاهش پیدا کرد. اضافه کردن لپتین به محیط کشت بلوغ تخمک‌های نابالغ موش منجر به افزایش میزان GVBD در دوزهای بالاتر این هورمون گردید به‌طوری‌که بیشترین میزان افزایش در غلظت ۵۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید.سپس تاثیر غلظت‌های مختلف لپتین بر روی لقاح و میزان تکوین رویانی تخمک‌های بالغ شده موش در شرایط آزمایشگاهی که در مرحله اول همین مطالعه به‌دست آمده بودند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین گروه های تیمار ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر و گروه کنترل از نظر میزان کلیواژ و تکوین جنینی قبل از لانه گزینی وجود نداشت.

Fabíola و همکاران (۲۲) نشان دادند که غنی سازی با ۱ و ۱۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر لپتین تاثیر مثبتی بر بلوغ تخمک داشته که در مورد غلظت ۱۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه مطابقت دارد در مطالعه حاضر از سرگیری میوز (GVBD) در حضور غلظت‌های بالاتر لپتین افزایش می‌یابد. علی‌رغم اینکه Jason ES و همکاران (۲۳) نشان دادند که پیشرفت MII به‌طور واضحی تحت تاثیر هورمون لپتین قرار نگرفت. و افزایش هورمون لپتین منجر به کاهش وقوع MII در تخمک‌های فاقد کومولوس می‌گردد. از آن‌جایی‌که لپتین می‌تواند ساخت و رها سازی فاکتورهای مشتق از سلول‌های

کومولوس را که از طریق اتصالات شکاف دار به تخمک یا محیط خارج سلولی وارد می‌شوند تحت تاثیر قرار دهد، کاهش وقوع متافاز *II* در تخمک‌های فاقد کومولوس می‌تواند به‌علت فقدان تعاملات حیاتی تخمک با سلول‌های کومولوس اطراف باشد که منجر به توانایی تکوینی معیوب گردیده است. در این مطالعه اثر مشخصی را روی GVBD طی ۲ الی ۱۸ ساعت بعد از کشت گزارش نکرد در حالی‌که یافته‌های ما حاکی از افزایش میزان GVBD با حضور غلظت‌های بالاتر لپتین می‌باشد و نیز گزارش شده بود که حضور ۱۰۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر لپتین منجر به بلوغ تخمک تا مرحله‌ی پایین‌تر از *MII* در مقایسه با گروه کنترل گردید که دستاوردهای ما نیز موید همین مطلب می‌باشد. در خصوص تاثیر لپتین بر وقوع کلیواژ و مراحل تکاملی بعد از آن تا بلاستوسیست در حضور غلظت‌های مختلف ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر لپتین در این مطالعه به‌دست آمد با یافته‌های آن‌ها مطابقت دارد. البته نکته قابل توجه در مطالعه آن‌ها این است که جنین‌های استفاده شده توسط ایشان از محیط زنده به‌دست آمد، به‌طوری‌که جنین های احتمالی ۱۸ ساعت بعد از جفت گذاری موش های نر و ماده CF1 از طریق تشریح لوله‌های رحمی جداسازی و در محیط کشت تحت تاثیر غلظت‌های متفاوت لپتین قرار گرفته و سپس در فواصل زمانی معین مورد ارزیابی قرار گرفتند. از این‌رو این محققان کمتر با مشکل توقف تکوین جنینی در مرحله دو سلولی (developmental block) درگیر بودند حال آنکه در مطالعه ما تخمک‌های بالغ شده در فرآیند بلوغ آزمایشگاهی(IVM) پس از تایید حضور اولین جسم قطبی در زیر میکروسکوپ معکوس جداسازی شده و پس از لقاح در محیط آزمایشگاهی (IVF) هر ۲۴ ساعت از نظر وقوع مراحل تکوین جنینی قبل از لانه گزینی مورد ارزیابی قرار گرفتند. همین تفاوت بیانگر مشکلات عدیده‌ای بر سر راه مطالعاتی می‌باشد که صرفا در محیط آزمایشگاهی انجام می‌گیرند. لذا کنترل شرایط مختلف آزمایشگاهی جهت به‌دست آوردن نتایج مطلوب یکی از چالش‌های مهم بر سر راه محققان می‌باشد.

نتایج به‌دست آمده در مطالعه Bladimir C و همکاران (۲۴) در خصوص تاثیر دوزهای مختلف لپتین ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر بر میزان کلیواژ و وقوع بلاستوسیست کاملا با نتایج حاصل از مطالعه انجام شده توسط ما مطابقت دارد. در مطالعه انجام شده توسط Boelhanve M و همکاران (۲۵) هیچ تاثیری بر روی میزان وقوع کلیواژ در حضور لپتین گزارش نگردید که این یافته با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه مطابقت دارد. در همین مطالعه افزایش در میزان وقوع بلاستوسیست در حضور ۱۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر لپتین گزارش شد که با یافته‌های ما در تناقض می‌باشد.در مطالعه انجام شده توسط Lange CA و همکاران (۲۶) غلظت مطلوب لپتین برای افزایش میزان بلوغ تخمک‌ها ۱۰۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد که در تناقض با یافته‌های ما می‌باشد. حال آنکه غلظت مطلوب لپتین در افزایش میزان باروری ۱۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد که همان غلظت فیزیولوژیک لپتین می‌باشد و یافته های این مطالعه را تایید می کند. یافته‌های Kakisina P (۲۷) در خصوص میزان وقوع MII در حضور غلظت‌های مختلف لپتین حاکی از افزایش آن در غلظت‌های بالای لپتین در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد که در تعارض با نتایج مطالعه ما بوده است.

لذا با توجه به نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر می‌توان گفت که غلظت فیزیولوژیک لپتین (۱۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر) غلظت مناسبی برای تحریک بلوغ تخمک‌های نابالغ و وقوع MII می‌باشد زیرا تماس تخمک با غلظت فیزیولوژیک لپتین باعث افزایش فسفریلاسیون STAT3 و کاهش میزان cAMP (Cyclic Adenosine Monophosphate) می‌شود که همین امر منجر به بلوغ تخمک می‌گردد. بلوغ تخمک، فعال‌سازی مسیرهای پیام رسانی مختلف نظیر MAPK از طریق رسپتور بلند لپتین (Ob-Rb) را شامل می‌شود که در نهایت منجر به فعال سازی فاکتور پیش برنده بلوغ (Maturation MPF Promoting Factor) شده که خود نیز مرکب از cyclin-B1 وCdc2 می‌باشد (۲۸). در مطالعه انجام شده توسط Guo Z و همکاران (۲۹) نیزهمانند این مطالعه افزایش میزان MII در حضور ۱۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر لپتین گزارش شد و نتیجه اضافه سازی لپتین بر روی میزان کلیواژ در مطالعه ما همانند دستاوردهای حاصل از مطالعه آنها بوده است حال آن‌که میزان بلاستوسیست در حضور ۱۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر لپتین افزایش داشت. لذا آنها اظهار داشتند که لپتین ۱۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر مسیر پیام رسانی MAPK را فعال می‌کند و کاهش توانایی تکوینی تخمک یک اساس و پایه مولکولی دارد به‌طوری‌که تخمک‌های غیر بالغ فعالیت کمتر فاکتور پیش برنده بلوغ، MAPK، cyclin B ، تغییرات در سنتز پروتئین، متابولیسم ناقص انرژی، ورودی کمتر کلسیم در زمان باروری و کاهش طول عمر جنین بعد از باروری را به نمایش می‌گذارند به‌ویژه این‌که سازمان‌دهی مجدد ارگانل‌های سیتوپلاسمی

(Reconstruction) و آغاز ساخت پروتئین‌های متعدد برای تکوین جنین در آینده مهم و ضروری می‌باشد .

از آنجایی‌که یکی از مشکلات اصلی در کشت آزمایشگاهی جنین به‌خصوص در موش فرایندی تحت عنوان توقف در مرحله دو سلولی می‌باشد (۳۰). همین امر منجر به ایجاد چالش بزرگ بر سر راه این گونه مطالعات گردیده است. لذا اعمال تغییرات مختلف در مطالعات متعدد می تواند منجر به شکل گیری راه‌حل‌هایی برای غلبه بر این مشکل در محیط آزمایشگاهی گردد. از آنجایی‌که کمتر از نیمی از تخمک‌های بالغ شده در محیط آزمایشگاهی توانستند مراحل تکوین جنینی قبل از لانه گزینی را تا مرحله بلاستوسیست طی کنند، این امر نشان دهنده بلوغ سیتوپلاسمی ضعیف تخمک‌های بالغ شده در محیط آزمایشگاهی می‌باشد که با یافته های قبلی مطابقت دارد از این‌رو چالش‌های تحقیقاتی آینده بایستی بر روی ارتقا شرایط بلوغ آزمایشگاهی تخمک متمرکز گردد. با توجه به این‌که میزان وقوع رخدادهای تکوینی بعد از لقاح دراین مطالعه در مقایسه با مطالعات قبلی انجام شده درمحیط زنده کمتر می‌باشد لذا می‌توان یافته‌های قبلی مبنی برکمتر بودن پتانسیل تکوینی تخمک‌های بالغ شده در محیط *in vitro* در مقایسه با محیط *in vivo* را مورد تایید قرار داد.

نتیجه گیری

در حالی‌که بلوغ تخمک‌های نابالغ موش در حضور غلظت‌های مختلف لپتین در حالت وابسته به دوز افزایش نمی‌یابد، غلظت فیزیولوژیک لپتین (۱۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر) غلظت مناسبی برای تحریک بلوغ تخمک‌های نابالغ موش و وقوع MII در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. غلظت فیزیو لوژیک لپتین (۱۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر) هر دو مسیر پیام رسانی لپتین (MAPK and STAT3) را فعال می‌کند. پتانسیل تکوینی تخمک‌های بالغ شده در محیط *in vitro* در مقایسه با محیط *in vivo* کمتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر علیرضا خلیلیان استاد آمارحیاتی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به‌خاطر راهنمایی در کار آماری و سرکار خانم سمیه تدینی به‌خاطر کمک در کار اجرایی این پروژه سپاسگزاریم. این مقاله حاصل پایان نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران به شماره ۱۵۷۵ در سال ۱۳۹۲ می‌باشد.

منابع

1. Almog B, Gold R, Tajima K, et al. leptin attenuates follicular apoptpsis and accelerates the onset of prepuberty in immature rats. Mol Cell Endocrinol. 2001; 183:179-91.

2. Antczak M, J VB. Oocyte influences on early development; the regulatory protein leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. Mol Hum Reprod. 1997; 3: 1067–86.

3. Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, et al. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. Mol Hum Reprod. 1997; 3: 467–72.

4. Van Tol HT, van Eerdenburg FJ, Colenbrander B, et al. Enhancement of bovine oocyte maturation by leptin is accompanied by an upregulation in mRNA expression of leptin receptor isoforms in cumulus cells. Mol Reprod Dev. 2008; 75: 578-87.

5. Kahraman S, Yakin K, Donmez E, et al. Relation between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome interacytoplasmic sperm injection. Human reproduction. 2000;15(11): 2390-3.

6. Navot D, Bergh P,Williams M, et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. The Lancet. 1991; 337: 1375–7.

7. Ryan NK, Woodhouse CM, Van der Hoek KH, Gilchrist RB, et al. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. Biol Reprod. 2002; 66(5): 1548–54.

8. Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, et al. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. Endocrinology 2002; 143(5): 1922–31.

9. Gonzalez RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, et al. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85: 4883–8.

10.Karlsson C, Lindell K, Svensson E. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82: 4144–8.

11.Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR. Antagonizes the insulin like growth factor I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. J Clin Endo Metab. 1999; 84: 1072–6.

12. Loffler S, August G, Kohler U. Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. Mol Hum Reprod. 2001; 7: 1143–9.

13.Butzow TL, Moilanen JM, Lehtovirta M, Tuomi T, et al. Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84: 3135–9.

14. Barroso G, Barrionuevo M, Rao P GL, Danforth D, et al. Vascular endothelial growth factor, nitricoxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. Fertil Steril. 1999; 72: 1024–6.

15.Tataranni PA, Monroe MB. Adiposity, plasma leptin concentration and reproductive function in active and sedentary females. Int J Obes Relat Metab Disord. 1997; 21(9): 818–21.

16. Mantzoros XS, Dunaif A. Leptin concentrations in the polycystic ovarian syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82: 1687–91.

17.Mounzih K, Lu R, FF C. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. Endocrinology. 1997; 138(3): 1190–3.

18. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. Endocrinology 1996; 137(7): 3144–7.

19. Chehab FF, Lim ME. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. Nat Genet 1996; 12(3): 318–20.

20. Jesse C, Hai Z, Paul WD, Jim P, et al. Leptin Enhances Oocyte Nuclear and Cytoplasmic Maturation via the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. Gndocrinology. 2004; 145(11): 5355–63.

21. Kun Z, Shaohua W, Yufang M, Yankun L, et al. Effects of leptin supplementation in in vitro maturation medium on meiotic maturation of oocytes and preimplantation development of parthenogenetic and cloned embryos in pigs. Animal Reproduction Science. 2007; 101: 85–96.

22. Fabíola F, Paula L, Marc B, Felix A. Habermann, Fred Sinowatz6 and Eckhard Wolf. Leptin Promotes Meiotic Progression and Developmental Capacity of Bovine OocytesVia Cumulus Cell-Independent and -Dependent Mechanisms. Biology of reproduction. 2007; 76: 532-41.

23. Jason ES, Rodney LD, Daniel M, Janis GM, et al. Direct Effects of Leptin on Mouse Reproductive Function: Regulation of Follicular,Oocyte, and Embryo Development. Biology of reproduction 2004; 71: 1447-552.

24. Bladimir C, Roser M, Celia de F, Pablo B-Á, et al. Effect of leptin during in vitro maturation of prepubertal calf oocytes:Embryonic development and relative mRNA abundances of genes involved in apoptosis and oocyte competence. Theriogenology. 2011; 76: 1706–15.

25. Boelhauve M, Sinowtze F, FF WP-L. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. Biology of Reproduction. 2005; 73: 737-44.

26. Lange Consiglio A, Dell Aquila ME, Fiandanese N, Ambruosi B, et al. Effects of leptin in vitro maturation,fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in horse. Reprod Biol Endocrinol. 2009;7: (113-120).

27. Kakisina P. The effect of leptin in increasing the quality of goat oocyte maturation in vitro. Environ Biol. 2013; 3(7): 10-5.

28.Craig J, Zhu H, Dyce PW, Petrik J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmatic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. Endocrinology. 2004; 145(11): 5355-63.

29. Guo Z, wang Y, Zhang Y. Leptin promoted meiotic maturation of bovine oocytes and development of parthenogenetic activation and yak (Bos grunniens)-bovine interspecies cloned embryos. Belg J Zool. 2008; 138 (2): 184-90.

30.Bahadori MH, Azarnia M, Ghasemian F. The effect of hepatocyte growth factor on mouse oocyte in vitro maturation and subsequent fertilization and embryonic development. Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS). 2011; 13(2): 26-30.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2015; 5(4): 409-416

Original Article

Investigating the Effect of Leptin on In Vitro Maturation, Fertilization and Embryonic Development of Immature Mouse Oocytes

Ebrahim Pour Malekshah R, M.Sc. [1], Malekzadeh Shafaroudi M, Ph.D.[2], Ghasemi Hamidabadi H, Ph.D.[2], Esmaeil Nejad Moghaddam A, Ph.D.[2], Rezaei N, Ph.D.[2*]

1.M.Sc of Anatomical Science, Department of Anatomical Science, Sari Medical School, Mazandaran University Of Medical Sciences, Iran.

2. Department of Anatomical Science, Sari Medical School, Mazandaran University of Medical Science, Iran.

* Email corresponding author: nourrezaei@gmail.com

Received: 2 Mar. 2014 Accepted: 10 Jun. 2014

Abstract

Aim: The purpose of this study was to investigate the effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic development of immature mouse oocytes.

Material and Methods: Immature oocytes were isolated from NMRI female mice and divided randomly into 4 groups: leptin 0 ng/ml (control), 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml. 24 h later matured (MII) oocytes were identified and fertilized with incubated sperm. Embryonic development was investigated every 24 h using inverted microscope.

Results: From isolated oocytes 53/1% in control group, 56/2% in first group,42/4% in second group and 38/3% in third group developed to MII. The rate of GVBD was 22/05% in control group, 31/27% in first group, 40/63% in second group and 36/39% in third group. The physiologic concentration of leptin (10 ng/ml) considerably increased the rate of MII when compared to other groups ($p<0.05$), whereas the GVBD rate was higher in group treated with concentrations more than physiologic dose.

Conclusion: When different concentration of leptin was applied after IVF, no significant effects were observed between four treatment groups in different stages of embryonic development.

Keywords: Leptin, immature oocytes, maturation, fertilization, Embryonic development