Qom University of Medical Sciences Journal

2023. Volume 17

Research Paper

The Effect of Vitamin C on in Vitro Fertilization Process in Polycystic Mouse Oocytes

Ozra Rahimi[1], *Abbas Ahmadi[1], Golamreza Najafi[1], Ali Shalizar[1]

1. Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Rahimi O, Ahmadi A, Najafi G, Shalizar A. [The Effect of Vitamin C on in Vitro Fertilization Process in Polycystic Mouse Oocytes (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2023; 17:E2811.1. https://doi.org/10.32598/qums.17.2811.1

https://doi.org/10.32598/qums.17.2811.1

Received: 28 Jan 2023

Accepted: 18 Mar 2023

Available Online: 10 May 2023

Keywords:
Ovarian cysts, In vitro fertilization, Fetal development, Ascorbic acid

ABSTRACT

Background and Objectives In this research, the effect of vitamin C as an antioxidant was investigated on in vitro fertilization and fetal growth in oocytes obtained from small laboratory mice with experimentally-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) using estradiol valerate.

Methods A number of 8-week-old Swiss-type adult mice were randomly selected and categorized into control (fed only with water and food) and PCOS (using estradiol valerate by intraperitoneal injection) groups. After a 2-month treatment period, hCG and Folligan drugs were injected intraperitoneally to stimulate ovulation. The oocytes were dissected, washed, and cultured in an HTF medium containing BSA (4 mg/mL). Oocytes obtained from mice were divided into different groups using culture media containing different doses of vitamin C. Then, the quality of the developed embryos, the percentage of cleavage, the number of arrested embryos, and the percentage of blastocysts created during 120 hours in each group were evaluated using an inverse microscope.

Results The results of examining the percentage of fertilization, blastocyst, and other stages of fetal development showed that the induction of polycystic ovary syndrome caused a significant reduction in the stages of development and growth of the fetus compared to the control group. It has also caused an increase in type I and type II embryos.

Conclusion Overall, using antioxidant vitamin C with the proper dose can positively affect fertility and fetal growth in the culture medium of in vitro fertilization.

**** Corresponding Author:***

Abbas Ahmadi, PhD.

Address: Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Tel: +98 (914) 1498524

E-Mail: ahmadiabbas36@yahoo.com

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Introduction

In this research, the effect of vitamin C as an antioxidant was investigated on the process of in vitro fertilization and fetal growth in oocytes obtained from small laboratory mice with experimentally-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) using estradiol valerate.

Methods

A number of 8-week-old adult mice were randomly selected and divided into control (fed only water and food) and PCOS (using estradiol valerate by intraperitoneal injection). After a 2-month treatment period, Folligan and hCG drugs were injected intraperitoneally to stimulate ovulation. Using the dissecting technique, we removed the eggs and, after washing them, transferred them to the HTF culture medium containing BSA (4 mg/mL). Oocytes obtained from mice were divided into different groups using culture media containing different doses of vitamin C (50 µmol, 100 µmol, and 200 µmol). Motile spermatozoa were added to a concentration of one million per milliliter of culture medium. Fertilization was confirmed about 6-8 hours after the addition of sperm by observing two pronuclei, creating the zygote. After washing, the fertilized eggs (zygotes) were put into the fresh culture medium, which had already reached equilibrium in different groups. Finally, the quality of the developed embryos, the percentage of cleavage, the number of arrested embryos, the amount of their lysis and fragmentation, and the percentage of blastocysts created were evaluated during 120 hours in each group. The amount of lysis and fragmentation of embryos was analyzed by proportion method using Minitab software (Minitab Co., USA). The significance value was set at $P<0.05$.

Results

The results of examining the percentage of fertilization, blastocyst, and other stages of fetal development showed that the induction of PCOS caused a significant reduction in the stages of development and growth of the fetus compared to the control group. It has also caused an increase in type I and type II embryos (embryos with complete and moderate lysis and necrosis). This research shows the protective effect of vitamin C, whose addition to the embryo culture medium of the polycystic group increased the percentage of fertilization, blastocyst, and other stages of embryonic development. It also decreased the percentage of type I and type II embryos. Based on the obtained results, the administration of estradiol valerate and creating PCOS mice caused a significant decrease in the percentage of conception from 95.43 in the control group to 77.59 in the PCOS group ($P<0.05$), which shows a reduction in fertility in the PCOS group. Examining the percentage of conception showed that adding vitamin C to the culture medium of the polycystic group increased the percentage of conception compared to the polycystic group, whose culture medium did not contain antioxidants. This increase was significant in the case of the 200 µmol dose (85 versus 58) compared to the polycystic group (77 versus 59). This outcome was probably due to the correction of the damage caused by the polycystic syndrome by the antioxidant used in the culture medium. Studying the percentage of two-celled embryos created, marking the beginning of cleavage, revealed that the administration of estradiol in the PCOS group caused a significant decrease in the percentage of these embryos from 92.55 in the control group to 59.36 in the polycystic group ($P < 0.05$). The percentage of two-celled embryos in polycystic groups in all three studied vitamin C doses significantly differed from the polycystic group whose culture medium lacked antioxidants ($P<0.05$). Examining the percentage of embryos that reached the blastocyst stage after 120 hours revealed that the administration of estradiol in the PCOS group caused a significant decrease in the percentage of these embryos from 59.04 in the control group to 26.08 in the polycystic group ($P<0.05$). Also, the results showed that adding vitamin C to the culture medium of the PCOS group increased the percentage of blastocytes compared to the polycystic group, whose culture medium did not have antioxidants. This increase in all three doses of vitamin C added to the culture medium of polycystic cysts was significant compared to the polycystic group without antioxidants ($P<0.05$). The comparison of the percentage of hatched embryos (out of their shells) revealed that the administration of estradiol in the PCOS group caused a significant decrease in the percentage of these embryos from 43.08 in the control group to 8.57 in the polycystic group ($P<0.05$). Also, the results showed that adding vitamin C to the culture medium of the PCOS group increased the percentage of hatched embryos compared to the polycystic group, whose culture medium did not contain antioxidants, and this increase in the dose of 200 and 150 µmol compared to the polycystic group was significant ($P<0.05$). In addition, comparing the percentages of type II embryos in the polycystic groups with culture medium containing antioxidants showed that adding antioxidants could reduce this type of embryos compared to the polycystic group without antioxidants. This reduction in any of the doses of vitamin C was not significant

compared to the polycystic group, and the polycystic groups that had different doses of vitamin C added to their embryo culture medium did not show any significant difference compared to each other (P>0.05).

Conclusion

In a healthy body, reactive oxygen species and antioxidants are in balance. When this balance is disrupted, oxidative stress occurs, which affects the reproductive system and even menstrual cycles in women. In general, it can be concluded that using vitamin C antioxidants in the appropriate dose in the in vitro fertilization culture environment has reversed the adverse effects of the polycystic ovary on the quality of oocytes due to its effective antioxidant substances. It can also have a positive impact on their fertility and fetal growth. Factors such as oocyte quality, culture medium, oxygen level, number of embryos per culture unit (embryo density), energy source, and oxidative stress may affect the success of in vitro fertilization.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The current study is part of a PhD thesis in Embryology and Comparative Anatomy (approved in July 2019) at the Faculty of Veterinary Medicine of Urmia University. Ethical considerations in biological research have been followed.

Funding

This research was supported by the Faculty of Veterinary Medicine of Urmia University.

Authors contributions

All authors equally contributed to preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Urmia University Faculty of Veterinary Medicine for its financial and spiritual support.

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

مقاله پژوهشی

تأثیر ویتامین C بر روند لقاح آزمایشگاهی در اووسیت‌های موش‌ای پلی کیستیک‌شده

عذرا رحیمی[۱]، *عباس احمدی[۱]، غلامرضا نجفی[۱]، علی شالیزار[۱]

۱. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Rahimi O, Ahmadi A, Najafi G, Shalizar A. [The Effect of Vitamin C on in Vitro Fertilization Process in Polycystic Mouse Oocytes (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2023; 17:E2811.1. https://doi.org/10.32598/qums.17.2811.1

doi https://doi.org/10.32598/qums.17.2811.1

تاریخ دریافت: ۰۸ بهمن ۱۴۰۱
تاریخ پذیرش: ۲۷ اسفند ۱۴۰۱
تاریخ انتشار: ۲۰ اردیبهشت ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف در این تحقیق تأثیر ویتامین C به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان بر روند لقاح آزمایشگاهی و رشد جنینی در اووسیت‌های حاصل از موش‌های کوچک آزمایشگاهی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تجربی(با استفاده از استرادیول والرات) بررسی شد.

روش بررسی تعدادی موش سوری بالغ ۸ هفته‌ای به‌طور تصادفی انتخاب و در دو گروه کنترل و پلی‌کیستیک دسته‌بندی شدند. بعد از طی دوره تیمار ۲ ماهه برای تحریک تخمک‌گذاری داروهای محرک تخمک‌گذاری به روش داخل صفاقی تزریق شد. با استفاده از تکنیک جداسازی تخمک‌ها خارج شد و پس از شست‌وشو به محیط کشت مناسب منتقل شدند. تخمک‌ها در گروه‌های مختلف بااستفاده‌از محیط کشت‌های حاوی دُزهای مختلف ویتامین C تقسیم‌بندی شدند و کیفیت جنین‌های رشدکرده، درصد شکافتگی، میزان جنین‌های متوقف‌شده و درصد بلاستوسیست‌های ایجادشده در طی ۱۲۰ ساعت در هر گروه با میکروسکوب اینورت ارزیابی شدند.

یافته‌ها نتایج بررسی درصد لقاح، بلاستوسیت و سایر مراحل رشد جنینی نشان داد القای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک باعث کاهش کاملاً معنادار در مراحل پیشرفت و تکوین جنین در مقایسه با گروه کنترل شده و همچنین باعث افزایش جنین‌های تیپ‌ا و تیپ‌اا شده است.

نتیجه‌گیری به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از آنتی‌اکسیدان ویتامین C در دُز مناسب در محیط کشت لقاح داخل آزمایشگاهی بر باروری و رشد جنینی اثر مثبتی می‌تواند داشته باشد.

کلیدواژه‌ها:
کیست‌های تخمدان، لقاح آزمایشگاهی، رشد جنینی، اسید اسکوربیک

* نویسنده مسئول:
دکتر عباس احمدی
نشانی: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی،گروه علوم پایه.
تلفن: ۱۴۹۸۵۲۴ (۹۱۴) ۹۸+
رایانامه: ahmadiabbas36@yahoo.com

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

مقدمه

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک[1] سندرومی با اختلالات اندوکرینی و متابولیکی پیچیده‌ای است که با عدم تخمک‌گذاری مزمن و علائم پاتولوژیکی مانند هیپرآندروژنیسم مشخص می‌شود. مهم‌ترین نشانه برای وجود تخمدان پلی‌کیستیک، افزایش آندروژن‌های خونی می‌باشد [۱]. سندرم تخمدان پلی‌کیستیک شایع‌ترین دلیل نازایی در زنان به‌دلیل عدم تخمک‌گذاری است. به همین دلیل این افراد معمولاً به لقاح داخل آزمایشگاهی نیاز پیدا می‌کنند [۲]. گرچه علل بسیار مختلفی برای کیفیت پایین روند تولید آزمایشگاهی جنین گزارش شده است. به نظر می‌رسد تولید گونه‌های اکسیژن فعال [2] به‌عنوان یکی از علل اصلی توقف رشد جنین‌های کشت داده‌شده در آزمایشگاه می‌باشد. گونه‌های اکسیژن فعال می‌تواند باعث توقف میوزی در اووسیت، مهار تکوین جنین و مرگ سلولی شود. استرس اکسیداتیو درنتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی در یک سلول ایجاد می‌شود [۳].

انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن شامل: آنیون سوپراکسید (O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و مشتقات غیررادیکالی اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (O_2H_2) بوده که به‌شدت ناپایدارند و به‌طور سریع و غیرتخصصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان می‌دهند و منجر به ایجاد و توسعه انواع آسیب‌های سلولی ازجمله پراکسیداسیون غشاء پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و نوکلئیک، آپاپتوز و نکروز می‌شوند که خود درنهایت منجر به کاهش قابلیت زنده ماندن و تکوین جنین‌های آزمایشگاهی می‌شود [۳]. اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد توسط سیستم آنتی‌اکسیدان درون سلولی مانند گلوتاتیون و آنزیم‌هایی مانند سوپراکسیددیسموتاز[3]، کاتالازو گلوتاتیون پراکسیداز[4] کنترل و یا مهار می‌شود [۴]. به نظر می‌رسد در شرایط کشت آزمایشگاهی جنین‌های پستانداران، میزان تولید رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این جنین‌هاست. بنابراین به منظور غلبه بر این عدم تعادل اکسیدانی، انواع آنتی‌اکسیدان‌ها با منشأ خارجی پیش‌بینی و ارائه شده‌اند. برای مقابله با اثرات سوء گونه‌های اکسیژن فعال در سیستم کشت جنین از آنتی‌اکسیدان‌های گوناگونی استفاده شده است. ازجمله آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که نقش محافظت‌کننده‌ای دارند، می‌توان اسید آسکوربیک (ویتامین C) را نام برد.

در مطالعات گذشته تأثیر رژیم غذایی بر روند تکاملی رویان تأیید شده است. کمبود بسیاری از ویتامین‌ها و مواد مغذی در مایع فولیکولی، می‌تواند شانس باروری طبیعی و موفق را کاهش دهد. افزایش یا کاهش ترکیبات این مایع و وجود استرس اکسیداتیو بر روی مورفولوژی و کیفیت تخمک و جنین تأثیرگذار است. دریافت ویتامین C در زنان ممکن است برای درمان بسیاری از مشکلات ناباروری مفید باشد [۵]. این ویتامین نه تنها به بهبود تعادل هورمونی بدن کمک می‌کند بلکه حضور ویتامین C به تنظیم عملکرد تخمدان و چرخه قاعدگی کمک می‌کند [۶]. ویتامین C حتی به افزایش سطح پروژسترون در بدن کمک می‌کند. شانس بارداری در زنانی که در رژیم غذایی روزانه مکمل‌های ویتامین C را مصرف می‌کنند، به‌طور قابل توجهی نسبت به زنانی که ویتامین C را مصرف نمی‌کنند، افزایش پیدا می‌کند [۷].

در تحقیقاتی میشل و همکاران بر روی تخمک خوک انجام دادند، نشان داده شد که با مصرف غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از ویتامین، درصد تکامل بلاستوسیت خوک نیز افزایش پیدا کرده و شاخص آپاپتوز در آن کاهش یافته است [۸]. بنابراین عوامل مختلفی ازقبیل کیفیت اووسیت، محیط کشت، میزان اکسیژن، تعداد جنین‌ها در واحد کشت (تراکم جنین)، منبع انرژی و نیز استرس‌های اکسیداتیو ممکن است در موفقیت باروری آزمایشگاهی تأثیرگذار باشد؛ ازجمله این عوامل که موفقیت بیشتری در پی دارد، فراهم کردن محیط کشت مناسب برای اووسیت‌های حاصل، محیطی که اثرات نامطلوب استرس اکسیداتیو گونه‌های اکسیژن فعال را به حداقل برساند و بر موفقیت لقاح و تکامل زیگوت مؤثر باشد [۹].

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۸۰ عدد موش سوری ماده ۸ هفته‌ای استفاده شد که قبل از استحصال تخمک‌ها، در طی تیمار به دو دسته کنترل (که فقط آب و غذا دریافت کرده بودند) و پلی‌کیستیک تقسیم شده بودند. برای القای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در تمام گروه‌های پلی کیستیک استرادیول والرات به روش تزریق داخل صفاقی با دُز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد. بعد از طی مدت تیمار (۶۰ روز) برای انجام لقاح آزمایشگاهی موش‌های سوری ماده در هر گروه بااستفاده‌از داروی Folligon و hCG تحریک تخمک‌گذاری شدند که به شرح زیر صورت گرفت:

تزریق ۷/۵ واحد هورمون PMSG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر حوالی ۷ بعدازظهر انجام شد. زمانی که PMSG و hCG تزریق می وند وابسته به یکدیگر و سیکل روشنایی-تاریکی حیوان آزمایشگاهی است. برای اکثر سویه‌های موش سوری، ۴۶-۴۸ ساعت فاصله بین تزریق PMSG و تزریق hCG بهترین تعداد تخمک را نتیجه می‌دهد. بنابراین معمولاً ۴۶-۴۸ بعد از تزریق PMSG (۲تا ۳ ساعت قبل از رهایی LH) بهترین زمان برای تزریق hCG است. در مرحله بعد ۷/۵ واحد

1. Polycystic Ovary Syndrome (Pcos)
2. Reactive Oxygen Spicies (ROS)
3. Superoxide Dismutase (SOD)
4. Glutathione Peroxidase (GPX)

هورمون hCG (ساخت شرکت Folligon ، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر نیز به روش داخل صفاقی صورت گرفت. ۱۰-۱۲ ساعت پس از تزریق hCG (صبح روز بعد) بعد از کشتن حیوان به روش جابه‌جایی گردن، لوله‌های رحمی جدا شده و در داخل محیط کشت ۳۷ درجه از قبل به تعادل‌رسیده، قرار داده می‌شود و بااستفاده‌از تکنیک جداسازی تخمک‌ها خارج می‌شوند و پس از شست‌وشو تخمک‌ها به قطرات محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF حاوی BS4 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منتقل شدند. تخمک‌های استحصال‌شده از موش‌ها در ۸ گروه بااستفاده‌از محیط کشت‌های مختلف حاوی دُزهای مختلف ویتامین Cتقسیم‌بندی شدند:

-گروه کنترل شامل ۱۰عدد موش که فقط آب و غذا دریافت کردند و به محیط کشت جنینی آن آنتی‌اکسیدانی افزوده نشد و فقط از محیط کشت HTF حاوی BSA 4 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد.

-گروه پلی‌کیستیک شامل ۱۰ عدد موش که به‌وسیله استرادیول والرات پلی‌کیستیک شده بودند و به محیط کشت جنینی آن آنتی‌اکسیدانی افزوده نشد و فقط از محیط کشت HTF حاوی BSA 4 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد.

-گروه کنترل (سالم) شامل ۱۰ عدد موش که برای لقاح و کشت جنینی از محیط کشت HTF حاوی ۱۰۰ میکرومول ویتامین C استفاده شد.

-گروه پلی‌کیستیک شامل ۱۰ عدد موش که به‌وسیله استرادیول والرات پلی‌کیستیک شده بودند که برای لقاح و کشت جنینی از محیط کشت HTF حاوی ۱۰۰ میکرومول ویتامینC استفاده شد.

-گروه کنترل (سالم) شامل ۱۰عدد موش که برای لقاح و کشت جنینی از محیط کشت HTF حاوی ۱۵۰ میکرومول ویتامین C استفاده شد.

-گروه پلی‌کیستیک شامل ۱۰ عدد موش که به‌وسیله استرادیول والرات پلی‌کیستیک شده بودند که برای لقاح و کشت جنینی از محیط کشت HTF حاوی ۱۵۰ میکرومول ویتامینC استفاده شد.

-گروه کنترل (سالم) شامل ۱۰عدد موش که برای لقاح و کشت جنینی از محیط کشت HTF حاوی ۲۰۰ میکرومول ویتامین C استفاده شد.

- گروه پلی‌کیستیک شامل ۱۰ عدد موش که به‌وسیله استرادیول والرات پلی‌کیستیک شده بودند که برای لقاح و کشت جنینی از محیط کشت HTF حاوی ۲۰۰ میکرومول ویتامینC استفاده شد.

اسپرم‌های متحرک به‌توانایی‌رسیده به تعداد ۱ میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد. عمل لقاح حدود ۶-۸ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم با مشاهده ۲ پیش هسته مشخص می‌شود و بدین ترتیب زیگوت به دست آمد و تخمک‌های بارورشده (زیگوت) بعد از شست‌وشو به محیط کشت تازه از قبل به تعادل‌رسیده در گروه‌های مختلف مورد مطالعه منتقل می‌شود. بررسی میزان شکافتگی، ۲۴ ساعت پس از کشت صورت گرفت و روند رشد جنینی در گروه‌ها طی ۱۲۰ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند و در مرحله بعدی درصد موفقیت لقاح و روند رشد جنین تخمک‌های گروه پلی‌کیستیک و کنترل (سالم) با افزودن دُزهای مختلف ویتامین C به محیط کشت، لقاح و رشد جنینی ارزیابی شد. جنین‌ها در هر گروه ازنظر میزان فراگمانتاسیون و میزان طی مراحل رشد جنینی و تعداد جنین‌های متوقف‌شده و تیپ‌بندی جنین‌های متوقف‌شده باتوجه‌به فاکتورهای مختلفی نظیر لیز شدن جنین‌ها و نکروتیک بودن آن‌ها و فراگمانتاسیون و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمیک مقایسه شدند. تیپ‌بندی جنین‌های متوقف‌شده به شرح ذیل می‌باشد:

تیپ I: جنین‌های بالیز، فراگمانته شدن و نکروتیک بودن کامل؛

تیپII: جنین‌های بالیز، فراگمانته شدن در تعدادی از بلاستومرهامی‌باشد.

برای مقایسه آماری رشد جنینی و سایر مراحل مختلف تکوین در بین گروه‌های مختلف داده‌ها بااستفاده‌از نسخه ۱۶ نرم‌افزار مینی تب و روش آماری ۲-پروپورشن (مقایسه نسبت‌ها) با سطح معناداری (P<۰/۰۵) تجزیه‌وتحلیل شدند. برای ارزیابی روند لقاح و روند رشد جنینی، از میکروسکوپ فاز کنتراست و اینورت استفاده شد و مراحل رشد جنینی در طی ۱۲۰ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج نشان دادند اضافه کردن دُزهای مختلف ویتامینC موردمطالعه در این تحقیق به محیط کشت جنینی گروه کنترل تفاوت معناداری در درصد لقاح و روند رشد جنینی نسبت به گروه کنترل بدون آنتی‌اکسیدان نشان نداد (P<۰/۰۵) (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۱). براساس نتایج به‌دست‌آمده تجویز استرادیول والرات و پلی‌کیستیک شدن موش‌ها به‌واسطه آن باعث کاهش معنادار درصد لقاح از ۹۵/۴۳ در گروه کنترل به ۷۷/۵۹ در گروه پلی‌کیستیک شد (P<۰/۰۵) که نشان از کاهش قدرت باروری در گروه پلی‌کیستیک‌شده دارد. مقایسه درصد لقاح نشان داد افزودن ویتامین C به محیط کشت گروه پلی‌کیستیک باعث افزایش درصد لقاح نسبت به گروه پلی‌کیستیکی که محیط کشت آن آنتی‌اکسیدان نداشت، می‌شود و این افزایش در مورد دُز مصرفی۲۰۰ میکرومول (۸۵/۵۸) نسبت به گروه پلی‌کیستیک (۷۷/۵۹) معنادار بود که احتمالاً ناشی از بهبود

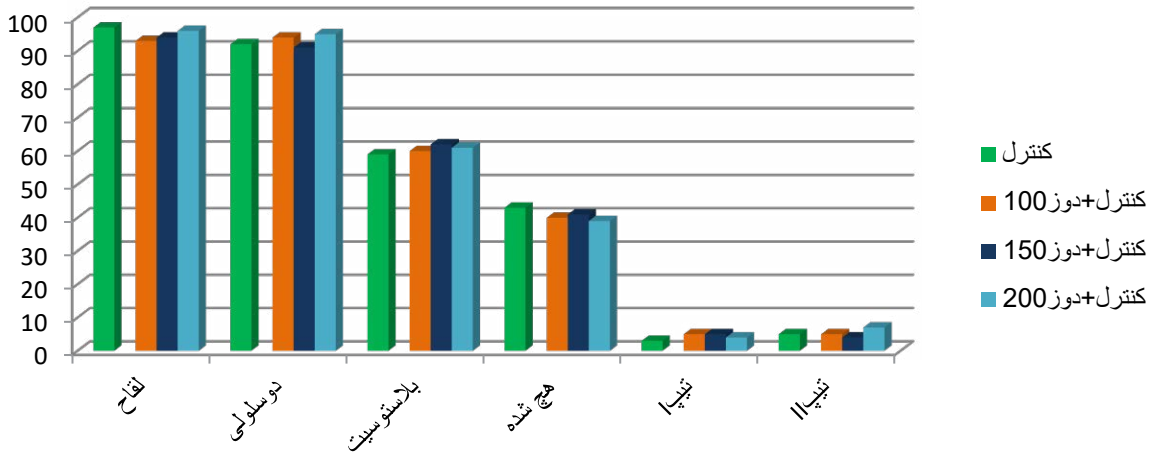
جدول ۱. مقایسه اثرات دُزهای مختلف آنتی‌اکسیدانی ویتامین C بر لقاح داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنینی در اووسیت‌های حاصل از موش‌های سوری سالم گروه کنترل

گروه	تعداد		درصد				
	اووسیت مناسب	لقاح	دوسلولی	بلاستوسیت	هچ‌شده	تیپ‌I	تیپ‌II
کنترل	۱۹۷	۹۵/۴۳	۹۲/۵۵	۵۹/۰۴	۴۳/۰۸	۳/۱۹	۵/۳۲
کنترل+ویتامین C ۱۰۰ (میکرومول)	۱۳۶	۹۳/۳۸	۹۴/۴۹	۶۰/۶۳	۴۰/۱۶	۴/۷۲	۵/۵۱
کنترل+ویتامین C ۱۵۰ (میکرومول)	۱۱۳	۹۳/۸۰	۹۱/۵۱	۶۱/۳۲	۴۱/۵۱	۴/۷۲	۴/۷۲
کنترل+ویتامین C ۲۰۰ (میکرومول)	۱۰۲	۹۶/۰۸	۹۴/۹۰	۶۱/۲۲	۳۹/۷۹	۴/۰۸	۷/۱۴

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

-روش آماری ۲-پروپورشن (مقایسه نسبت‌ها) مورد استفاده قرار گرفته است. داده‌ها براساس P<۰/۵۰ معنادار تلقی می‌شوند، ازنظر آماری اختلاف معناداری در بین گروه‌ها مشاهده نشد.

آسیب‌های ایجادشده سندرم پلی‌کیستیک به‌وسیله آنتی‌اکسیدان مورداستفاده در محیط کشت بوده است. مقایسه درصد جنین‌های دوسلولی ایجادشده که نشان‌دهنده شروع شکافتگی است، مشخص کرد تجویز استرادیول در گروه پلی‌کیستیک باعث کاهش معنادار درصد این جنین‌ها از (۹۲/۵۵) در گروه کنترل به (۵۹/۳۶) در گروه پلی‌کیستیک شد (P<۰/۰۵). درصد جنین‌های دوسلولی در گروه‌های پلی‌کیستیک در هر ۳ دُز موردمطالعه ویتامین C افزایش معنادار نسبت به گروه پلی‌کیستیکی که محیط کشت آن فاقد آنتی‌اکسیدان بود، شد (P<۰/۰۵). بررسی درصد جنین‌هایی که پس از ۱۲۰ ساعت به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند، مشخص کرد تجویز استرادیول در گروه پلی‌کیستیک باعث کاهش کاملاً معنادار درصد این جنین‌ها از (۵۹/۰۴) در گروه کنترل به (۲۶/۰۸) در گروه پلی‌کیستیک شده است (P<۰/۰۵). همچنین نتایج نشان داد افزودن ویتامین C به محیط کشت گروه پلی‌کیستیک باعث افزایش درصد بلاستوسیت نسبت به گروه پلی‌کیستیکی که محیط کشت آن آنتی‌اکسیدان نداشت، می‌شود و این افزایش در مورد هر ۳ دُز ویتامین C اضافه‌شده به محیط کشت گروه‌های پلی‌کیستیک نسبت به گروه پلی‌کیستیک بدون آنتی‌اکسیدان معنادار بود (P<۰/۰۵). مقایسه درصد جنین‌های هچ‌شده (خارج‌شده از پوسته خود) مشخص کرد تجویز استرادیول در گروه پلی‌کیستیک باعث کاهش کاملاً معنادار درصد این جنین‌ها



مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۱. مقایسه نتایج توان باروری داخل آزمایشگاهی در گروه‌های مختلف کنترل موردمطالعه در طی ۱۲۰ساعت از رشد جنینی
- روش آماری ۲-پروپورشن(مقایسه نسبت‌ها) مورد استفاده قرار گرفته است. داده‌ها براساس P<۰/۰۵ معنادار تلقی می‌شوند، ازنظر آماری اختلاف معناداری در بین گروه‌ها مشاهده نشد. ستون عمودی نمودار به‌صورت درصد در نظر گرفته شده است. دُزهای یادشده به‌صورت میکرومول از آنتی‌اکسیدان موردمطالعه (ویتامینC) می‌باشد.
-محور عمودی نمودار درصد پیشرفت جنین‌ها در هر مرحله و محور افقی مراحل مختلف رشد جنینی نشان می‌دهد.

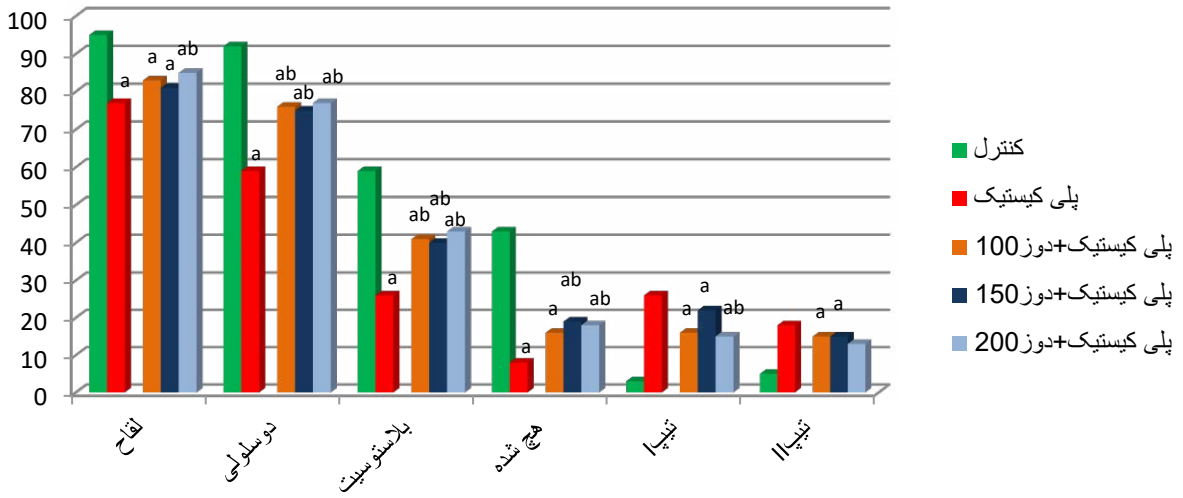
جدول ۲. مقایسه اثرات دُزهای مختلف آنتی‌اکسیدان ویتامین C بر لقاح داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنینی اووسیت‌های حاصل از پلی‌کیستیک تجربی ایجادشده توسط استرادیول والرات

گروه	نعداد		درصد				
	اووسیت مناسب	لقاح	دوسلولی	بلاستوسیت	هچ‌شده‌ها	تیپ‌I	تیپ‌II
کنترل	۱۹۷	۹۵/ ۴۳	۹۲/۵۵	۵۹/۰۴	۴۳/۰۸	۳/۱۹	۵/۳۲
پلی‌کیستیک	۴۰۶	a ۷۷/۵۹	a ۵۹/۳۶	a ۲۶/۰۳	a ۸/۵۷	۲۵/۴۰	۱۷/۷۸
پلی‌کیستیک+ویتامین C ۱۰۰(میکرومول)	۱۰۵	a ۸۲/۸۶	ab ۷۵/۸۶	ab ۴۱/۳۸	a ۱۶/۰۹	ab ۱۶/۰۹	a ۱۴/۹۴
پلی‌کیستیک+ویتامین C ۱۵۰ (میکرومول)	۱۱۵	a ۸۰/۸۷	ab ۷۴/۱۹	ab ۴۰/۸۶	ab ۱۸/۲۸	a ۲۱/۵۰	a ۱۵/۰۵
پلی‌کیستیک+ویتامین C ۲۰۰ (میکرومول)	۱۱۱	ab ۸۵/۵۸	ab ۷۶/۸۴	ab ۴۳/۱۶	ab ۱۷/۸۹	ab ۱۴/۷۴	۱۲/۶۳

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

– روش آماری ۲-پروپورشن(مقایسه نسبت‌ها) مورد استفاده قرار گرفته است. داده‌ها براساس P<۰/۰۵ معنادار تلقی می‌شوند، a: نشان‌دهنده معنادار بودن با گروه کنترل و b: نشان‌دهنده معنادار بودن با گروه پلی‌کیستیک می‌باشد.

از (۴۳/۰۸) در گروه کنترل به (۸/۵۷) در گروه پلی‌کیستیک شد (P<۰/۰۵). همچنین نتایج نشان داد افزودن ویتامین C به محیط کشت گروه پلی‌کیستیک باعث افزایش درصد جنین‌های هچ‌شده نسبت به گروه پلی‌کیستیکی که محیط کشت آن آنتی‌اکسیدان نداشت، می‌شود و این افزایش در مورد دُز مصرفی ۲۰۰ و ۱۵۰ میکرومول نسبت به گروه پلی‌کیستیک معنادار بود (P<۰/۰۵). درصد جنین‌های تیپ‌I و II در گروه پلی‌کیستیک نسبت به گروه کنترل افزایش داشت که این افزایش معنادار نبود (P<۰/۰۵). همچنین مقایسه درصدهای حاصل از جنین‌های تیپ‌I در گروه‌های پلی‌کیستیکی که محیط کشت حاوی آنتی‌اکسیدان داشتند، نشان داد افزودن آنتی اکسیدان توانسته باعث کاهش این نوع جنین‌ها نسبت به گروه پلی‌کستیک بدون آنتی‌اکسیدان شود و این کاهش در دُزهای مصرفی ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول ویتامین C نسبت به گروه پلی‌کیستیک معنادار بود (P<۰/۰۵). همچنین مقایسه درصدهای حاصل از جنین‌های تیپ‌II در گروه‌های پلی‌کیستیکی که محیط کشت حاوی آنتی‌اکسیدان داشتند، نشان داد افزودن آنتی‌اکسیدان توانسته باعث کاهش این نوع جنین‌ها نسبت به گروه پلی‌کستیک فاقد آنتی‌اکسیدان شود



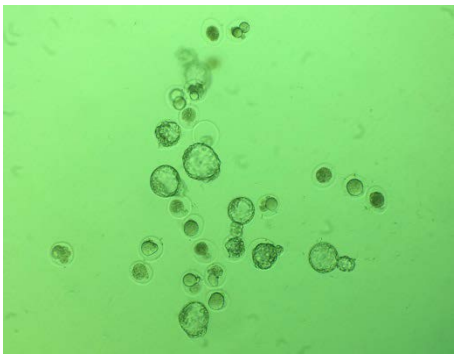
تصویر ۲. مقایسه نتایج توان باروری داخل آزمایشگاهی در گروه‌های مختلف پلی‌کیستیک موردمطالعه در طی ۱۲۰ ساعت از رشد جنینی

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

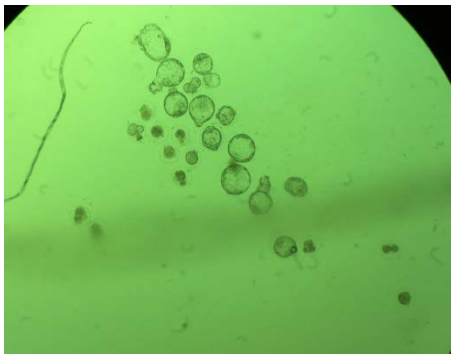
– روش آماری ۲-پروپورشن (مقایسه نسبت‌ها) مورد استفاده قرار گرفته است. داده‌ها براساس P<۰/۵۰ معنادار تلقی می‌شوند، a: نشان‌دهنده معنادار بودن با گروه کنترل است.b: نشان‌دهنده معنادار بودن با گروه پلی‌کیستیک است.

– دُزهای یادشده به‌صورت میکرومول از آنتی‌اکسیدان موردمطالعه (ویتامین C) می‌باشد.

– محور عمودی نمودار درصد پیشرفت جنین‌ها در هر مرحله و محور افقی مراحل مختلف رشد جنینی را نشان می‌دهد.



A



B

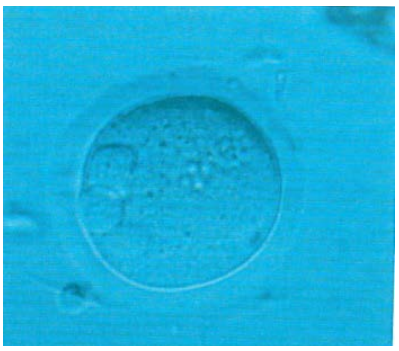
تصویر ۳. رویان ها در گروه‌های مورد مطالعه در طی ۱۲۰ ساعت از کشت جنینی
A: رویان‌ها در گروه پلی‌کیستیک که تنها تعداد کمی از آن‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده‌اند و تعداد زیادی از آن‌ها در مراحل مختلف جنینی متوقف شده و جنین‌های حاصله دارای کیفیت مناسبی ازنظر مورفولوژی نمی‌باشند) بزرگ‌نمایی ۱۰۰x میکروسکوپ اینورت (B: رویان‌ها در گروه اووسیت‌های حاصل از موش‌های مبتلا به پلی‌کیستیک تجربی ایجادشده توسط استرادیول والرلات که به محیط کشت جنینی آن‌ها ویتامین C اضافه شده است که تعداد زیادی از آن‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده‌اند و جنین‌های حاصله دارای کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی می‌باشند (بزرگ‌نمایی ۱۰۰x میکروسکوپ اینورت).

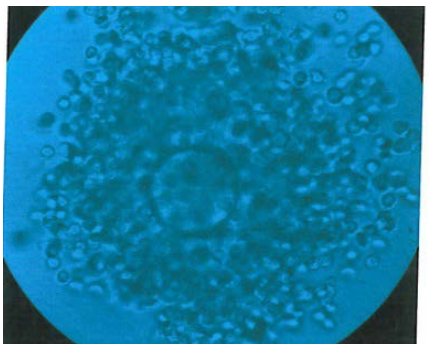
و این کاهش در هیچ‌کدام از دُزهای مصرفی ویتامین C نسبت به گروه پلی‌کیستیک معنادار نبود. همچنین گروه‌های پلی‌کیستیک که دُزهای مختلف ویتا مین C به محیط کشت جنینی آن‌ها افزوده شده بود، در مقایسه با یکدیگر تفاوت معناداری نشان ندادند ($P<0/05$) (جدول شماره ۲ و تصویر شماره ۲).

تصویر شماره ۳ تخمک به همراه توده کومولوسی همراه آن (راست)، تخمک لقاح یافته (زیگوت)، که اجسام قطبی و ۲ پیش‌هسته در آن قابل‌مشاهده است (چپ) و تصویر شماره ۴ رویان‌ها در گروه‌های موردمطالعه در طی ۱۲۰ ساعت از کشت

بحث

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵ آگاروال و همکاران نقش استرس اکسیداتیو را بر تولیدمثل جنس ماده بررسی کردند که در یک بدن سالم گونه‌های فعال اکسیژن و آنتی‌اکسیدان‌ها در تعادل هستند. وقتی این تعادل به هم بخورد استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود که در زنان هم بر سیستم تولیدمثلی و حتی چرخه‌های قاعدگی اثر می‌گذارد [۱۰]. گنگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ به مطالعه استرس اکسیداتیو در تخمدان‌های موش صحرایی مدل پلی‌کیستیک پرداختند. آن‌ها بیان کردند که در منحنی‌های رشد وزن تخمدان و وزن رحم، بین مدل پلی‌کیستیک و کنترل تفاوت معناداری وجود داشت [۱۱]. موری و همکاران در سال ۲۰۱۳ مارکرهای مربوط به استرس اکسیداتیو و پلی‌کیستیک را در انسان بررسی کردند. آن‌ها بیان کردند زنان مبتلا به پلی‌کیستیک مستقل از افزایش وزن دارای مارکرهای در گردش استرس اکسیداتیو غیرنرمال هستند و براساس این یافته‌ها پیشنهاد کردند گونه‌های فعال اکسیژن ممکن است در پاتوفیزیولوژی این اختلال شایع (پلی‌کیستیک) نقش مهمی داشته باشد. مدل





تصویر ٤. تخمک به همراه توده کومولوسی همراه آن(راست) ، تخمک لقاح یافته (زیگوت)، که اجسام قطبی و دو پیش هسته در آن قابل مشاهده است (چپ).
– درشت نمایی ۱۰۰x میکروسکوپ اینورت

پلی‌کیستیک به‌عنوان یک مدل برای افزایش سطح اکسیدان‌ها و کاهش ظرفیت اکسیدانی کل[5] در نظر گرفته می‌شود. همچنین اعلام کردند میزان آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی در گروه پلی‌کیستیک کاهش و در گروه کنترل تفاوت معناداری داشت. همچنین میزان گونه‌های فعال اکسیژن در گروه پلی‌کیستیک افزایش و تفاوت معناداری با گروه کنترل داشت [۱۲].

در سال ۲۰۰۸ جیمز و همکاران بیان کردند گونه‌های فعال اکسیژن هم بر بلوغ اووسیت، لقاح، تکوین جنین و حاملگی تأثیر منفی دارد. مایعات فولیکولی و اویداکتی غنی از پاک‌کننده‌های مشتقات اکسیژنی می‌باشند که اووسیت‌ها و جنین‌ها را از آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند. زمانی که اووسیت‌ها و جنین‌ها در شرایط آزمایشگاهی کشت می‌شوند، فاقد این تیم‌های دفاعی طبیعی خواهند بود. بنابراین محافظت جنین در طی کشت داخل آزمایشگاهی در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌وسیله افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط کشت جهت افزایش رشد جنینی ضروری می‌باشد [۱۳].

تحقیقات قبلی نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در افزایش کیفیت اووسیت‌های حاصل از تخمدان پلی‌کیستیک و متعاقب آن افزایش موفقیت لقاح و رشد جنینی دارد. در تحقیقات میشل و همکاران بر روی تخمک خوک نشان داده شد با مصرف غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از ویتامین C درصد تکامل بلاستوسیت خوک نیز افزایش پیدا کرده و شاخص آپوپتوز در آن کاهش پیدا کرده است [۸] و همچنین بر اساس مطالعه وانگ و همکاران ویتامین C در روند تکاملی و نرخ توسعه بلاستوسیت موش مؤثرتر از ویتامین E می‌باشد [۱۴].

در سال ۲۰۱۷ ال شیما به مطالعه اثر ویتامین C و سیستئین بر تکوین داخل آزمایشگاهی در جنین‌های بوفالو پرداختند و به این نتیجه رسیدند که افزودن ویتامین C همراه با سیستئین تأثیر بیشتری بر تکوین جنین دارد، درحالی‌که این اثر مثبت در غیاب سیستئین کمتر بود [۱۵]. برزگر و همکاران بیان کرده‌اند اسید آسکوربیک سبب افزایش بلوغ فولیکول و اووسیت موش می‌شود [۱۶]. در مطالعه‌ای که موسومسی و همکاران انجام دادند به نیاز به مواد معدنی پیش از بارداری و در طول بارداری تأکیدشده ازجمله ویتامین C که در رشد و تکامل جنین مؤثر است و این موضوع نیز تأییدی بر مطالعه حاضر و تأثیر این ویتامین بر بهبود کیفیت جنین می‌باشد [۱۷].

نتیجه‌گیری

القای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک سبب ایجاد کیست‌های فولیکولی، تکوین غیرطبیعی فولیکول‌ها و افزایش سطح اندروژن‌ها و به دنبال آن بر تعداد و کیفیت اووسیت‌های حاصله و پارامترهای مربوط به باروری و رشد جنین اثر نامطلوبی دارد که نتایج حاصله از این تحقیق نشان می‌دهد ویتامین C توانسته اثرات محافظتی داشته باشد. به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از آنتی‌اکسیدان ویتامین C در محیط کشت جنینی، به‌دلیل مواد مؤثره آنتی‌اکسیدانتی خود اثرات جانبی سوء متأثر از تخمدان پلی‌کیستیک بر کیفیت اووسیت‌های حاصله و اختلال در باروری و رشد جنینی آن‌ها را بهبود می‌بخشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

مقاله حاضر حاصل بخشی از پایان‌نامه در مقطع دکترای تخصصی رشته جنین‌شناسی و آناتومی مقایسه‌ای (مصوب تیر ۱۳۹۸) دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه می‌باشد و همه ملاحظات اخلاقی در این مقاله رعایت شده است.

حامی مالی

این پژوهش با حمایت دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام شد.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به‌دلیل حمایت‌های مادی و معنوی تشکر و تقدیر می‌شود.

5. TAC

References

[1] Tahmasebi F, Movahedin M, Mazaheri Z. [Poly cystic ovary model as an elevated oxidative stress factor (Persian)]. J Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 25(127):82-91. [Link]

[2] Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: Etiology, pathogenesis and diagnosis. Nat Rev Endocrinol. 2011; 7(4):219-31. [DOI:10.1038/nrendo.2010.217] [PMID]

[3] Panti AA, Shehu CE, Saidu Y, Tunau KA, Nwobodo EI, Jimoh A, et al. Oxidative stress and outcome of antioxidant supplementation in patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS). Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol. 2018; 7(5):1667-72. [DOI:10.18203/2320-1770.ijrcog20181892]

[4] Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update. 2001; 7(2):175-89. [DOI:10.1093/humupd/7.2.175] [PMID]

[5] Nadri B, Zeinoaldini S, Kohram H. Ascorbic acid effects on in vitro maturation of mouse oocyte with or without cumulus cell. Afr J Biotechnol. 2009; 8(20):5627-31. [Link]

[6] Griesinger G, Franke K, Kinast C, Kutzelnigg A, Riedinger S, Kulin S, et al. Ascorbic acid supplement during luteal phase in IVF. J Assist Reprod Genet. 2002; 19(4):164-8. [DOI:10.1023/A:1014837811353] [PMID] [PMCID]

[7] Lu X, Wu Z, Wang M, Cheng W. Effects of vitamin C on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer in endometriosis: A randomized controlled study. J Int Med Res. 2018; 46(11):4624-33. [DOI:10.1177/0300060518786918] [PMID]

[8] Kere M, Siriboon C, Lo NW, Nguyen NT, Ju JC. Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation. J Reprod Dev. 2013; 59(1):78-84. [DOI:10.1262/jrd.2012-114] [PMID]

[9] Öztürkler Y, Yıldız S, Güngör Ö, Pancarcı ŞM, Kaçar C, Ari UÇ. The effects of L-ergothioneine and L-ascorbic acid on the in vitro maturation (IVM) and embryonic development (IVC) of sheep oocytes. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2010; 16(5):757-63. [DOI:10.9775/kvfd.2009.1646]

[10] Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol. 2005; 3:28. [DOI:10.1186/1477-7827-3-28] [PMID]

[11] Gong J, Wu DB, Zhang LL, Li J, Zhao X, Zhang D. [Study on the oxidative stress in the ovaries of a rat model of polycystic ovary (Chinese)]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2015; 46(2):238-47. [PMID]

[12] Murri M, Luque-Ramírez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): A systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2013; 19(3):268-88. [DOI:10.1093/humupd/dms059] [PMID]

[13] Whitaker BD, Knight JW. Mechanisms of oxidative stress in porcine oocytes and the role of anti-oxidants. Reprod Fertil Dev. 2008; 20(6):694-702. [DOI:10.1071/RD08037] [PMID]

[14] Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. Fertil Steril. 2002; 78(6):1272-7. [DOI:10.1016/S0015-0282(02)04236-X] [PMID]

[15] El AS, Naby KM, Sosa GA, Abouel-Roos ME, Ahmed YF. Effect of using ascorbic acid and cysteamine supplementation on in-vitro development of buffalo embryos. Asian Pac J Reprod. 2017; 6(2):85-8. [DOI:10.12980/apjr.6.20170207]

[16] Barzegari Firouzabadi F. [Effects of ascorbic acid and FSH on the maturation of mice's oocytes and follicles (Persian)]. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2011; 19(5):586-97. [Link]

[17] Musumeci G, Castrogiovanni P, Trovato FM, Parenti R, Szychlinska MA, Imbesi R. Pregnancy, embryo-fetal development and nutrition: Physiology around fetal programming. J Histol Histopathol. 2015; 2(1):1-6. [DOI:10.7243/2055-091X-2-1]