مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱٤، شماره ۳: از ٤۳-۵۰
پاییز ۱۳۹۰

بررسی پراکندگی میتوکندری تخمک موش در مراحل مختلف تکوین با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال

مژده صالح‌نیا[1*]

۱- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۹۰/۰۴/۰۴ پذیرش مقاله: ۹۰/۰۷/۰۲

چکیده

هدف: میتوکندری یکی از مهم‌ترین اندامک‌های سیتوپلاسمی است و با توجه به اهمیت میتوکندری در تکوین تخمک، در این مطالعه با به‌کارگیری میکروسکوپ لیزر کانفوکال به بررسی و مقایسه پراکندگی میتوکندری تخمک موش در سه مرحله تکوینی ژرمینال وزیکول، شکست ژرمینال وزیکول یا متافاز یک و متافاز دو پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: پس از تحریک تخمک‌گذاری موش‌های سوری نژاد FVB/N با سن ٦-۷ هفته با ۷/۵ واحد PMSG تخمک‌ها در مراحل ژرمینال وزیکول و شکست ژرمینال وزیکول یا متافاز یک و متافاز دو از تخمدان، با استفاده از روش مکانیکی جداسازی شدند. سپس تخمک‌ها با محلول رنگ JC-1 یا 5,5´,6,6´-tetrachloro-1,1,3,3´-tetraethylbenzimidazolycarbocyanine iodide (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد رنگ‌آمیزی شدند و بعد نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ لیزر کانفوکال با طول موج ۵۱۵- ۵۳۰ نانومتر برای رنگ سبز مشاهده شد.

نتایج: در تخمک مرحله شکست ژرمینال وزیکول و متافاز دوم الگوی نسبتاً یکنواخت دیده شد و میتوکندری‌ها به شکل نقاط سبز رنگ در تمام سیتوپلاسم به شکل یکسان پراکندگی داشتند اما در تخمک ژرمینال وزیکول الگوی غیریکنواخت به چشم می‌خورد و تعدادی از میتوکندری‌ها به شکل حلقه در اطراف هسته تخمک قرار گرفته بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر به‌طور کلی دو الگوی توزیع میتوکندری در تخمک موش در مراحل مختلف تکوینی نشان داد. به‌نظر می‌رسد که یکی از اصلی‌ترین عوامل در نحوه پراکندگی میتوکندری درون سلول نیاز مناطق مختلف سلول به تولید ATP و مصرف انرژی باشد.

کلیدواژگان: میتوکندری، تخمک ژرمینال وزیکول، تخمک متافاز یک، تخمک متافاز دوم

۱- مقدمه

میتوکندری مستقیماً در متابولیسم انرژی، تعادل، رشد و مرگ سلولی نقش دارد و بهترین و شناخته‌ترین عملکرد آن تولید ATP از طریق اکسیداتیو فسفریلاسیون است؛ مکانیسمی که از طریق آن به شکل همزمان اکسیداسیون مواد مغذی و مواد آلی همراه با فسفریلاسیون ADP (Adenosine Diphosphate) رخ می‌دهد [۱] و همچنین میتوکندری در تولید حرارت [۲] و

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: salehnim@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

مرگ برنامه‌ریزی شده [۳] دخالت دارد.

تقریباً در سیتوپلاسم همه سلول‌های یوکاریوتی میتوکندری وجود دارد و از نظر اندازه، شکل، تراکم و پراکندگی متفاوت است اما معمولاً این اندامک شبکه لوله‌ای (Tubular Network) فعالی را در سلول تشکیل می‌دهد [٤].

میتوکندری‌ها در چندین فرایند تولیدمثل نقش دارند به همین دلیل موقعیت آن‌ها می‌تواند بر کیفیت تخمک و لقاح و به دنبال آن تکوین جنین تأثیر گذار باشد و شواهدی وجود دارد که میتوکندری نقش مهمی را در ناباروری مردان و زنان دارد [۵-۷].

تخمک طی تکوین خود برای مدت حدود ۵۰ سال غیرفعال بوده اما ناگهان دچار تغییرات رشدی شده و قطری از ۳۰ تا ۱۲۰ میکرون به‌دست می‌آورد و در این مرحله تخمک حاوی پروتئین‌ها، RNA، مواد حاوی انرژی و نیز اندامک‌های لازم برای تکوین جنین می‌شود. رشد سیتوپلاسمی تخمک می‌تواند همراه با افزایش توده میتوکندری آن نیز باشد [۸]. میتوکندری تخمک دارای چندین خصوصیت ویژه است از جمله فنوتیب غیرتمایزی آن که در برش عرضی نمای مدور دارد. در تمام پستانداران میتوکندری در تخمک متافاز دوم اندامک کوچک و گردی است که دارای کریستاهای کمی است [۵]. این ویژگی‌ها بیانگر میزان تولید ATP کمی توسط این اندامک است [۸] و میتوکندری در این مرحله در میان سیتوپلاسم تخمک پراکنده شده است [۹].

پس از لقاح ساختمان داخلی میتوکندری خیلی تغییر نمی‌کند اما محل آن‌ها تغییر می‌کند و مجدداً اطراف هسته منتقل می‌شوند تا انرژی لازم را تولید کند و این عمل همچنان ادامه دارد تا اولین تقسیم رخ دهد [۱۰، ۱۱] جابه‌جایی نامناسب میتوکندری پس از لقاح می‌تواند باعث جلوگیری از تکوین مناسب جنین شود و چنین وضعیتی در مورد جنین‌هایی که در مرحله پیش هسته متوقف شده‌اند نشان داده شده یعنی میتوکندری آن‌ها به‌طور مناسب جابه‌جا نشده است [۹].

با وجود پیشرفت روش‌هایی که در زمینه درمان ناباروری است اما موفقیت در این زمینه کم است شاید یکی از علل آن محدودیت‌های ارزیابی کیفیت تخمک است. بلوغ تخمک شامل بلوغ هسته‌ای و سیتو پلاسمی است که هر دو برای لقاح و نمو رویان اهمیت دارد [۱۲]. شاید بتوان به راحتی بلوغ هسته تخمک را از روی وجود جسم قطبی نشان داد اما بلوغ سیتوپلاسم تخمک را نمی‌توان به راحتی ارزیابی کرد. بلوغ سیتوپلاسمی شامل توزیع مجدد یک سری از اندامک‌ها از جمله میتوکندری، ریبوزوم، شبکه اندوپلاسمی، گرانول‌های قشری و گلژی کمپلکس است [۱۳].

به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اندامک‌های سیتوپلاسمی، نقش میتوکندری در بلوغ سیتوپلاسمی دارای اهمیت است. تغییر در الگوی توزیع میتوکندری می‌تواند روی توانایی نمو جنین حاصل از تخمک‌ها اثرگذار باشد [١٤، ١٥].

با توجه به اهمیت میتوکندری در تکوین تخمک و گزارش‌های محدود و متناقضی که در گونه‌های مختلف پستانداران وجود دارد، در این مطالعه با به‌کارگیری میکروسکوپ لیزر کانفوکال به بررسی و مقایسه پراکندگی میتوکندری تخمک موش در سه مرحله تکوینی ژرمینال وزیکول (Germinal Vesicle: GV)، شکست ژرمینال وزیکول (Germinal Vesicle Breakdown: GVBD) یا متافاز یک (Metaphase I: MI) و متافاز دو (MII) پرداخته شد.

۲- مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش سوری نژاد FVB/N با سن ٦-۷ هفته استفاده شد. حیوانات در حیوان‌خانه دانشگاه کارولینسکا (کشور سوئد) به‌مدت یک هفته نگهداری شدند تا با شرایط جدید سازگار شوند.

برای تحریک تخمک‌گذاری ۷/۵ واحد PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) (Intervet Australia) به هر موش به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. ٤۸ ساعت بعد موش‌های فوق به روش قطع نخاع گردنی کشته شدند. با ایجاد شکاف طولی در ناحیه شکم تخمدان‌های آن‌ها از بدن خارج و در قطرات ۲۰۰ میکرولیتری محیط کشت TCM حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی یا BSA (Bovine

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

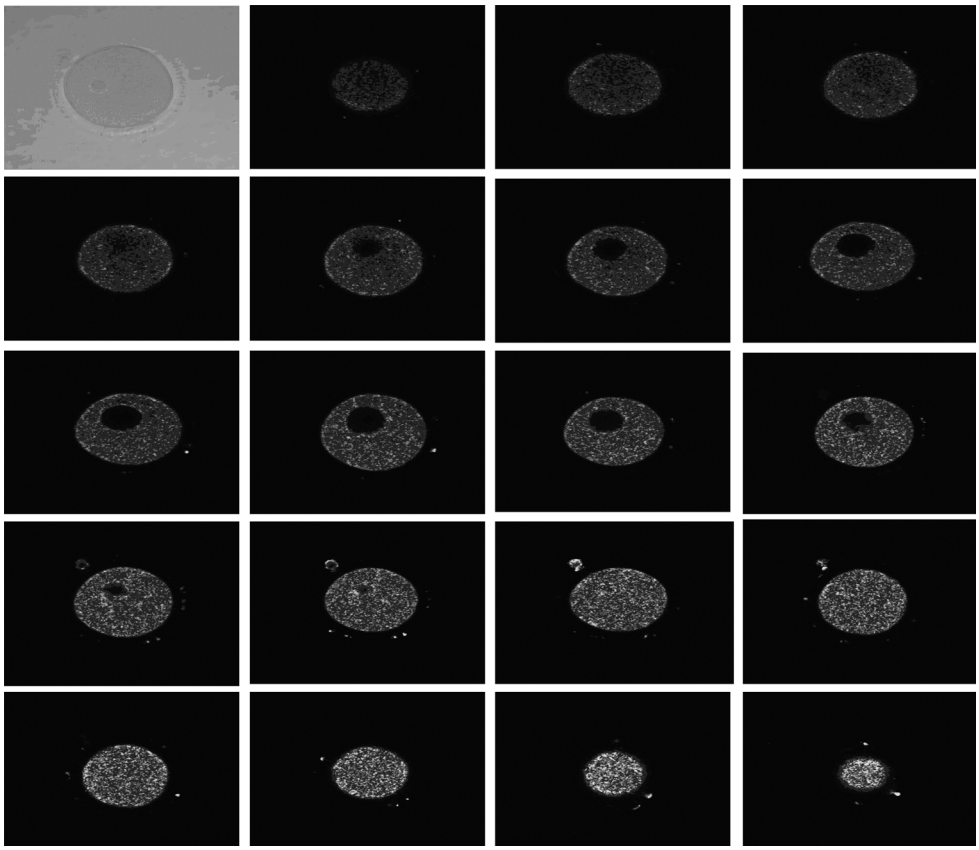
(Serum Albumin) قرار داده شدند.

۲-۱- جداسازی تخمک‌ها در مراحل مختلف از تخمدان

برای جداسازی تخمک‌ها در مراحل GV، GVBD یا MI و MII از تخمدان، از روش مکانیکی استفاده شد و با استفاده از سوزن‌های انسولین (29G) در زیر استریومیکروسکوپ این عمل انجام گرفت.

۲-۲- رنگ‌آمیزی میتوکندری‌های تخمک

برای این منظور ابتدا محلول ذخیره رنگ JC-1 یا 5,5′6,6′- tetrachloro-1,1,3,3′-tetraethylbenzimidazolycarbocyanine iodide (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) آماده شد. برای این کار ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رنگ JC-1 در دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) حل شد، سپس موقع استفاده ده برابر آن را در محیط کشت TCM (Tissue Culture Medium) از قبل گرم شده رقیق شد (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر). لازم بود این مرحله با کمک ورتکس (Vortex) یا همزن انجام شود. سپس تخمک‌ها در سه مرحله تکوینی (n= ۵ در هر گروه) به تفکیک با به‌کارگیری ترکیب آماده شده به‌مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد رنگ شدند. سپس نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ لیزر کانفوکال (LSCM; Olympus, Segrate, Italy) با طول موج ۵۱۵-۵۳۰ نانومتر برای رنگ سبز مشاهده شد [۱۶، ۱۷] تصاویر متوالی با ضخامت ۳ میکرون از تخمک‌ها در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. و پراکندگی میتوکندری‌ها به‌طور متوالی در بخش‌های مختلف سیتوپلاسم تخمک در سه مرحله تکوینی با یکدیگر مقایسه شد.

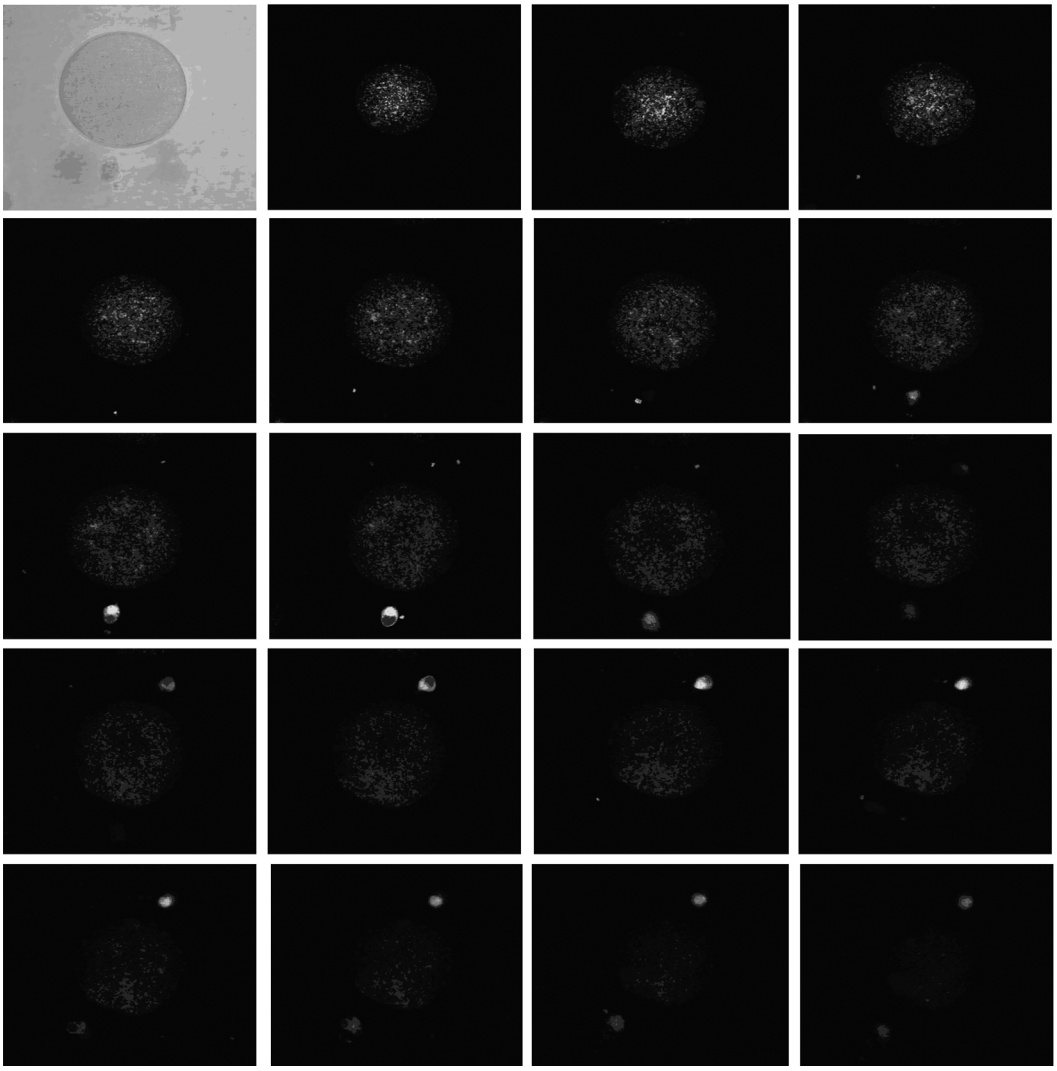


شکل ۱ برش‌های با توالی سه میکرون از تخمک مرحله GV موش با رنگ‌آمیزی JC-1 که در تصویر اول نمای فاز کنتراست همان تخمک مشخص شده است. پراکندگی غیریکنواخت میتوکندری‌ها در تخمک به شکل نقاط سبز رنگ قابل مشاهده است که بخشی از آن‌ها به شکل حلقه در اطراف هسته تخمک تجمع دارند.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

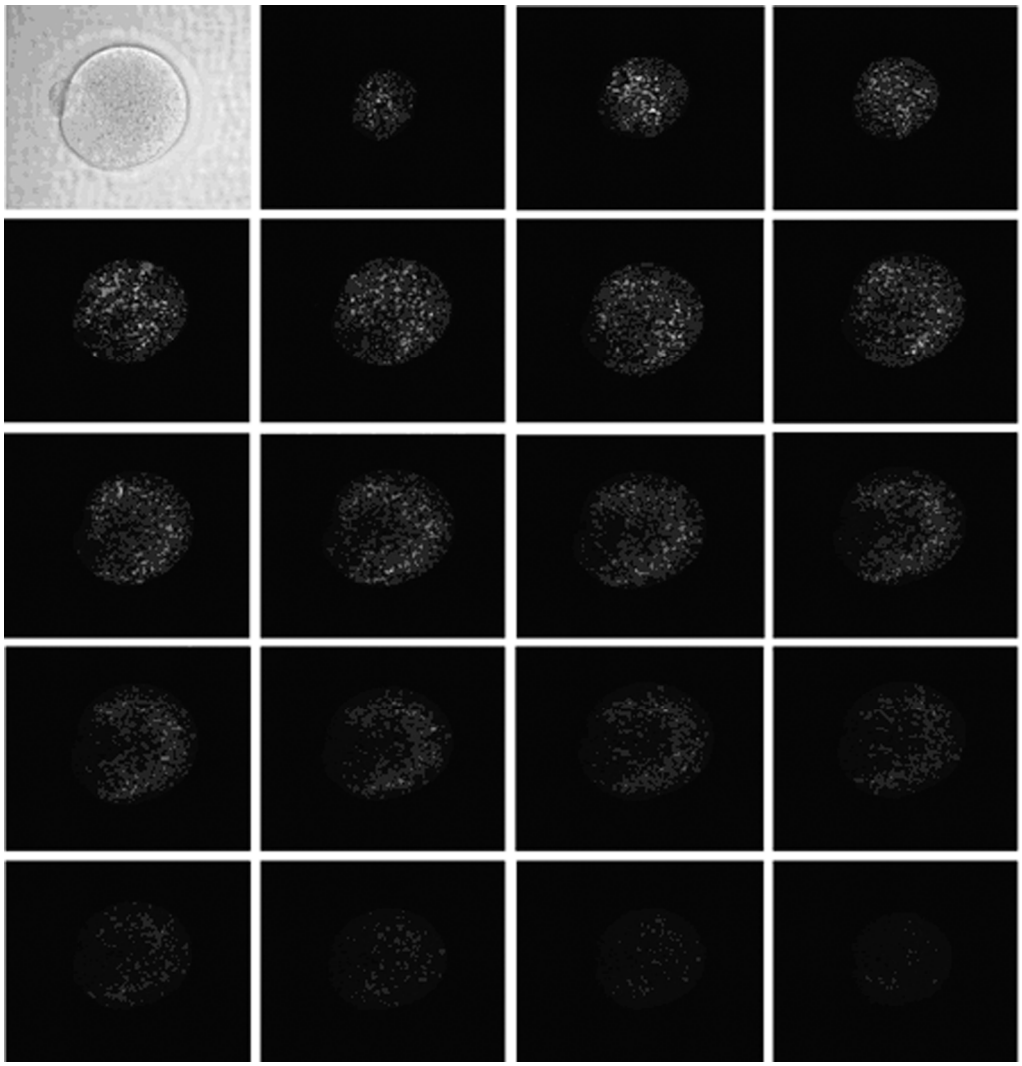
۳- نتایج

پس از رنگ‌آمیزی با JC-1 و بررسی مقاطع متوالی و با ضخامت ۳ میکرون از تخمک در زیر میکروسکوپ کانفوکال دو الگوی مختلف در پراکندگی میتوکندری‌ها دیده شد. الگوی پراکندگی یکنواخت که میتوکندری‌ها به شکل نقاط سبز رنگ در تمام سیتوپلاسم به شکل یکسان پراکندگی داشتند و در نوع دوم که غیریکنواخت بود بدین‌ترتیب علاوه بر پراکندگی نقاط سبز رنگ که تأیید کننده حضور میتوکندری‌ها در تمام سطح سیتوپلاسم بود، تعدادی از میتوکندری‌ها به شکل حلقه در اطراف هسته تخمک قرار گرفته بودند (حلقه دور هسته‌ای). در تخمک GV الگوی غیریکنواخت به چشم می‌خورد اما در تخمک GVBD و متافاز دوم الگوی یکنواخت دیده شد و در مقایسه با یکدیگر اندازه تجمعات میتوکندری در تخمک متافاز دوم به‌نظر بزرگ‌تر از دو حالت دیگر بود. تصاویر فاز کنتراست و مقاطع مختلف تخمک در مرحله GV در شکل ۱ و در تخمک GVBD در شکل ۲ و در تخمک متافاز دوم در شکل ۳ آورده شده است.



شکل ۲ برش‌های با توالی سه میکرون از تخمک مرحله GVBD یا متافاز یک موش با رنگ‌آمیزی JC-1 که در تصویر اول نمای فاز کنتراست همان تخمک مشخص شده است. پراکندگی نسبتاً یکدست میتوکندری‌ها در تخمک به شکل نقاط سبز رنگ قابل مشاهده است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]



شکل ۳ برش‌های با توالی سه میکرون از تخمک مرحله متافاز دوم موش با رنگ‌آمیزی JC-1 که در تصویر اول نمای فاز کنتراست همان تخمک مشخص شده است. پراکندگی نسبتاً یکدست میتوکندری‌ها در تخمک به شکل نقاط سبز رنگ قابل مشاهده است.

٤- بحث

مشاهدات محققان حاضر دو الگوی پراکندگی را برای تخمک موش نشان داد. در تخمک مرحله GV به علت این‌که برای شکست غشای هسته و شروع تقسیم میوزی نیاز به صرف انرژی است، بنابراین اطراف هسته تعداد میتوکندری‌ها افزایش می‌یابد و پراکندگی غیریکنواخت مشاهده می‌شود اما بعد از این مرحله یعنی پس از اینکه غشای هسته ناپدید شد، چون تقریباً در تمام سیتوپلاسم نیاز یکسانی وجود دارد، پراکندگی میتوکندری نیز یکسان دیده می‌شود.

در تحقیق دیگری با بررسی پراکندگی میتوکندری‌های تخمک‌های بالغ و نابالغ گاو نشان داده شده که بیش از ۸۰ درصد از تخمک‌های MII دارای الگوی یکنواخت بوده و این گروه از تخمک‌ها پس از IVF (In vitro fertilisation) تکوین جنین بهتری نیز داشتند که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت دارد [۱۰].

در همین ارتباط نیشی (Nishi) و همکارانش نیز نشان دادند

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

که تخمک‌های موش بلوغ یافته در محیط کشت در مرحله GV-GVBD که الگوی غیریکنواخت میتوکندری با پراکندگی دور هسته‌ای نشان داده بودند تکوین بهتری داشتند و چنین نتیجه گرفتند که تجمع میتوکندری دور هسته‌ای برای بلوغ لقاح و تکوین جنین‌های حاصل لازم و ضروری است [۱۸]. البته الگوی بیان شده توسط این محققین برای تخمک مرحله GV متفاوت از الگوی بیان شده در تحقیق حاضر بود که یکی از دلایل اصلی تفاوت شاید مربوط به این مسئله باشد که در تحقیق نیشی تخمک‌ها حاصل از بلوغ در شرایط کشت بودند در حالی در تحقیق حاضر تخمک‌ها در محیط کشت بالغ نشده بودند.

حتی لیو (Liu) و همکارانش الگوی متفاوتی از میتوکندرهای تخمک انسانی تکوین یافته در شرایط درون بدنی (In vivo) و شرایط آزمایشگاهی (In vitro) نشان داده‌اند [۱۵]. به‌عبارت دیگر شرایط تکوینی و کشت می‌تواند خود یکی از عوامل تأثیرگذار بر پراکندگی میتوکندری‌ها باشد؛ چرا که توزیع این اندامک حیاتی با واسطه اسکلت سلولی سلول به‌ویژه میکروتوبول‌ها میسر است و استحکام اسکلت سلول به‌خصوص میکروتوبول‌ها به شدت از شرایط کشت تبعیت می‌کند و وابسته به آن است.

ویلدینگ (Wilding) و همکارانش نیز الگوهای متفاوتی از پراکندگی میتوکندری در تخمک MII و GVBD نشان دادند [۱۷].

ناگایی (Nagai) و همکارانش در مطالعه خود نشان دادند که تخمک‌های MII با آرایش میتوکندری دور هسته‌ای تکوین بهتری در مقایسه با تخمک‌هایی با میتوکندری‌های قطعه قطعه شده دارند. آن‌ها چنین نتیجه گرفتند که پراکندگی میتوکندری می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور در انتخاب تخمک خوب و با کیفیت مطرح باشد [۱۹].

شاید یکی از اصلی‌ترین تفاوت در نتایج محققین در این باره مربوط به تفاوت گونه‌های مورد مطالعه قرار گرفته باشد که در ساختار میتوکندری‌ها نیز مشاهده می‌شود و همچنین درجات مختلفی از بلوغ سیتوپلاسمی تخمک که با معیارهای موجود قابل بررسی نیست و تنها معیار بررسی بلوغ، بررسی بلوغ هسته‌ای تخمک است. به‌عبارت دیگر تخمک‌های GV که با معیار هسته‌ای شناخته می‌شوند، لزوماً دارای بلوغ سیتوپلاسمی یکسان نبوده و حتی در بعضی از تحقیقات که تکوین این تخمک‌ها را ارزیابی می‌کنند، ممکن است تکوین یکسانی نداشته باشند.

از آن‌جایی که میتوکندری اندامک تأمین کننده انرژی سلول است که برای زنده ماندن و نمو آن ضروری است و همچنین تولید ATP مورد نیاز لقاح و نمو رویان را قبل از لانه گزینی فراهم می‌کند، بنابراین موقعیت مکانی و عملکرد آن‌ها روی کیفیت تخمک می‌تواند تأثیرگذار باشد و به دنبال آن در فرایند لقاح و تکوین جنینی دخالت می‌کند که در این مورد به تحقیقات بیشتری نیاز است.

نتایج این تحقیق نشان داد که به‌طور کلی دو الگوی توزیع میتوکندری در تخمک موش در مراحل مختلف تکوینی وجود دارد. به‌نظر می‌رسد که یکی از اصلی‌ترین عوامل در نحوه پراکندگی میتوکندری درون سلول نیاز مناطق مختلف سلول به تولید و مصرف انرژی باشد.

۵- تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از کار تحقیقی است که با حمایت مالی انستیتو کارولینسکای سوئد، دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری انجام شده است.

۶- منابع

[1] Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. Annu Rev Genet 2005; 39: 359-407.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[2] Mozo J, Emre Y, Bouillaud F, Ricquier D, Criscuolo F. Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds? Biosci Rep 2005; 25(3-4): 227-49.

[3] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science 2004; 305(5684): 626-9.

[4] Okamoto K, Shaw JM. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. Annu Rev Genet 2005; 39: 503-36.

[5] Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. Reproduction 2004; 128(3): 269-80.

[6] Smith LC, Thundathil J, Filion F. Role of the mitochondrial genome in preimplantation development and assisted reproductive technologies. Reprod Fertil Dev 2005; 17(1-2): 15-22.

[7] Cummins JM. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004; 115 Suppl 1: S23-9.

[8] Sathananthan AH, Selvaraj K, Girijashankar ML, Ganesh V, Selvaraj P, Trounson AO. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. Microsc Res Tech 2006; 69(6): 396-407.

[9] Au HK, Yeh TS, Kao SH, Tzeng CR, Hsieh RH. Abnormal mitochondrial structure in human unfertilized oocytes and arrested embryos. Ann N Y Acad Sci 2005; 1042: 177-85.

[10] Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. Biol Reprod 2001; 64(3): 904-9.

[11] Barnett DK, Bavister BD. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? Mol Reprod Dev 1996; 43(1): 105-33.

[12] Wang LY, Wang DH, Zou XY, Xu CM. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. J Zhejiang Univ Sci B 2009; 10(7): 483-92.

[13] Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. Theriogenology 2009; 71(5): 836-48.

[14] Bavister BD, Squirrell JM. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. Hum Repord 2000; 15 Suppl 2: 189-98.

[15] Liu S, Li Y, Gao X, Yan JH, Chen ZJ. Changes in the distribution of mitochondria before and after in vitro maturation of human oocytes and the effect of in vitro maturation on mitochondria distribution. Fertil Steril 2010; 93(5): 1550-5.

[16] Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

aggregate-forming lipophilic cation JC-1. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88(9): 3671-5.

[17] Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L, De Placido G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. Hum Reprod 2001; 16(5): 909-17.

[18] Nishi Y, Takeshita T, Sato K, Araki T. Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during in vitro maturation. J Nippon Med Sch 2003; 70(5): 408-15.

[19] Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, Shitara H, Yonekawa H, Hoshi K. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. Tohoku J Exp Med 2006; 210(2): 137-44.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]