ORIGINAL ARTICLE

Effect of Embryonic Fibroblast Cells Conditioned Medium on in Vitro Maturation of Immature Mouse Oocytes

Maedeh Entezari Najafabadi[1],
AbbasaliKarimpour Malekshah[2],
Amir Esmailnejad Moghaddam[3]
Hatef Ghasemi Hamidabadi[4],
Mahmoud Heidari[5]

[1] MSc Student in Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran
[2] Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Associate Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Assistant Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran

(Received June 27, 2013 ; Accepted February 4, 2013)

Abstract

Background and purpose: The purpose of this study was to evaluate the effect of mouse embryonic fibroblast cells conditioned medium on resumption of meiosis, in vitro maturation of immature mouse oocytes, fertilization and derived embryos development.

Material and Methods: Immature oocytes denuded at the germinal vesicle (GV) stage were obtained from female NMRI mice 46-48 hrs after injection of 7/5 IU PMSG. To preparate MEF, the fetuses were collected from the female mice at day 13 and cultured in DMEM. After the preparation of a monolayer, conditioned medium were collected and used for culture. Immature oocytes were randomly cultured in culture medium of MEM-α supplemented with different concentrations (0, 10, 30, 50 and 100%) of mouse embryonic fibroblast conditioned medium. After 14-16 hrs the matured oocytes were fertilized with spermatozoa in T6 medium and their development was assessed until blastocyst stage.

Results: There was no significant difference in maturation rate between control and conditioned medium groups. But there were significant differences ($P<0.05$) in the percentage of fertilization and cleavage in conditioned medium with 30%-50% concentrations as compared to the control group ($P<0.05$).

Conclusion: The conditioned medium of fibroblast cells increase in vitro fertilization (IVF) and embryo development. But there was no effect on the maturation of immature oocytes.

Keywords: In vitro maturationof mouse oocyte, embryonic fibroblast cell, conditioned medium

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(Supple 1): 107-114 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۲ (۱۱۴-۱۰۷)

تأثیر محیط کشت القاء شده با سلول های فیبروبلاست بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک های نابالغ موش

مائده انتظاری نجف آبادی[۱]
عباسعلی کریمپور ملکشاه[۲]
امیر اسماعیل نژادمقدم[۳]
هاتف قاسمی حمیدآبادی[۴]
محمود حیدری[۵]

چکیده

سابقه و هدف: هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر محیط کشت القاء شده سلول فیبروبلاست بر از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ موش، میزان لقاح و تکوین جنین های حاصل از آن بود.

مواد و روش‌ها: تخمک‌های نابالغ برهنه در مرحله وزیکول ژرمینال (GV) ۴۸-۴۶ ساعت پس از تزریق ۷/۵ واحد بین‌المللی PMSG از تخمدان‌های موش ماده نژاد NMRI در سن ۸-۶ هفته به‌دست آمدند. سلول‌های فیبروبلاست از جنین‌های موش باردار ۱۳ روزه به‌دست آمد. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ده درصد FBS کشت داده شده و پس از ایجاد پوشش سلولی تک لایه، محیط رویی آن جمع‌آوری و به عنوان محیط کشت القاء شده مورد استفاده قرار گرفت. تخمک‌های نابالغ به طور تصادفی در محیط کشت MEM-α با غلظت‌های مختلف صفر، ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد محیط القاء شده کشت داده شدند. پس از گذشت ۱۶-۱۴ ساعت تخمک‌های بلوغ یافته در محیط T6 با اسپرم لقاح یافته و مراحل تکوین جنین تا مرحله بلاستوسیست بررسی گردید. نتایج حاصل با آزمون ANOVA بررسی شد.

یافته‌ها: هیچ اختلاف معنی‌داری در میزان بلوغ تخمک‌های نابالغ در بین گروه‌های مختلف محیط کشت القاء شده و گروه کنترل مشاهده نشد. میزان لقاح و کلیواژ در غلظت های ۳۰ درصد و ۵۰ درصد محیط القاء شده افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p<0/05$).

استنتاج: یافته‌های این مطالعه نشان داد که محیط القاء شده توسط سلول‌های فیبروبلاست باعث افزایش لقاح آزمایشگاهی و تکوین جنینی شده، در حالی که تأثیری بر بهبود بلوغ تخمک‌های نابالغ ندارد.

واژه های کلیدی: بلوغ آزمایشگاهی تخمک موش، سلول فیبروبلاست جنینی، محیط کشت القاء شده

مقدمه

یکی از روش های پیشرفته درمان ناباروری(ART)، تحریک تخمک‌گذاری جهت به دست آوردن تعداد مناسب تخمک می‌باشد(۱). اما در بسیاری از مواقع بعد از تحریک تخمدان، همه تخمک‌های به دست آمده بالغ نیستند و تعدادی از آن‌ها در مراحل پایین‌تر مثلاً در مرحله وزیکول ژرمینال (GV) قرار دارند(۲،۳). با استفاده

مولف مسئول: عباسعلی کریمپور- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: Amalekshah@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۴/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۱۰/۱۴ تاریخ تصویب :۱۳۹۲/۱۱/۵

از روش بلوغ آزمایشگاهی (IVM) می‌توان تخمک‌های نابالغ را در محیط کشت بالغ کرده و از آن‌ها برای لقاح آزمایشگاهی (IVF) استفاده کرد(۴). به دلیل تفاوت شرایط کشت آزمایشگاهی با شرایط طبیعی و دینامیک تخمدانی در حال حاضر این روش از بازدهی پایینی برخوردار بوده و فقط بخشی از تخمک‌های نابالغ کشت داده شده به مرحله متافاز II می‌رسند(۵). هم‌چنین کیفیت و صلاحیت تخمک‌های بلوغ یافته در آزمایشگاه برای لقاح، کلیواژ و تکوین جنینی به مراتب پایین‌تر از تخمک‌های بلوغ یافته در شرایط داخل بدن (in vivo) می‌باشد(۶-۴). بنابراین ایجاد شرایطی که بتوان نسبت و کیفیت تخمک‌های بلوغ یافته را افزایش داده و همراه با آن قابلیت تخمک‌ها را برای لقاح و رویان‌زایی حفظ کرد بسیار حائز اهمیت است(۶-۴). بر همین اساس استفاده از محیط‌های کشت مختلف(۸،۷،۲)، اضافه کردن ترکیبات مکملی مانند هورمون‌ها(۹،۸)، عوامل رشد(۹،۱۰)، آنتی‌اکسیدانت‌ها(۱۰) به محیط کشت به منظور افزایش کارایی شرایط محیط کشت مورد بررسی محققان قرار گرفته است.

یکی از روش‌هایی که به منظور بهینه کردن هر چه بیش‌تر شرایط محیط کشت مورد توجه قرار گرفته استفاده از سیستم هم‌کشتی است(۶). اما علی‌رغم تأثیرات مفیدی که اغلب محققان برای این روش و استفاده از سلول‌های مغذی (feeder cells) بر بهبود بلوغ تخمک و تکوین جنینی گونه‌های مختلف گزارش کرده‌اند(۶،۹)، بعضی از گزارش‌ها استفاده از این روش را بی‌اثر و یا کاری وقت‌گیر و کم اثر دانسته‌اند(۱۱). با توجه به این‌که یکی از مکانیسم‌های احتمالی تأثیر مثبت سیستم هم کشتی بر سلول‌هایی که روی سلول‌های مغذی کشت داده می‌شوند، ترشح عامل‌های پاراکرینی محرک رشد و تمایز توسط این سلول‌هاست(۱۲)، برخی محققان استفاده از محیط کشتی که سلول‌های مغذی برای مدتی در آن کشت داده شدند (محیط القا شده =(Conditioned medium; (CM) را جایگزین مناسبی برای سیستم هم کشتی دانسته‌اند(۱۳).

محیط القا شده محیط کشتی است که بسیاری از اشکالات سیستم هم‌کشتی را ندارد، می‌توان در فرصت مناسب آن را تهیه و در شرایط مناسب (در دمای پایین) نگهداری و سپس استفاده کرد. این محیط حاوی ترکیبات و موادی است که توسط پوشش تک لایه‌ای سیستم هم‌کشتی ترشح و به آن اضافه شده است(۱۵،۱۴). سلول فیبروبلاست از جمله سلول‌هایی است که می‌توان از آن برای این منظور استفاده نمود. این سلول از سلول‌های اصلی استرومای بافت تخمدان می‌باشد که در ارتباط تنگاتنگ با فولیکول‌ها در مراحل مختلف بلوغ قرار دارد(۱۶،۱۲). تحقیقات نشان داده که چندین سایتوکائین و عامل رشد مثل عامل مهارکننده لوکمی (LIF)، عامل Steel و عامل رشد فیبروبلاست پایه (bFGF) توسط این سلول‌ها ترشح می‌شود که این عوامل می‌توانند در پیشبرد مراحل بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک در شرایط داخل بدن نقش داشته باشد(۱۲). برخی مطالعات نشان داده است که محیط القاء شده می‌تواند باعث رشد فولیکول‌های پره آنترال(۸)، بلوغ تخمک(۱۷،۸) و تکوین جنینی شود(۸). طبق بررسی‌های انجام شده تنها در یک مطالعه تأثیر محیط القایی سلول فیبروبلاست جنینی موش بر بلوغ تخمک‌های نابالغ مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این مطالعه نشان داد که محیط کشت القاء شده تأثیری در بهبود بلوغ تخمک‌های نابالغ ندارد(۱۸). این مطالعه با هدف بررسی تأثیر محیط کشت القاء شده توسط سلول‌های مغذی فیبروبلاست جنینی موش بر بلوغ تخمک‌های نابالغ موش طراحی و انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری تخمک های نابالغ

در این مطالعه از موش‌های سوری نژاد NMRI (Naval Medical Research Institute) با سن ۸-۶ هفته، تهیه شده ازمرکز تحقیقاتی (آمل، ایران) استفاده

شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد دمایی ۲۰-۲۵°C و دوره ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت محیط نگه‌داری شده و به آب و غذا دسترسی کافی داشتند. برای تحریک تخمک‌گذاری موش‌ها ۷/۵ واحد بین المللی PMSG (Pregnant Mare SerumGonadotropin) به صورت داخل صفاقی تزریق و ۴۸-۴۶ ساعت بعد موش‌ها به روش جابه‌جایی مهره گردنی کشته شدند. تخمدان‌ها درشرایط استریل از بدن خارج و به محیط کشت هامز حاوی بافر HEPES، ده درصد FBS (Fetal Bovin Serum) و یک درصد از ترکیب آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین منتقل شدند. پس از شست و شو و برداشتن بافت همبند و چربی اطراف، تخمدان‌ها زیر میکروسکوپ استریو تشریح و تخمک‌های نابالغ حاوی GV همراه با سلول‌های گرانولوزا از تخمدان جمع‌آوری و با روش پیپت کردن، سلول‌های گرانولوزای اطراف آن‌ها برداشته شدند. با استفاده از لنز مدرج در زیر میکروسکوپ معکوس و تخمک‌های نابالغ هسته دار (GV) با اندازه تقریبی ۶۵-۶۰ میکرومتر و سیتوپلاسم روشن و زونا پلوسیدای یکنواخت با فضای دور زرده‌ای (PerivitellineSpace) طبیعی جهت کشت انتخاب شدند.

جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست و تهیه محیط کشت القا شده

برای تهیه سلول‌های فیبروبلاست از جنین‌های موش باردار ۱۳ روزه استفاده شد. به این صورت که پس از کشتن موش به روش قطع نخاع گردنی، جنین‌ها در شرایط تا حد امکان استریل از رحم خارج و با استفاده از بافر فسفات (PBS) شست و شو داده شدند. سپس سر، اندام‌ها و تمامی احشای قرمز رنگ از جمله کبد جنین جدا شده و بقیه بافت جنینی با استفاده از سرنگ و سر سوزن به قطر ۱۸ به قطعات ریز تبدیل و چندین بار در PBS شست و شو داده شدند. سه میلی‌لیتر محلول Trypsin/EDTA به قطعات جنینی اضافه و به مدت ده دقیقه در داخل انکوباتور نگه داری شدند. سپس با استفاده از فیلترهای ۷۰ میکرومتری قطعات درشت جنینی جدا شد و پس از اضافه کردن محیط کشت، سوسپانسیون حاصله با دور ۲۵۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از تشکیل پلاک سلولی با دور ریختن مایع رویی و اضافه کردن محیط کشت سلول شامل DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی ده درصد FBS و یک درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین، کشت اولیه‌ای از سلول‌های فیبروبلاست جنینی در انکوباتور انجام شد. پس از گذشت دو تا سه روز سلول‌های فیبروبلاست کف فلاسک را پر کردند که در این مرحله پاساژ اول انجام شد. کشت سلول‌های فیبروبلاست تا چهار پاساژ ادامه پیدا کرد و از این پاساژ جهت تهیه محیط کشت القاء شده استفاده شد. پس از انجام کشت در پاساژ آخر جهت توقف تکثیر سلولی ۱۰μgr/ml مایتومایسین C به فلاسک حاوی سلول اضافه شده و به مدت ۳-۲/۵ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از این مدت محیط حاوی مایتومایسین برداشته شده و کف فلاسک با PBS شسته شد. سلول‌ها به کمک آنزیم Trypsin/EDTA از کف فلاسک جدا و پس از سانتریفیوژ، شمارش سلولی انجام شده و غلظت 2×10^5 سلول در میلی‌لیتر به فلاسک ۵۰ ml منتقل شد. پس از یک شبانه روز و اطمینان یافتن از چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک محیط کشت بلوغ (MEM-α حاوی ده درصد FBS) با محیط کشت سلولی (DMEM حاوی ده درصد FBS) تعویض و پس از گذشت ۴۸ ساعت محیط القایی از کف فلاسک جمع‌آوری و پس از سانتریفیوژ نمودن آن بلافاصله برای کشت مورد استفاده قرار گرفته یا در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شدند تا درموقع مقتضی مورد استفاده قرارگیرند.

گروه های آزمایشی

تخمک‌های نابالغ جمع‌آوری شده در هر مرحله

ابتدا در قطره‌ای واحد با حجم تقریبی µ ۱۰۰ از محیط کشت جمع‌آوری شده، سپس به طور تصادفی در پنج گروه به شرح ذیل جهت کشت توزیع شدند: ۱) محیط کشت پایه شامل MEM-α حاوی ده درصد (v/v) FBS، ۱۰۰ IU/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین به عنوان گروه کنترل. ۲) گروه آزمون اول ۱۰۰ درصد CM (CM-۱۰۰). ۳) گروه آزمون دوم، محیط کشت پایه + ۵۰ درصد CM (CM-۵۰. ۴) گروه آزمون سوم، محیط کشت پایه + ۳۰ درصد CM (CM-۳۰ و ۵) گروه آزمون ۴، محیط کشت پایه + ۱۰ درصد CM (CM-۱۰). تخمک‌های هر گروه به مدت ۱۶-۱۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. سپس با استفاده از 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 نابالغ، تخمک‌های با هسته محو شده به عنوان GVBD و نشان دهنده شروع تقسیم میوز و تخمک‌های دارای اولین جسمک قطبی به عنوان تخمک‌های بالغ (MII) در نظر گرفته شدند.

لقاح آزمایشگاهی تخمک‌های بالغ

موش‌های نر نژاد NMRI با سن ۱۰-۸ هفته به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند، دم اپیدیدیم آن‌ها جدا و به قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت T6 حاوی ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA (Bovin Serum Albumin) منتقل شدند. سپس نمونه‌ها به منظور ظرفیت‌یابی اسپرم به مدت ۱/۵-۱ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 قرار گرفتند. تخمک‌های بالغ حاصل از کشت در گروه‌های مورد آزمایش به صورت دسته‌های ۱۰-۵ تایی به قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط T6 حاوی ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA منتقل شدند، سپس اسپرم‌های فعال و سالم با غلظتی معادل $۱×۱۰^{۶}$ اسپرم در هر میلی‌لیتر به قطره‌های حاوی تخمک اضافه و به مدت چهار تا شش ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از این مدت، تخمک‌ها از محیط لقاح خارج و پس از چند بار شست و شو و جدا سازی اسپرم ها به محیط T6 حاوی چهار میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA منتقل شدند. از آن‌جا که مشاهده پیش‌هسته و دومین جسمک قطبی زمان‌بر بوده و با خطا همراه است، ترجیح داده شد ارزیابی وقوع لقاح پس از ۲۴ ساعت و از روی کلیواژ تخم‌های تشکیل شده و رسیدن به مرحله دو سلولی صورت پذیرد. جنین‌های دو سلولی از تخمک‌ها جدا و به قطرات کشت جدید جهت ارزیابی ادامه تکوین منتقل شدند. میزان کلیواژ با مشاهده جنین‌هایی که مرحله دو سلولی را پشت سر گذاشته و به مرحله چهار سلولی رسیدند مورد ارزیابی قرار گرفت. وضعیت جنین‌ها هر ۲۴ ساعت و به مدت ۷۶ ساعت کنترل شد.

آزمون آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از برنامه نرم افزاری SPSS16 استفاده شد. جهت مقایسه میانگین نسبت بلوغ، لقاح و نیز مراحل مختلف تکوین جنین بین گروه‌های مختلف از آزمون ANOVA و تست LSD (least significant difference) استفاده گردید. P کم‌تر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

تعداد ۹۸۰ تخمک نابالغ در محیط‌های کشت کنترل و آزمون کشت داده شدند. ۷۳/۶، ۷۲/۷، ۷۵/۸، ۷۹ و ۷۵/۸ درصد از تخمک‌ها به ترتیب در گروه‌های کنترل، CM-۱۰۰، CM-۵۰، CM-۳۰ و CM-۱۰ به مرحله MII رسیدند که این اختلاف در گروه های مختلف معنی‌دار نبود. هم‌چنین نسبت تخمک‌هایی که میوز را از سر گرفته ولی ادامه ندادند (GVBD)، تفاوتی در گروه‌های مختلف نشان نداد (جدول شماره ۱). میزان لقاح در گروه CM-۵۰ ۵۰/۵ درصد و در گروه CM-۳۰

۵۶ درصد بوده است که نسبت به گروه کنترل (۲۷/۱ درصد) و گروه CM-۱۰۰ (۲۷ درصد) افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (p <۰/۰۵). هم‌چنین میزان کلیواژ در دو گروه CM-۵۰ (۲۳/۸ درصد) و CM-۳۰ (۲۸/۵ درصد) نسبت به گروه های کنترل (۱۰/۵ درصد)، گروه CM-۱۰۰ (۱۰/۷ درصد) و گروه CM-۱۰ (۱۱/۱ درصد) افزایش معنی‌داری را نشان داد (p <۰/۵). اما هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان تشکیل بلاستوسیست در بین گروه‌های مورد آزمایش مشاهده نشد (جدول شماره ۱).

بحث

علی‌رغم مطالعات بسیار انجام شده طی چند دهه گذشته در زمینه IVM میزان موفقیت این روش هم‌چنان پایین بوده و هنوز دستور العمل استانداردی برای آن به طور دقیق پیشنهاد نشده است(۱۹،۵). به طور کلی محیط کشت یکی از مهم‌ترین عواملی است که می‌تواند روی تکوین تخمک در آزمایشگاه مؤثر باشد و برای بلوغ تخمک‌ها محیط کشتی مناسب‌تر است که بتواند شرایطی همانند شرایط فیزیولوژیک تخمدانی فراهم کند(۲۰). استفاده از محیط کشت القاء شده سلول‌های سوماتیک یکی از رویکردهایی است که می‌تواند به منظور ایجاد شرایط بهتر محیطی برای تکوین تخمک مورد توجه قرار گیرد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که محیط کشت القاء شده سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش تأثیری در میزان از سرگیری میوز و بهبود بلوغ هسته‌ای تخمک‌های نابالغ موش ندارد ولی می‌تواند باعث افزایش قابل توجه در میزان موفقیت لقاح، عبور از مرحله دوسلولی و کلیواژ شود. در بررسی‌های انجام شده، تنها یک مطالعه به بررسی اثر محیط کشت القا شده سلول‌های فیبروبلاست جنینی بر بلوغ تخمک‌های نابالغ پرداخته است. در مطالعه مذکور، Lee و همکارانش (۲۰۰۷) نشان دادند که محیط القایی تأثیری در بهبود بلوغ هسته‌ای تخمک نابالغ سگ ندارد(۱۸). یافته‌های ما نتایج این مطالعه را مورد تأیید قرار می‌دهد، اما با نتایج مطالعات محققان دیگر که گزارش کردند محیط القاء شده سلول‌های بنیادی مزانشیمی(۸)، کومولوس(۱۷) و اپیتلیال اویداکتال(۲۱) باعث افزایش بلوغ هسته‌ای می‌شوند، منطبق نیست. بر همین اساس شاید بتوان گفت چون نوع و میزان عامل‌های مترشحه از سلول‌های سوماتیک در محیط کشت متفاوت است، محیط‌های القاء شده به دست آمده از سیستم‌های کشت سلول‌های مزبور نیز متفاوتند و از توان متفاوتی برای از سرگیری میوز و بلوغ هسته‌ای تخمک برخوردارند. در خصوص تأثیر محیط القا شده بر میزان لقاح و تکوین جنینی، نتایج مطالعه حاضر مؤید یافته‌های مطالعات Ling و همکاران(۲۰۰۸)(۸) و Vatzias و همکاران (۱۹۹۹)(۲۱) می‌باشد. آن‌ها در مطالعه خود نشان دادند که محیط القایی بر روی موارد مذکور تأثیر قابل توجهی دارد. در واقع بلوغ تخمک شامل دو فرآیند بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی می‌باشد که بلوغ هسته‌ای به از سرگیری میوز و پیشرفت به سمت متافاز II اطلاق می‌شود اما بلوغ سیتوپلاسمی شامل تغییرات ساختاری و

جدول شماره ۱: مقایسه روند بلوغ آزمایشگاهی، لقاح و تکوین جنینی تخمک های نابالغ کشت داده شده در محیط کنترل و غلظت های مختلف محیط کشت القا شده

گروه های آزمایشی	تعداد تخمک های نابالغ	نسبت تخمک ها پس از کشت			میزان تکوین جنین		
		مرحله GV	مرحله GVBD	مرحله MII	مرحله لقاح (2cell)	مرحله کلیواژ (4-8cell)	مرحله بلاستوسیست
گروه کنترل	۳۰۳	۱۵/۹ درصد	۱۰/۳ درصد	۷۳/۶ درصد	۲۷/۱ درصد	۱۰/۵ درصد	۱/۳ درصد
گروه آزمون ۱	۱۶۹	۷/۶ درصد	۱۹/۶ درصد	۷۲/۷ درصد	۲۷ درصد	۱۰/۷ درصد	۱/۴ درصد
گروه آزمون ۲	۱۳۷	۳/۹ درصد	۲۰/۱ درصد	۷۵/۸ درصد	۵۰/۵[a,b] درصد	۲۳/۸[a,b,c] درصد	۳/۴ درصد
گروه آزمون ۳	۲۹۰	۱۱ درصد	۹/۹ درصد	۷۹ درصد	۵۶[a,b] درصد	۲۸/۵[a,b,c] درصد	۴/۲ درصد
گروه آزمون ۴	۸۱	۷/۱ درصد	۱۶/۹ درصد	۷۵/۸ درصد	۴۲/۲ درصد	۱۱ درصد	۲/۷ درصد

GV:حباب زایا(Germinal vesicle)، GVBD: حباب زایای محو شده (germinal vesicle breakdown)، MII: متافاز II

a= اختلاف معنی دار با گروه کنترل، b= اختلاف معنی دار با گروه آزمون۱، c= اختلاف معنی دار با گروه آزمون۴ (p <۰/۰۵)

و مولکولی در سیتوپلاسم تخمک می‌باشد که باعث اکتساب پتانسیل تکوین می‌شود(۵،۲۰). در طی بلوغ تخمک هر گونه نقصی در بلوغ سیتوپلاسمی، تکوین جنینی را تحت تأثیر قرار می‌دهد حتی اگر تخمک بلوغ هسته‌ای طبیعی داشته باشد(۲۲). مطالعات نشان داده است که یکی از دلایل وقوع بالاتر پلی‌اسپرمی و میزان پایین تشکیل پیش هسته نر در جریان لقاح تخمک‌های حاصل از IVM، می تواند به دلیل بلوغ ناقص این تخمک‌ها باشد. در نتیجه زیگوت‌های حاصل از این لقاح غالباً کلیواژ پیدا نمی‌کنند(۱۹،۲۰). بنابراین شاید بتوان متصور شد که عامل‌های مترشحه از پوشش تک لایه‌ای سلول‌های فیبروبلاست با بهبود بلوغ سیتوپلاسمی توانسته است باعث افزایش کیفیت آن برای باروری تخمک و عبور از مرحله بحرانی توقف رشد مرحله دو سلولی شوند گرچه این عوامل در بهبود بلوغ هسته‌ای بی‌تأثیر بوده است. سلول فیبروبلاست ترکیبات مختلفی از جمله سایتوکائین‌ها و عوامل رشد مختلف مثل عامل رشد فیبروبلاست پایه (bFGF)، عامل Steel و عامل مهارکننده لوکمی (LIF) را در محیط کشت ترشح می‌کنند(۱۲،۱۶)، با توجه به این‌که محیط القاء شده در میزان لقاح و تکوین جنین‌های حاصله از باروری تخمک‌های بالغ شده در IVM اثرات مثبت نشان داد، می‌توان گفت که تأثیرات مفید محیط القاء شده بر روی قابلیت لقاح و تکوین جنینی به تمام یا برخی از این عوامل مربوط است. همان‌طور که شواهد نیز نشان می‌دهد ژن FGF در فعالیت سیتوپلاسمی و میانجی‌گری مسیر سیگنالی سلول کاربرد دارد و نقش اساسی در فرآیند تکثیر و تمایز تخمک دارد(۱۹). برخی گزارشات نیز حاکی از آن است که سلول فیبروبلاست احتمالا ماکرومولکول‌هایی ترشح می‌کند که می‌تواند با تأثیر بر تخمک باعث جلوگیری از پلی اسپرمی در جریان لقاح شده و به این ترتیب میزان لقاح طبیعی و کلیواژ متعاقب آن را افزایش دهد(۱۲). هم‌چنین احتمال می‌رود عامل‌های رشد از طریق تحریک ساخت پروتئین در طی بلوغ تخمک و تنظیم بلوغ به شیوه اتوکرین و پاراکرین باعث بهبود بلوغ سیتوپلاسمی تخمک و روند تکوین جنین شود(۱۷).

در این مطالعه هم‌چنین مشخص شد که محیط القاء شده در غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ درصد مؤثر می‌باشد و در غلظت‌های بالاتر یا پایین‌تر این تأثیر وجود ندارد. همان‌طور که در بسیاری از مطالعات تأثیر سایتوکائین‌ها و عوامل رشد در میزان بلوغ تخمک‌ها، لقاح و تکوین جنین وابسته به دوز گزارش شده(۱۹،۲۰)، در خصوص محیط القاءشده نیز این موضوع صادق است.

بر اساس یافته‌های این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که محیط القا شده توسط سلول‌های فیبروبلاست احتمالاً به واسطه عوامل سایتوکائینی موجب تقویت لقاح آزمایشگاهی و تکوین جنینی شده، در حالی‌که تأثیری در بهبود بلوغ تخمک‌های نابالغ ندارد.

References

1. Lin Y-H, Hwang J-L. In vitro maturation of human oocytes. Taiwanese J Obstet Gynecol 2006; 45(2): 95-99.
2. Braga D, Figueira R, Ferreira RC, Pasqualotto F, laconelli A, Borges E. Contribution of in-vitro maturation in ovarian stimulation cycles of poor-responder patients. Reprod Bio Med Online 2010; 20: 335-340.
3. Nazari S, Khalili MA, Esmaielzadeh F, Mohsenzadeh M. Maturation capacity, morphology and morphometric assessment of human immature oocytes after vitrification and in-vitro maturation. Iranian J Reprod Medicine 2011; 9(3): 209-216.
4. Moemeni M, Rashidi Z, Azadbakht M. Effect of Hydrostatic Pressure on In Vitro Maturation of Mouse Oocytes. J Iranian Anatomical Science 2011; 9(34): 1-12.

5. Eimani H, Tahaei LS, Parivar K, Kazemi S, Shahverdi A, eftekhari P, et al. Effects of retinoic acid on maturation of immature mouse oocytes and resulting embryos developmen. Yakhteh Medical J 2007; 9(1): 7-14 (Persian).
6. Eimani H, Tahaei LS, Parivar K, Rezazadeh M, Kazemi S, Shahverdi A, et al. The Effect of Granulosa Cells Co-culture and Retinoic Acid on Maturation and Development of Immature Mouse Oocytes In Vitro. J Iranian Anatomical Sciences 2007; 5(19&20): 137-146.
7. Roushandeh AM, Pasbakhsh P, Alizadeh Z, Roudkenar MH. In vitro maturation media, cysteamine concentration and glutathione level affect blstocysts development in mouse. Iranian J Reprod Medicine 2007; 5(4): 159-163.
8. Ling B, Feng DQ, Zhou Y, Gao T, Wei HM, Tian ZG. Effect of conditioned medium of mesenchymal stem cells on the in vitro maturation and subsequent development of mouse oocyte Braz. J Med Biol Res 2008; 41(11): 978-985.
9. Tahaei LS, Eimani H, Yazdi PE, Ebrahimi B, Fathi R. Effects of retinoic acid on maturation of immature mouse oocytes in the presence and absence of a granulosa cell co-culture system. J Assist Reprod Genet 2011; 28: 553-558.
10. Honga JY, Yongb HY, Leeb BC, Hwangb WS, Limc JM, Leea ES. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. Theriogenology 2004; 62: 1473-1482.
11. Lin YH, Hwang JL, Seow KM, Huang LW, Chen HJ, Tzeng CR, et al. Effects of growth factors and granulosa cell co-culture on in-vitro maturation of oocytes. Reproductive Bio Medicine Online 2009; 19(2): 165-170.
12. Hotaya S, Sugiyama Y, Torii R, Wijewardana V, Kumagai D, Sugiura K, et al. Effect of co-culturing with embryonic fibroblasts on IVM, IVF and IVC of canine oocyte. Theriogenology 2006; 66(5); 1083-1090.
13. Hernandez-Ledezma JJ, Villanueva C, Sikes JD, Reberts RM. comparison of co-culture and conditioned medium on expansion and hatching in vitro-derived bovine blastosysts. Theriogenology 1995; 43(1): 233.
14. Karimpour Malekshah A, Esmailnejad Moghaddam A, Musavi Daraka S. Comparison of coditioned medium and direct co-culture of human granulosa cells on mouse embryo development. Indian J Exp Biol 2006; 44: 189-192.
15. Karimpour Malekshah A, Esmailnejad Moghaddam A, Musavi Daraka S. Effect of cumulus conditioned medium on. mouse embryo development. J Sci & Res 2006; 13(63): 75-80 (Persian).
16. Heidari M, Malekshah AK, Parivar K, Khanbabaei R, Rafiei A. Effect of Fibroblast Co-culture on In Vitro Maturation and Fertilization of Mouse Preantral Follicles. Fertility and Sterility 2011; 5(1): 1-8.
17. Abdel-Ghani MA, Abe Y, Asano T, Hamano S, Suzuki H. Effect of bovine cumulus–oocyte complexes-conditioned medium on in-vitro maturation of canine oocytes. Reprod Med Biol 2011; 10: 43-49.
18. Lee SR, Kim MO, Kim SH, Kim BS, Yoo DH, Park YS, et al. Effect of conditioned medium of mouse embryonic fibroblasts produced from EC-SOD transgenic mice in nuclear maturation of canineoocytes in vitro. Animal Reproduction Science 2007;

99: 106-116.

19. Azarnia M, Ghasemian F, Bahadori MH, Mohammad Ghasemi F, Ahmadi Jalali Moghaddam M. Effect of Fibroblastic Growth Factor on Resumption of Meiosis, In Vitro Maturation and Embryo Development of Immature Mouse Oocytes. Journal of Iranian Anatomical Sciences 2009; 7: 1-10.
20. Bahadori M, Azarnia A, Ghasemian F. The effect of hepatocyte growth factor on mouse oocyte in vitro maturation and subsequent fertilization and embryo development. Zahedan J Res Med Sci 2011; 13(2): 26-30.
21. Vatzias G, Hagen DR. Effects of Porcine Follicular Fluid and Oviduct-Conditioned Media on Maturation and Fertilization of Porcine Oocytes In Vitro. Biol Reprod 1999; 60: 42-48.
22. Eimani H, Hasani F, Haeri Rohani SA, NasrEsfahani MH, Rezazadeh M, Dalman A. Effect of gluthation on Resumption of Meiosis, In Vitro Maturation and Embryo Development of Immature Mouse Oocytes. J Mazandaran Univ Med Sci 2003; 15(48): 1-10 (Persian).