ORIGINAL ARTICLE

Effect of Mouse Embryo Tail Bud Co-culture on in vitro Maturation of Mouse Oocyte

Samaneh Farhadi Mahalli[1]
Ramazan Khanbabaee[2]

[1] MSc, Faculty of Science, Department of Animal Biology, Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran
[2] PhD, Faculty of Assistant Professor, Department of Animal Biology, Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran

(Received May 24, 2014; Accepted December 31, 2014)

Abstract

Background and purpose: In vitro maturation of oocyte is a promising technology in treatment of infertility, however, its clinical application is still limited due to poor success rate. This study was devised to evaluate the effect of mouse embryo tail bud co-culture on maturation of immature mouse oocyte.

Materials and methods: Immature oocytes were recovered from NMRI female mice 48hr after injection of 7.5 IU PMSG (pregnant mare serum gonadotropin). Oocytes were divided into four groups in α-MEM medium containing 10% FBS. The maturation medium for positive control group contained hCG, while for negative control group it was without hCG. In experimental groups 1 and 2 the maturation medium contained no hCG, but 9.5-10.5 and 12-13 days mouse embryo tail bud. The oocytes in each group were cultured in CO2 incubator. The oocytes maturation was recorded under an invert microscope after 24 hr. Data analysis was performed applying ANNOVA in SPSS.

Results: In vitro maturation rate in positive control group, negative control group, experimental groups 1 and 2 were 52, 48, 66 and 50%, respectively. These rates indicated a significant increase in matured MII oocytes (in the presence of 9.5-10.5 days mouse embryo tail bud) than those of the negative control group and the second experimental group ($P<0.05$).

Conclusion: Co-culture of oocyte with 9.5-10.5 days mouse embryo tail bud, increased the maturation rate of immature oocyte.

Keywords: Co-culture, In vitro maturation, Mouse immature oocyte, Tail bud

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(120): 88-99 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۰ دی سال ۱۳۹۳ (۸۸-۹۹)

تأثیر هم‌کشتی جوانه دمی جنین موش [۵/۱۰- ۵/۹ روزه] بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک موش

سمانه فرهادی محلی[1]
رمضان خانبابایی[2]

چکیده

سابقه و هدف: بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاهی روش مناسبی برای درمان ناباروری است که استفاده کلینیکی آن به‌واسطه موفقیت پایین با محدودیت مواجه است. لذا این مطالعه با هدف بررسی تأثیر هم‌کشتی جوانه دمی جنین موش بر بلوغ تخمک‌های نارس موش طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: تخمک‌های نابالغ از موش‌های ماده نژاد NMRI ۴۸ ساعت بعد از تزریق ۷/۵ IU از PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) به دست آورده شدند. تخمک‌ها در محیط α-MEM حاوی ده درصد FBS به چهار گروه تقسیم شدند. محیط بلوغ برای گروه کنترل مثبت حاوی ۷/۵ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر hCG، برای گروه کنترل منفی فاقد hCG و برای گروه‌های آزمایش ۱ و ۲ حاوی محیط گروه کنترل منفی با هم‌کشتی جوانه دمی جنین ۱۰/۵- ۹/۵ و ۱۳-۱۲ روزه موش بود. تخمک‌های هر گروه در انکوباتور CO2 دار کشت شدند. بلوغ تخمک‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس پس از ۲۴ ساعت ثبت شد. تجزیه و تحلیل داده‌های خام به‌وسیله نرم‌افزار SPSS، Anova انجام گرفت.

یافته‌ها: میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه‌های کنترل مثبت، کنترل منفی، گروه تجربی یک و دو به ترتیب ۵۲، ۴۸، ۶۶ و ۵۰ درصد بود که این میزان افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) را در تخمک‌های متافاز میوز II در گروه تجربی یک (در حضور جوانه دمی جنین موش ۱۰/۵-۹/۵ روزه) نسبت به گروه کنترل منفی و گروه تجربی دوم نشان داد.

استنتاج: هم‌کشتی تخمک با جوانه دمی جنین موش ۱۰/۵-۹/۵ روزه، بلوغ تخمک نابالغ را افزایش می‌دهد.

واژه های کلیدی: بلوغ آزمایشگاهی، جوانه دمی، هم‌کشتی، تخمک‌های نابالغ موش.

مقدمه

اگرچه پروتکل‌های سوپراوولاسیون که در تکنیک‌های کمک تولیدمثلی از جمله لقاح در شرایط آزمایشگاهی (IVF)[1] استفاده می‌شود، منجر به تولید تعداد زیادی تخمک بالغ می‌گردد (۱)، اما با اثرات جانبی از جمله سندرم تحریک بیش از حد تخمدان (OHSS)[2]، نارسایی قلبی و کلیوی، چندقلوزایی و خطر

[1] In Vitro Fertilization

[2] Ovarian Hyperstimulation Syndrome

مولف مسئول: سمانه فرهادی محلی –قائمشهر - دانشگاه ازاد اسلامی قائمشهر- ساختمان تحصیلات تکمیلی Email: farhadisamaneh@gmail.com
۱. کارشناس ارشد دانشگاه ازاد قائمشهر، قائمشهر، ایران
۲. استادیار دانشگاه ازاد قائمشهر، قائمشهر، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۳/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۵/۲۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

بالقوه سرطان مرتبط است (۲). بلوغ در شرایط آزمایشگاهی (IVM)[1] یک روش حذفی تحریک هورمونی برای تولید تخمک‌های بالغ است؛ بنابراین می‌تواند در تولید جنین در بیماران با سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)[2] استفاده شود (۳). همچنین این تکنیک روش مؤثری در تولید تخمک‌های بالغ برای استفاده در تکنولوژی‌های کمک باروری از قبیل IVF، تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)[3] است (۴). این روش، یک تکنیک آزمایشگاهی جنینی پیشرفته است که به‌موجب آن تخمک‌های نابالغ از فولیکول‌های آنترال تخمدانی قبل از کامل کردن رشدشان در داخل بدن، از تخمدان‌های تحریک نشده یا با تحریک کم بازیابی شده و از مرحله وزیکول زاینده (GV)[4] تا کامل کردن تقسیم متافاز میوز II با تشکیل جسم قطبی به مدت ۴۸ -۲۴ ساعت کشت داده می‌شوند (۶ ، ۵). درست پیش از تولد، اووسیت‌های اولیه در مرحله دیپلوتن پروفاز میوز I متوقف می‌شوند (۷). هسته این اووسیت‌های اولیه غیرفعال حاوی کروموزوم‌های پروفاز نسبتاً بزرگ، متراکم و آبکی است که وزیکول زاینده نام دارد (۸). وزیکول زاینده، DNA سلول را در مدت طولانی توقف میوزی محافظت می‌کند (۹). بلوغ تخمک شامل دو فرآیند بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی است. بلوغ هسته‌ای دوره‌ای است که به از سرگیری میوز از مرحله وزیکول زاینده و پیشرفت آن تا متافاز MII اشاره دارد و به‌وسیله خروج جسم قطبی و ظهور دومین صفحه متافازی نمایان می‌شود. بلوغ سیتوپلاسمی دوره عمومی‌تری است که مستقیماً در ارتباط با پیشرفت میوزی نیست. آماده‌سازی تخمک برای لقاح و توسعه پیش از لانه گزینی است (۱۰). در حال حاضر به‌وضوح ثابت شده، استفاده از IVM به‌عنوان روش درمانی کمک باروری در بسیاری از گونه‌ها، از جمله انسان، کاربرد دارد (۱۱). این روش درمانی، مؤثر و بی‌خطر در برخی مراکز ناباروری، از طریق بازیابی تخمک‌های نابالغ از تخمدان‌های تحریک نشده انجام می‌گیرد؛ بنابراین از تحریک تخمدان با گنادوتروپین گران‌قیمت (۱۲) و عوارض جانبی داروها (۱۳) ممانعت می‌شود. مزایای دیگر این روش در مقایسه با لقاح در شرایط آزمایشگاهی کاهش فرکانس اسکن‌های مانیتورینگ، رژیم درمانی کوتاه‌تر (۱۳) و نیز استفاده از پروتکل‌های امن‌تر، ساده‌تر و کم دغدغه‌تر است که منجر به کاهش رنج بیمار می‌شود. IVM همچنین ابزار مناسبی برای تولید تجاری جنین است. در حیوانات اهلی تولید جنین از تخمدان‌های تحریک نشده با استفاده از IVM نوعی تکنولوژی برای تولیدمثل مصنوعی، کلونینگ و تولید حیوانات ترنس ژنیک است (۱۴). پیشرفت در حال توسعه IVM آهسته است (۱۲). محیط کشت نامناسب، کنترل دمایی، فاز گازی نامناسب منجر به افزایش آسیب تخمک‌ها در هنگام بلوغ می‌شود (۱۷). می‌توان تخمک‌های نابالغ را تحت تأثیر فاکتورهایی قرار داد تا به سمت بلوغ تمایز یابند و از این امر برای افزایش تکنولوژی‌های کمک باروری استفاده کرد. در تکنیک‌های کمک تولیدمثلی از هم‌کشتی برای بهبود توسعه جنینی استفاده شده است. هنوز مشخص نیست، چگونه هم‌کشتی بلوغ تخمک را در شرایط آزمایشگاهی پشتیبانی می‌کند، اما این احتمال وجود دارد که سلول‌های هم‌کشت شده، فاکتورهای رشد یا سایر ترکیباتی که بلوغ تخمک را بهبود می‌بخشد در محیط کشت ترشح کنند (۱۸). به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای، کارهای مداوم پروفسور ادوارد[5] به‌خوبی از سوی دانشمندان همه نقاط جهان شناسایی شده است. وی در

[1] In Vitro Maturation
[2] Poly Cystic Ovarian Syndrome
[3] Intra Cytoplasmic Sperm Injection
[4] Germinal Vesicle
[5] Edward

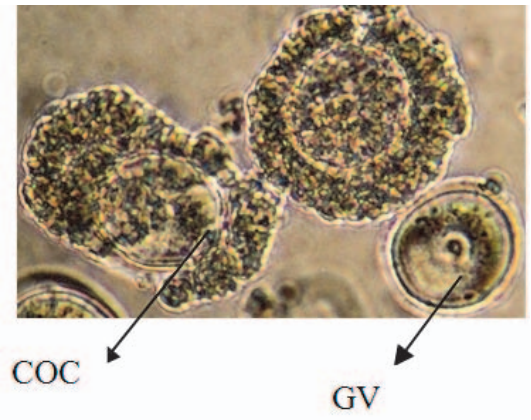
سال ۱۹۶۹ بلوغ خود به خودی تخمک‌های GV انسان را در شرایط آزمایشگاهی مشاهده کرد (۳۸). نیلسون[1] و همکارانش گزارش کردند، تیمار تخمدان موش صحرایی به‌وسیله فاکتور رشد فیبروبلاست در شرایط in vitro، منجر به کاهش تعداد فولیکول‌های پریموردیال و در عین حال افزایش تعداد فولیکول‌های در حال تکوین می‌شود (۳۹). ناندی[2] و همکارانش نیز گزارش کردند، فاکتور رشد فیبروبلاست، بلوغ هسته‌ای تخمک‌های بوفالو را در شرایط کشت افزایش می‌دهد (۴۰). مطالعات دیگر نشان می‌دهد، تخمک‌های بالغ شده در آزمایشگاه، نسبت به شرایط کشت با مطلوبیت کمتر، بسیار حساس‌تر از تخمک‌های بالغ شده in vivo هستند (۴۱). فاکتورها و مکانیسم‌های درگیر در این روند هنوز به‌خوبی تعریف نشده است. شواهد خوبی وجود دارد که فاکتورهای تنظیمی موضعی در این روند کاربرد دارد (۴۲). فاکتور رشد فیبروبلاست یک گروه از زنجیره پلی پپتیدهای اتصال یابنده به هپارین است. این فاکتورها تمایز سلول‌های گرانولوزای تخمدان، بیان رسپتورهای لوتئینزه کننده (LH)، توسط سلول‌های گرانولوزا و تکثیر سلول‌های زاینده تخمدان و تکثیر سلول‌های زاینده تخمدان را تحریک می‌کنند (۴۳). این مطالعه در جستجوی روشی برای بهبود بلوغ آزمایشگاهی در مدل موشی است؛ بنابراین در تحقیق حاضر برای نخستین بار تأثیر هم‌کشتی جوانه دمی جنین موش بر بلوغ تخمک‌های نارس مورد بررسی قرار می‌گیرد. ناحیه خلفی جنین موش به‌وسیله پروتئین ریخت‌زای استخوان (BMP)، فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) و رتینوئیک اسید (RA) مشخص می‌شود. بالاترین شیب غلظت FGF8 در ناحیه جوانه دمی در قسمت رأسی آن است (۱۹). بیان FGF8 و گیرنده‌های اصلی‌اش FGFR-3c و FGFR-4 در تخمک، سلول‌های گرانولوزا و تکا نیز در بافت‌های جنینی به‌طور گسترده تعیین شده است (۲۰). از دیگر فاکتورهای موجود در جوانه دمی رتینوئیک اسید است. از آنجا که RA روی سلول‌ها برای تشکیل یا تغییر الگوی فعالیت ژن عمل می‌کند، لذا می‌تواند بلوغ سیتوپلاسمی و ظرفیت تخمک را برای پیشرفت در رشد و نمو تحت تأثیر قرار دهد (۲۱). لذا با توجه به این تحقیقات، استفاده از فاکتور FGF و رتینوئیک اسید در بلوغ تخمک‌های نارس به اثبات رسیده است.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر از موش‌های ماده سوری نژاد NMRI ۶ تا ۸ هفته‌ای تهیه شده از انستیتو پاستور آمل استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط کنترل شده (۱۲ ساعت روشنایی-۱۲ ساعت تاریکی) و دسترسی آسان به آب، غذا، رطوبت و دمای مناسب نگه داشته شدند. کلیه قوانین و اصول اخلاقی در رابطه با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده تحصیلات تکمیلی قائم‌شهر رعایت شد. FBS از شرکت Gibco، hCG (Organon, Holand) روغن معدنی (Irvine scientific, Belgium) و محیط کشت α-MEM از شرکت ایده زیست نوترکیب به‌صورت محلول خریداری شد و این شرکت HEPES را برای کنترل PH و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین را به آن اضافه کرد. بقیه مواد از شرکت سیگما (آلمان) خریداری شد.

برای تحریک تخمک‌گذاری از ۷/۵ واحد بین‌المللی PMSG به‌صورت تزریق داخل صفاقی برای هر موش ماده استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، موش‌ها با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند، سپس با ایجاد شکاف در سطح شکم، تخمدان‌ها در

[1] Nilsson
[2] Nandi



تصویر شماره ۱: تخمک موش در مرحله وزیکول زاینده و مجموعه تخمک- کومولوس (x۱۰۰)

شرایط استریل از بدن خارج و بلافاصله به درون قطرات ۵۰ میکرو لیتری محیط کشت از پیش انکوبه شده در دیش کشت (Jet Biofil) منتقل شدند. چربی‌های اضافی اطراف تخمدان حذف و تخمدان‌ها با استفاده از دو سرنگ انسولین تشریح شدند. تخمک‌های GV و مجموعه تخمک- کومولوس از بافت تخمدان به داخل محیط آزاد شدند (۲۲) (تصویر شماره ۱).

با عمل پی پتینگ، سلول‌های کومولوس اطراف تخمک برداشته شد و جداسازی تخمک از فولیکول آنترال تخمدانی صورت گرفت. سپس تخمک‌های GV پس از سه مرحله شستشو به قطرات ۲۰۰ میکرو لیتری محیط کشت انتقال داده شدند.

گرفتن جوانه دمی از جنین موش

هنگام بعدازظهر سه موش ماده و یک موش نر در یک قفس با هم قرار داده شدند. ۱۲ ساعت بعد، موش‌های ماده برای تشکیل پلاک واژینال مورد بررسی قرار گرفتند. زمان مشاهده پلاک واژنی به‌عنوان زمان صفر حاملگی در نظر گرفته شد. برای به دست آوردن جوانه دمی برای هم‌کشتی با تخمک‌های GV، پس از نخاعی کردن موش‌های باردار، در محدوده روزهای ۱۰/۵-۹/۵ و ۱۳-۱۲ حاملگی، شاخ رحمی در شرایط کاملاً استریل خارج و در درون دیش (FALCON)، به زیر هود منتقل شد. بخشی از شاخ رحمی که فاقد جنین است به سمت داخل تورفتگی دارد. این نواحی ابتدا برش داده و سپس با وارد کردن فشاری اندک، جنین از شاخ رحمی خارج شد. سپس در دیش جداگانه‌ای جنین با محیط کشت شستشو داده شد و با کمک دو عدد سر سرنگ و زیر لوپ قسمت جوانه دمی از جنین‌های خارج شده از شاخ رحمی جدا و در محیط کشت شستشو داده شد (۲۴).

پنج تخمک نارس به همراه یک جوانه دمی در قطره ۲۰۰ میکرو لیتری محیط کشت در زیر روغن معدنی منتقل شدند. روغن معدنی به‌صورت یک لایه، در حدود پنج میلی‌لیتر، سطح رویی قطره‌ها را پوشاند. دیش کشت حاوی تخمک‌های نابالغ برای بلوغ، در داخل انکوباتور قرار داده شد.

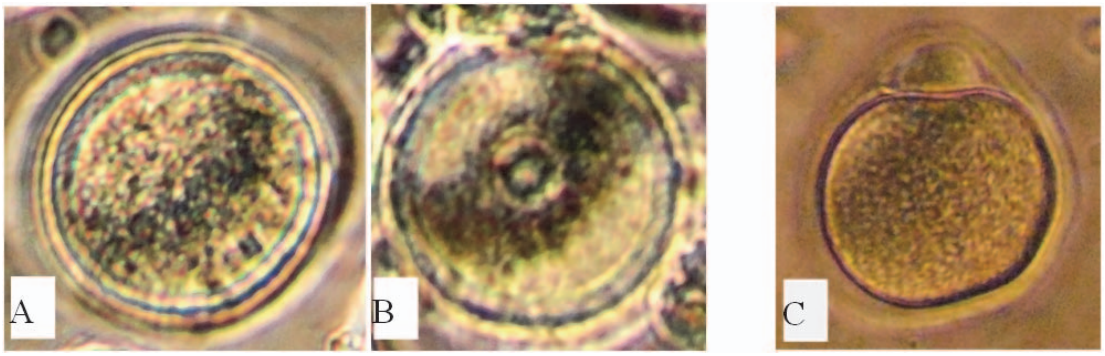
تخمک‌های GV با شکل کروی، سیتوپلاسم روشن، قشر شفاف زوناپلوسیدا با فضای پری ویتلینی مناسب به‌عنوان تخمک سالم برای چهار گروه انتخاب و کشت داده شدند.

گروه‌های آزمایش

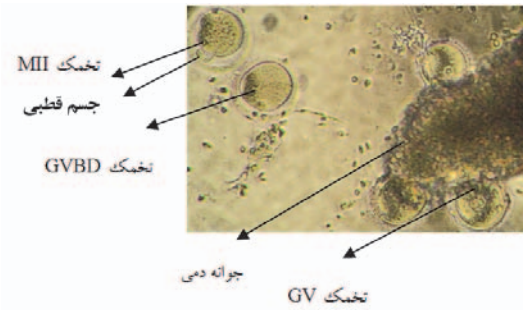
کنترل مثبت: ۱۰۰ تخمک نارس گرفته شده از موش ماده در محیط α-MEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۷/۵ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر hCG قرار داده شد؛

کنترل منفی: ۱۰۰ تخمک نارس در محیط α-MEM حاوی ۱۰ درصد FBS و فاقد hCG قرار داده شد؛

گروه تجربی اول: ۱۰۰ تخمک نارس در محیط α-MEM حاوی ۱۰ درصد FBS به همراه جوانه دمی جنین ۱۰/۵-۹/۵ روزه موش قرار داده شد (هم‌کشتی تخمک نابالغ با جوانه دمی جنین ۱۰/۵-۹/۵ روزه)؛



تصویر شماره ۲: تخمک موش در مرحله GV(A)، تخمک GVBD (B)، تخمک بالغ (C) (x۱۰۰)



تصویر شماره ۳: هم‌کشتی تخمک‌های نابالغ با جوانه دمی جنین موش‌های ۱۰/۵-۹/۵ روزه (x۱۰۰)

گروه تجربی دوم: ۱۰۰ تخمک نارس در محیط α-MEM حاوی ۱۰ درصد FBS به همراه جوانه دمی جنین ۱۳-۱۲ روزه موش قرار داده شد (هم‌کشتی تخمک نابالغ با جوانه دمی جنین ۱۳-۱۲ روزه).

تخمک‌های هر گروه مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO2 ۵ درصد و رطوبت نسبی ۸۵ درصد قرار داده شدند و سپس با میکروسکوپ اینورت، تعداد تخمک‌های مرحله GV، MII،GVBD و Deg در تمام گروه‌ها بررسی شد.

آنالیز آماری

برای بررسی تأثیر هم‌کشتی جوانه دمی جنین موش بر میزان موفقیت بلوغ، اطلاعات مربوطه جمع‌آوری و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از برنامه نرم‌افزاری SPSS 16 استفاده شد. مقایسه آماری میانگین بین گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آنالیز واریانس انجام پذیرفت. سطوح P<۰/۰۵ بیان‌کننده اختلاف معنی‌دار است. برای مقایسه دوبه‌دو گروه‌ها از آزمون توکی استفاده شد.

یافته ها

تخمک‌های بدون تغییر شکل در هسته به‌عنوان تخمک‌های نارس GV (شکل A.۲)، تخمک‌های در حال بلوغ به‌عنوان GVBD با نشانه شروع تقسیم میوز (شکل B.۲)، تخمک‌های دارای جسم قطبی به‌عنوان تخمک‌های بالغ یاMII (شکل C.۲) و تخمک‌های با شکل ظاهری تحلیل رفته به‌عنوان تخمک‌های دژنره شناسایی شدند. در گروه آزمایشی اول، ۲۴ ساعت پس از هم‌کشتی تخمک‌ها با میکروسکوپ اینورت بررسی شدند (تصویر شماره ۳).

آزمایش‌ها در سه مرحله تکرار شد. در این مطالعه ۴۰۰ تخمک نارس و سالم از تخمدان‌های موش سوری جدا و به‌طور تصادفی در دو گروه کنترل و دو گروه تجربی تقسیم‌بندی شد. در گروه کنترل مثبت ۱۰۰ تخمک جدا شد که پس از ۲۴ ساعت در ۲۵ درصد آن‌ها نشانی از علائم شروع میوز دیده نشد. نیز در ۱۹ درصد هسته آن‌ها شکسته و در ۵۲ درصد تخمک‌ها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند. میزان بلوغ از نظر آماری نسبت به گروه تجربی یک (P<۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین درصد تخمک‌هایMII به روش دانکن

گروه‌ها	میانگین
کنترل مثبت	۲/۶۰±۰/۱۵ B
کنترل منفی	۲/۴۰±۰/۲۶ B
گروه تجربی یک	۳/۳۰±۰/۱۷ A
گروه تجربی دو	۲/۵۰±۰/۱۸ B

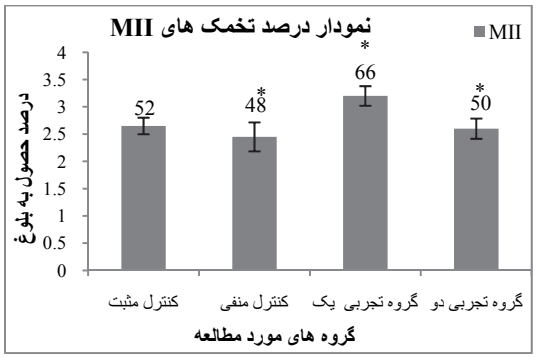
* در سطح P<۰/۰۵ همبستگی معنی‌داری وجود دارد.

مقایسه میانگین درصد تخمک‌های بالغ نشان داد که درصد تخمک‌های MII در گروه تجربی یک نسبت به تخمک‌های MII سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشته و بیشتر است.

در گروه کنترل منفی (از ۱۰۰ تخمک نارس) پس از ۲۴ ساعت در ۲۶ درصد تخمک‌ها نشانی از علائم شروع میوز دیده نشد. نیز در ۲۱ درصد هسته آن‌ها شکسته شد و در ۴۸ درصد تخمک‌ها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند. میزان بلوغ از نظر آماری نسبت به گروه تجربی یک (P<۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

در گروه تجربی یک (از ۱۰۰ تخمک نارس) پس از ۲۴ ساعت در ۱۳ درصد تخمک‌ها نشانی از علائم شروع میوز دیده نشد. نیز در ۱۶ درصد، هسته آن‌ها شکسته و در ۶۶ درصد تخمک‌ها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند. میزان بلوغ از نظر آماری نسبت به گروه کنترل مثبت (P<۰/۰۵) و گروه کنترل منفی (P<۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

در گروه تجربی دو (از ۱۰۰ تخمک نارس) پس از ۲۴ ساعت در ۱۹ درصد تخمک‌ها نشانی از علائم شروع میوز دیده نشد. نیز در ۲۸ درصد هسته آن‌ها شکسته و در ۵۰ درصد تخمک‌ها تا مرحله MII پیشرفته و بالغ شدند. میزان بلوغ از نظر آماری نسبت به گروه‌های کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. میانگین درصد تخمک‌های دژنره در گروه‌های کنترل مثبت، کنترل منفی و گروه‌های تجربی اول و دوم به ترتیب ۴، ۵، ۵ و ۳ درصد بود (جدول شماره ۱). نرخ حصول به مرحله بلوغ بین گروه‌های مورد مطالعه در تصویر شماره ۴ آمده است.



تصویر شماره ٤: نمودار مقایسه میانگین درصد بلوغ تخمک‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

* اختلاف معنی‌دار

بحث

تحقیق حاضر برای نخستین بار تأثیر هم‌کشتی جوانه دمی جنین موش را بر بلوغ تخمک‌های نابالغ مورد مطالعه قرار داده است. تا کنون اثر عصاره جوانه بافت شش و دم بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های عصبی مورد بررسی قرار گرفته است (۲۴). انتظار می‌رود، فاکتورهای موجود در جوانه دمی جنین موش ۱۰/۵–۹/۵ روزه، FGF8، رتینوئیک اسید و BMP 15 باشد که توسط برشی که در نزدیک انتهای جوانه دمی صورت گرفت و قرار دادن این جوانه‌ها در محیط حاوی تخمک‌های نابالغ آزاد شدند. بلوغ تخمک اغلب به دو فرآیند بلوغ سیتوپلاسمی و بلوغ هسته‌ای تقسیم می‌شود. بلوغ هسته‌ای به از سرگیری میوز و پیشرفت تا متافاز میوز II اشاره دارد. بلوغ سیتوپلاسمی دوره عمومی‌تری است که مستقیماً در ارتباط با پیشرفت میوزی نیست، بلکه آماده‌سازی تخمک برای لقاح و توسعه پیش از لانه‌گزینی است (۴۴). فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) به‌عنوان یک عامل میتوژنیک در عصاره هیپوفیز شناسایی شده (۲۶) و از نظر ساختاری تقریباً شامل ۲۴ عضو خویشاوند است (۱۹). این فاکتورها یک گروه از زنجیره پلی پپتیدهای منفرد اتصال یابنده به هپارین هستند و با سطح سلول به‌واسطه سولفات هپارین میان کنش می‌دهد که نشان‌دهنده

ضرورت حضور FGF برای انتقال سیگنال است که نقش اساسی در فرآیند تمایز تخمک بر عهده دارد (۴۵). اعضای خانواده FGF فاکتورهای مهمی ترشح می‌کنند که بلوغ تخمک را تحت تأثیر قرار می‌دهد. یک رابطه پاراکراین دوسویه بین تخمک و سلول‌های کومولوس، بلوغ هسته‌ای تخمک را تنظیم می‌کند (۲۸). FGF8 یک پروتئین ترشحی است و عملکرد پاراکراین در طی فازهای خاص بلوغ فولیکول دارد (۲۹)، نیز FGF8 در گاسترولاسیون نقش دارد. همچنین دارای نقش اضافی در تکامل جوانه اندام حرکتی و اندام‌زایی است (۲۷). FGFها در همکاری با هپارین یا هپاران سولفات پروتئوگلیکان (HSPG) برای فعال کردن گیرنده‌ها (FGFRs) عمل می‌کنند (۲۵). آن‌ها اثراتشان را از طریق گیرنده‌های تیروزین کینازی میانجی‌گری می‌کنند (۲۶) و فسفریله شدن باقیمانده‌های تایروزین سیتوپلاسمی خاص را القا کرده و مسیرهای کلیدی سیگنالی پایین‌دست شامل Ras-MAPK، PI3K-Akt، فسفولیپاز Cγ (PL Cγ) و سیگنال‌های مبدل و فعال‌کننده‌های نسخه‌برداری (STATs) را فعال می‌کنند. این عوامل به‌نوبه خود سیگنال‌های تایروزین کینازی گیرنده را به‌وسیله فعال‌سازی بسیاری از پروتئین‌های هدف، شامل فاکتورهای نسخه‌برداری در هسته‌ها منتشر می‌کنند (۲۶). بدین طریق پیام FGF وارد هسته شده و مسیر بیان ژن را به کمک رتینوئیک اسید تغییر می‌دهد. رتینوییدها موجب تحریک FSH برای القای گیرنده LH، تحریک و تولید پروژسترون و کاهش cAMP می‌شوند. افزایش یا حفظ سطوح بالای cAMP در تخمک مانع از سرگیری میوز می‌شود. به این ترتیب است که گفته شده که RA ممکن است کیفیت mRNA و پردازش را در هنگام بلوغ، به‌واسطه افزایش در پلی آدنیلاسیون، بالا برد. رتینوئیک اسید مهاجرت گرانول‌های کورتیکالی را قبل از بلوغ القا می‌کند.

مهاجرت گرانول‌های کورتیکالی یک پدیده معمول در تخمک پستانداران در هنگام بلوغ سیتوپلاسمی در دو محیط in vivo و in vitro است و به‌عنوان معیاری در تخمین بلوغ و سازمان‌دهی اندامک استفاده می‌شود (۲۱). میانگین درصد تخمک‌های باقی‌مانده در مرحله GV در گروه کنترل منفی کمی بیشتر از میانگین گروه‌های دیگر است، این امر حاکی از آن است که در گروه کنترل منفی، درصد بیشتری از تخمک‌ها در مرحله وزیکول زاینده متوقف شده و تا مرحله شکستن وزیکول زاینده پیش نرفته‌اند. احتمال دارد، افزایش معنی‌دار میانگین درصد بلوغ تخمک‌ها در گروه تجربی یک نسبت به گروه کنترل منفی و گروه تجربی دو، به دلیل اثر القایی FGF8 و RA است. چندین مطالعه اثر فاکتورهای رشد را بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها مطرح می‌کند. نتایج مطالعه Valve و همکارانش نشان داد، بیان mRNA ی FGF8 در تخمک‌های فولیکول آنترال موش بالغ زیاد است (۲۹). نیز تحقیقات اورمند[1] و همکارانش نشان داد، FGF8 منجر به افزایش بلوغ هسته‌ای تخمک‌های نارس می‌شود (۳۲). ایمانی و همکارانش با بررسی اثر هم‌کشتی گرانولوزا و رتینوئیک اسید بر IVM تخمک‌های نارس موش دریافتند، RA مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی را پشتیبانی کرده و با کاهش cAMP باعث افزایش از سر گیری میوز می‌شود (۲۲). نیز رتینوئیک اسید ممکن است بلوغ سیتوپلاسمی تخمک‌ها را از طریق اثرات تعدیلی روی بیان ژن گیرنده‌های گنادوتروپین، cyclooxygenase-2 و سنتز اکسید نیتریک در سلول‌های کومولوس- گرانولوزا ترفیع دهد (۳۴). کنینگهم[2] و همکارانش ثابت کردند، بیان Raldh2 در سومیت‌های دمی جنین موش در روزهای ۱۰/۵-۹/۵ رخ

[1] Ormond
[2] Cunningham

می‌دهد و تنظیم پایین‌دست آن در روز ۱۳/۵ هنگام خاتمه گسترش محورهای بدن دیده شده است. همچنین بیان FGF8 دمی، با سطح بیان بالا در روز ۹/۵ مشاهده شده و در محدوده روزهای ۱۱/۵- ۱۰/۵ کاهش می‌یابد و اساساً در روزهای ۱۳/۵- ۱۲/۵ هنگامی که منطقه مولد دمی ناپدید می‌شود، بیانی وجود ندارد (۳۰). بنا بر یافته‌های کنینگهم و همکارانش از آنجا که در روزهای ۱۰/۵-۹/۵ فاکتور رشد فیبروبلاستی و رتینوئیک اسید در جوانه دمی به میزان فراوانی ترشح می‌شود، بنابراین تصور می‌شود، حضور این عوامل بر میزان بلوغ تخمک تأثیر به سزایی داشته است؛ به‌طوری که در جوانه دمی جنین موش ۱۳-۱۲ روزه Fgf8 وجود ندارد و RA به میزان اندک ترشح می‌شود، بنابراین درصد بلوغ تخمک‌ها در گروه آزمایش دو اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های کنترل نشان نمی‌دهد. همان‌طور که گفته شد، در جوانه دمی جنین موش علاوه بر رتینوئیک اسید و FGF، خانواده BMP ها نیز حضور دارند. BMP15 دقیقاً در تخمک بیان شده و جنبه‌های متفاوت تمایز سلول‌های کومولوس را تنظیم می‌کند. BMP15 و FGF میانجی‌گرهای مهمی در ارتباط تخمک با سلول‌های کومولوس و بلوغ هسته‌ای هستند (۳۵). در موش، FGF8 ناشی از تخمک با همکاری BMP15 عمل می‌کند و منجر به تحریک گلیکولیز در سلول‌های کومولوس می‌شود (۳۶) نیز این مولکول‌ها به‌عنوان مولکول‌های حیاتی در تنظیم فیزیولوژی تخمدان شناخته شده‌اند (۳۷)؛ بنابراین عامل دیگری که به نظر می‌رسد در افزایش درصد بلوغ تخمک‌های گروه تجربی اول نقش داشته باشد حضور BMP در جوانه دمی است.

این مطالعه نشان داد هم‌کشتی جوانه دمی جنین موش ۱۰/۵-۹/۵ روزه در شرایط آزمایشگاهی بلوغ تخمک‌ها را بهبود می‌بخشد.

References

1. Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. Polycystic Ovary Syndrome and its Developmental Origins. Rev Endocr Metab Disord. 2007; 8(2):127–141.
2. Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. Fertil Steril. 1998; 70(3):578-9.
3. Khashavi Z, Karimzadeh MA. Comparison of Unstimulated In Vitro Maturation and Stimulated In Vitro Fertilization in Women with Poly Cystic Ovarian Syndrome. Journal of Research in Medical Sciences. 2004; 9(6):260-263.
4. Mahmoudi R, Subhani A, Pasbakhsh P, Abolhasani F, Amiri I, Salehnia M, et al. The Effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes. Iranian Journal of Reproductive Medicine. 2005; 3(2):74-78.
5. Chian RC, Lim J, Tan SL. State of the art in in-vitro oocyte maturation. Curr Opin Obstet Gynecol. 2004; 16(3):211–219.
6. Uzelac PS, Christensen GL, Nakajima ST. The Role of In Vitro Maturation in Fertility Preservation. Oncofertility Medical Practice. 2012; 77-89.
7. Abir R, Nitke S, Ben-Haroush A, Fisch B. In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for

growth evaluation. Histol Histopathol. 2006; 21(8):887-898.

8. Lenart P, Ellenberg J. Nuclear envelope dynamics in oocytes: from germinal vesicle breakdown to mitosis. Curr Opin Cell Biol. 2003; 15(1):88-95.
9. Marteil G, Richard-Parpaillon L, Kubiak JZ. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. 2009; 9(3):203-224.
10. Combelles CM, Fissore RA, Albertini DF, Racowsky C. In vitro maturation of human oocytes and cumulus cells using a co-culture three-dimensional collagen gel system. Hum Reprod. 2005; 20(5):1349–1358.
11. Banwell KM, Thompson JG. In vitro maturation of mammalian oocytes: outcomes and consequences. Seminars in Reproductive Medicine. 2008; 26(2):162–174.
12. Thomas FH, Walters K A, Telfer EE. How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. Hum Reprod Update. 2003; 9(6):541-555.
13. Rao GD, Tan SL. In vitro maturation of oocytes. Semin Reprod Med. 2005; 23(3):242-7.
14. Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. Theriogenology.2007; 67(1):6–15.
15. Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. Polycystic Ovary Syndrome and its Developmental Origins. Rev Endocr Metab Disord. 2007; 8(2):127–141.
16. Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. Theriogenology. 2007; 67(1):6–15.
17. Chang MC. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. Journal of Experimental Zoology. 1955; 128(2):379–405.
18. Lin Y-H. Effects of growth factors and granulosa cell co-culture on in-vitro maturation of oocytes. Reprod BioMed Online. 2009; 19(2):165-170.
19. Edwards RG, Wales DSc. Maturation in vitro of human ovarian oocyte. Lancet.1965; 286(7419):926-929.
20. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol.2001; 175(1-2):123-130.
21. Nandi S, Ravindranatha BM, Gupta PS, Raghu HM, Sarma PV. Developmental competence and post-thaw survivability of buffalo embryos produced in vitro: effect of growth factors in oocyte maturation medium and of embryo culture system. Theriogenology. 2003; 60(9):1621-1631.
22. Jinno M, Sandow BA, Hodgen GD. Enhancement of the developmental potential of mouse oocytes matured in vitro by gonadotropins and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). J. In Vitro Fert Embryo Transf. 1989; 6(1): 36–40.
23. Quennell JH, Stanton JAL, Hurst PR. Basic fibroblast growth factor expression in isolated small human ovarian follicles. Mol Hum Reprod. 2004; 10: 623-628.
24. Gospodarowicz D, Plouet J, Fujii DK. Ovarian germinal epithelial cells respond to

basic fibroblast growth factor and express its gene: implications for early folliculogenesis. Endocrinology. 1989; 125(3):1266-1276.

25. Gilbert SF. Developmental Biology. 2th ed. Tehran: Khaneh Zystshenaci. 2009. p. 381.
26. Buratini Jr J, Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MG L, Giometti IC, et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. Reproduction. 2005; 130(3):343-350.
27. Eimani H, Tahaei LS, Parivar K, Kazemi S, Shahverdi A, Eftekhari P, et al. Effect of retinoic acid on maturation and embryo development of immature mouse oocytes. Yakhteh. 2007;9(1):7-14. (Persian).
28. 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. Iranian Anatomical Sciences. 2007; 5(19-20):137-146. (Persian).
29. Kassaeian M. Evaluation of effect of tail and lung tissue extract on differentiation of MSCs to nerve cells. Islamic azad university of Qaemshahr [PhD thesis]; 2011. (Persian).
30. De La Fuente R, O'Brien MJ, Eppig JJ. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes.Hum Reprod 1999; 14(12):3060-3068.
31. Martin G R. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. Genes Dev. 1998; 12(11):1571-1586.
32. Amaya E, Musci TJ, Kirschner MW. Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in xenopus embryos. Cell. 1991;66(2):257-270.
33. Buratini J, Caixeta ES. Paracrine and autocrine factors in the differentiation of the cumulus-oocyte complex. Anim Reprod. 2012; 9(3):414-419.
34. Valve E, Penttila TL, Paranko J, Harkonen P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 232(1):173-177.
35. Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. J Biochem. 2011; 149(2):121–130.
36. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. Cytokine Growth Factor Rev. 2005; 16(2): 139-149.
37. Ormond CM, Lima PF, Jardina-Sartor DT, Price CA, Buratini J. 257 Effects of fibroblast growth factor 8 on cumulus expansion and nuclear maturation in bovine cumulus- oocyte complexes. Reproduction, Fertility and Development. 2012; 25(1):276-276.
38. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Guleki B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycyctic ovary syndrome. Fertil Steril. 2001; 76(5):936-942.
39. Cunningham TJ, Zhao X, Duester G. Uncoupling of retinoic acid signaling from tailbud development before termination of body axis extension. Genesis. 2011; 49(10): 776-783.

40. Franchi FF. Effects of FGF2, FGF10 and BMP15 on nuclear maturation of bovine oocytes during in vitro maturation. Scientific Initiation; 2013. Available from: http:// www. bv. fapesp.br › BV-CDIFAPESP.
41. Sugiura K, Su YQ, Diaz FJ, Pangas SA, Sharma S, Wigglesworth K,et al. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. Development. 2007; 134(14): 2593-2603.
42. Miyoshi T, Otsuka F, Yamashita M, Inagaki K, Nakamura E, Tsukamoto N, et al. Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulose cells. Mol Cell Endocrinol. 2012;325(1-2):84-92.