Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 3:45 +0430 on Saturday September 19th 2020

مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۹، شماره۶، شهریور ۱۳۹۳(شماره پی در پی۸۹)

تأثیر فاکتور رشد شبه انسولینی بر میزان بلوغ آزمایشگاهی تخمک ژرمینال وزیکول موش سوری

رضامحمودی[۱]*، اسماعیل موسوی[۲]، سید محمدرضا ربانی[۱]، مهدی اکبرتبارتوری[۳]، مینا دهقانی[۴]، فاطمه دهقانی[۱]

[۱]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج،ایران، [۲]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۳] مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر برسلامت، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج،ایران، [۴]بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۲/۷/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: بلوغ و لقاح تخمک در محیط آزمایشگاه نقش مهمی در بیولوژی تولید مثل دارد. هدف این مطالعه بررسی اثر فاکتور رشد شبه انسولینی بر روی بلوغ، لقاح و تکامل جنین به مرحله دو سلولی در محیط کشت TCM199 بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از موش‌های نژاد NMRI نابالغ ٤ هفته‌ای استفاده شد. برای تحریک تخمدان‌ها از ۷/۵ واحدPMSG استفاده شد. سپس تخمک‌هایGV با و بدون سلول کومولوس از تخمدان موش‌ها جدا شده و به در محیط کشت TCM199 حاوی ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد شبه انسولینی منتقل شدند. پس از ۲٤ ساعت تخمک‌ها به متافاز II رسیده و سپس تخمک‌های بالغ شده در محیط T6 با اسپرم لقاح داده شدند و تکامل جنینی تا مرحله دوسلولی در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. داده‌ها با آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: فاکتور رشد شبه انسولینی، میزان بلوغ ولقاح تخمک‌ها و تشکیل جنین دوسلولی در گروه با سلول کومولوس نسبت به گروه بدون کومولوس در محیط TCM199 را به طور معنی‌داری افزایش داد($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری:نتایج نشان می دهد افزودن فاکتور رشد شبه انسولینی به محیط کشت TCM و حفظ سلول های کومولوس اثر مفیدی بر میزان بلوغ، لقاح و تکوین به مرحله دو سلو لی تخمک ژرمینال وزیکول موش دارد.

واژه‌های کلیدی: تخمک، سلول کومولوس، بلوغ آزمایشگاهی، فاکتور رشد شبه انسولینی

*نویسنده مسئول: دکتر رضا محمودی، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی.
Email:rmahmoudi40@yahoo.com

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 3:45 +0430 on Saturday September 19th 2020

مقدمه

امروزه دانسته های ما از علم تولید مثل رو به افزایش است. کشت تخمک مرحله ژرمینال وزیکول و رشد آن تحولی در روش های کمکی تولید مثل[1] ایجاد کرده است(۱). رشد و نمو تخمک در خارج از بدن[2] یکی از روش‌هایی است که جدیداً در تکنولوژی کمک باروری(ART) به کار برده می‌شود. این روش به خصوص برای بسیاری از زنانی که قادر به بالغ کردن تخمک در داخل بدن خود نیستند و زنان سرطانی که در معرض دوزهای بالای اشعه یا شیمی درمانی قرار می‌گیرند روش مناسبی است(۲و۱).

استفاده از فاکتور و هورمون‌های رشد در بلوغ آزمایشگاهی جهت بهتر شدن نتایج باروری مفید می‌باشد. بررسی‌های زیادی در طی سال‌ها در این زمینه انجام شده که توانسته‌اند اثر مثبت این هورمون‌ها را نشان دهد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که کلاس های مختلفی از فاکتور های رشد مثل فاکتور رشد شبه انسولین[3] IGF-1 در مایع فولیکولار انسانی وجود دارند که در روند بلوغ تخمک، رشد و لقاح آن در یک سیکل طبیعی در بدن نقش دارند. در ضمن بررسی‌هایی که در زمینه بلوغ آزمایشگاهی(IVM) و لقاح آزمایشگاهی[4] (IVF) انجام شده ارتباط هورمون های رشد را با نقش LH در تخمک‌گذاری مرتبط دانسته‌اند (٤ و۳)، ولی از آنجا که تحت تأثیر داروهای تحریک کننده تخمدان سیکل تولید تخمک ظرف چند ساعت انجام می‌شود شاید فرصت کافی جهت تولید این فاکتورها در مایع فولیکولار نمی‌باشد، پس این تخمک‌ها از اثر کمکی هورمون‌های رشد محروم هستند. یکی از این فاکتورهای رشد[5] EGF می‌باشد که تأثیر آن بر روی بلوغ تخمک و گسترش سلول‌های کومولوس مفید بوده است(٤). دیکل و شریزلی(۱۹۸۵) اولین کسانی بودند که مطرح کردند فاکتور رشد می‌تواند باعث القای بلوغ تخمک‌های درون فولیکول موش صحرائی شود(٤). سیستم فاکتور رشد شبه انسولین(IGF-1) پروسه‌های متفاوتی شامل؛ تمایز سلول‌ها، تکثیر و مهاجرت آنها را تنظیم می‌کند(٥). فاکتور رشد شبه انسولینی نوع ۱ و ۲ در تخمدان گونه‌های مختلف مهره‌داران یافت شده است(۷ و٦). هم‌چنین پروتئین‌های متصل شونده به هورمون‌های رشد و گیرنده‌های آنها نیز در بافت تخمدان گونه‌های مختلف پیدا شده است(۹ و ۸).

مشاهدات اخیر نشان داده‌اند که فاکتور رشد(GH) و فاکتور رشد شبه انسولینی(IGF-1) ممکن است بر روی بلوغ تخمک‌ها، رشد جنین و باروری تأثیر مثبت داشته باشند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که اضافه کردن GH و IGF-1 به محیط کشت باعث افزایش میزان تقسیم شدن تخمک‌های گاوی و هم‌چنین پیشرفت بیشتر جنین‌ها به سمت مرحله بلاستوسیست‌ها می‌شود(۱۰). ترکیب IGF-1 و EGF باعث پیشرفت میوز و چرخه میتوتیک سلولی احتمالاً با افزایش سطح H1 و MAP کیناز در فاز اولیه بلوغ

1- Assisted Reproductive Technology (ART)
2- In Vitro Maturation (IVM)
3- Insulin-like growth factor (IGF-1)
4- In Vitro Fertilization (IVF)
5- Epidermal Growth Factor (EGE)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 3:45 +0430 on Saturday September 19th 2020

تخمک می‌شوند(۱۱). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که فاکتور شبه انسولینی(۱۳ و ۱۲) وEGF فاکتور رشد اپیدرمی در بلوغ هسته‌ای تخمک‌ها مؤثر هستند(۱٤ و۱۰). کشت آزمایشگاهی تخمک (IVM) درصد بالایی از تخمک‌های مرحله ژرمینال وزیکول را قادر می‌سازد تا به مرحله MII برسند. هر چند میزان باروری آزمایشگاهی بعد از IVM در حیوانات اهلی به طور وسیعی صورت می‌گیرد، اما در انسان چشمگیر نیست(۱٦ و۱۵) و هنوز پروتکل استانداردی برای IVM به طور دقیق پیشنهاد نشده است. در یک سری بررسی‌ها مشخص شد که تخمک‌هایی که در محیط آزمایشگاه بالغ شده‌اند در مقایسه با تخمک‌های بالغی که از تخمدان خارج شده‌اند سازش بیشتری با محیط آزمایشگاه جهت لقاح دارند(۱۸ و۱۷). از جمله مزایای این تکنیک می‌توان به عدم استفاده از FSH در درمان، کاهش تجویز دارو و جلوگیری از تحریک بیش از حد تخمدان در زنان با سندرم تخمدان‌های پلی کیستیک اشاره نمود. هر چند میزان باروری حاصل از IVM-IVF کمتر از درمان IVF به تنهایی است و شیوع سقط نیز در آن بالاتر است، اما این تکنیک موجب انتقال جنین‌های بیشتر جهت جبران باروری پایین می‌شود(۲۰-۱۷).

امروزه ناباروری به علت بیماری‌های مختلف شایع شده و از طرف دیگر بایستی به دنبال راهکارهایی بود تا بتوان عوارض ART را کاهش داد، لذا در این مطالعه اثر IGF-1 بر روند بلوغ، لقاح وجنین دو سلولی تخمک موش نژاد NMRI در محیط کشت TCM199 بررسی شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از موش‌های نژاد NMRI که ٤ هفته سن داشتند استفاده گردید. موش‌ها پس از ورود به حیوانخانه به مدت یک هفته از شرایط حیوانخانه‌ای طبق استانداردهای شناخته شده(۱۲ ساعت روشنایی و۱۲ ساعت تاریکی) و از آب و غذای کافی طبق دستورالعمل صادره در مورد حیوانات آزمایشگاهی برخوردار بودند. برای تحریک تخمدان‌ها ۷/۵ واحد بین المللی[1](PMSG) به طریق داخل صفاقی به موش تزریق شد. بعد از ٤۸ ساعت موش ها با کشش و جا به جای مهره های گردن[2] کشته شده و بلافاصله تخمدان موش را برداشته و در داخل محیط کشت HTF حاوی Bovine serum Albumin (5mg/mlBSA) قرار داده شدند. تخمک‌های مرحلهGV همراه با کومولوس(COCs) و تخمک مرحله بدون سلول‌های کومولوس(Denuded oocytes) DOs را به وسیله دو سوزن انسولین از فولیکول آنترال تخمدان پانکچر شدند. تخمک‌های جدا شده به طور تصادفی در چهار گروه به این شرح مورد مطالعه قرار گرفتند؛ گروه اول؛ تخمک‌های GV بدون سلول‌های کومولوس که فقط در معرض محیط کشت TCM199 قرار گرفتند(کنترل). گروه دوم؛ تخمک‌هایGV بدون سلول‌های کومولوس که درمعرض محیط کشت TCM199 و فاکتور رشد شبه انسولینی قرار گرفتند. گروه سوم؛ تخمک‌های GV با سلول‌های کومولوس که

1-Pregnant Mare Serum Gonadotropin(PMSG)
2-Dislocation

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 3:45 +0430 on Saturday September 19th 2020

فقط در معرض محیط کشت TCM199 قرار گرفتند(کنترل) و گروه چهارم؛ تخمک‌های GV با سلول‌های کومولوس که در معرض محیط کشت TCM199 و فاکتور رشد شبه انسولینی قرار گرفتند.

تخمک‌های GV به دست آمده از تخمدان موش در داخل ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت TCM199 حاوی ۰/۲۳ میلی‌مول پیروات سدیم،، ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین؛ ۱۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF-1)، ۷۵ میلی واحد بر میلی‌لیتر هورمون محرک فولیکولی(FSH) و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سرم جنین گاو(FBS) در دیش ۳۵ میلی‌متری (در هر قطره ۱۰ عدد تخمک) که قبلاً در انکوباتور به تعادل رسیده بود قرار داده شد. تخمک‌ها را به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن منتقل شدند. بعد از ۲٤ ساعت کشت در انکوباتور تخمک‌های GV که به متافاز ۲ رسیده بودند(خروج اولین جسم قطبی به عنوان مشخصه متافاز II در نظر گرفتیم) با اسپرم لقاح داده شدند.

تخمک‌های GV که به متافاز دوم رسیدند جهت لقاح به محیط IVF (محیط T6) حاوی ٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی(BSA) که به وسیله روغن معدنی(Mineral oil) پوشیده شده منتقل شدند. مراحل انجام لقاح به این ترتیب انجام شد؛ موش‌های نر نژاد NMRI که ۱۲ هفته سن داشتند، به روش جا به جایی مهره‌های گردنی کشته شدند سپس دم اپیدیدیم موش‌ها را جدا نموده و در قطره‌ای ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت IVF (محیط T6) حاوی ٤ میلی‌گرم BSA بر هر میلی‌لیتر قرار داده شد، سپس با سرنگ انسولین اسپرم از دم اپیدیدیم جدا شده و به داخل قطره محیط IVF که قبلاً در انکوباتور به تعادل رسیده بودند منتقل شدند. اسپرم به مدت ۲ـ۱/۵ ساعت جهت ظرفیت دار شدن در شرایط انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند. اسپرم‌های فعال و سالم که به طریق Siwm-up در کناره‌های قطره جمع شدند را به ۲۰۰ میکرولیتر محیط IVF حاوی تخمک‌ها اضافه شدند. به گونه‌ای که در هر میلی‌لیتر $۱×۱۰^{٦}$ اسپرم موجود باشد. به مدت ٦ـ٤ ساعت تخمک‌ها در مجاورت اسپرم در محیط IVF حاوی ٤ میلی‌گرم بر هر میلی‌لیترBSA قرار داده شدند و سپس تخمک‌ها چندین بار در محیط IVF قرار داده شده تا اسپرم‌ها کاملاً شسته شوند. پس از گذشت ٨ـ٦ ساعت از زمان لقاح تشکیل پیش هسته و پس از گذشت ٢٤ تشکیل جنین دوسلولی موش را با میکروسکوب معکوس بررسی شدند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که تعداد تخمک ژرمینال وزیکول در گروه کنترل با سلول کومولوس و هم‌چنین افزودن فاکتور رشد شبه انسولینی به محیط کشت TCM199 حاوی تخمک با کومولوس بعد از ٢٤

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 3:45 +0430 on Saturday September 19th 2020

ساعت کشت، میزان بلوغ تخمک در گروه با سلول کومولوس به طور معنی‌داری بیشتر از تخمک بدون کومولوس بود($p<۰/۰۵$). هر چند افزودن فاکتور رشد شبه انسولینی به به محیط کشت TCM199 حاوی تخمک بدون سلول کومولوس باعث افزایش بلوغ تخمک شد، ولی تفاوت آن با گروه کنترول معنی‌دار نبود (جدول ۱).

بر اساس نتایج حاصله تعدادی تخمک ژرمینال وزیکول بعد از ۲٤ ساعت کشت در محیط TCM199 به مرحله متافاز دوم رسیدند با اسپرم لقاح داده شدند و میزان لقاح و تکوین جنین به مرحه دوسلولی مورد بررسی قرار گرفت. میزان لقاح و تکوین جنین به مرحله دوسلولی در گروه‌های که تخمک ژرمینال وزیکول در هنگام کشت سلولی حاوی سلول کومولوس بودند به طور معنی‌داری بیشتر از تخمک ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس بودند($p<۰/۰۵$). هم‌چنین افزودن فاکتور رشد شبه انسولینی به محیط کشت در گروه حاوی سلول کومولوس میزان لقاح و تکوین جنین به مرحله دوسلولی بیشتر از گروه تخمک حاوی سلول کومولوس به تنهایی بود(جدول ۲).

میزان تخریب تخمک و جنین در گروه‌های حاوی سلول کولوس به طور معنی‌داری نسبت به تخمک‌های بدون بیشتر کومولوس بود. هم‌چنین وجود سلول کومولوس همراه با فاکتور رشد شبه انسولینی بر روی بلوغ و تکامل جنینی اثر مثبت داشت و باعث کاهش تخریب تخمک و جنین شد (جداول ۱و۲).

جدول ۱ : مقایسه میزان بلوغ تخمک ژرمینال وزیکول (GV) بعد از ۲۴ ساعت کشت در محیط TCM199 با استفاده از فاکتور رشد شبه انسولینی

متغیر / گروه	تعداد تخمک مرحله GV به دست آمده	تکامل به تخمک GVBD تعداد(درصد)	تکامل تخمک به متافاز دوم (MII) تعداد(درصد)	تخریب تعداد تخمک‌ها(Degenerated oocytes) تعداد(درصد)
تخمک GV باسلول کومولوس	۸۰	٦۰(٪۷۵)	۵۰(٪٦۲/۵)	۳۰(٪۳۷/۵)
تخمک GVبدون سلول کومولوس	۸۱	٤۹(٪٦۰/۵)	٤۱(٪۵۰/٦)	٤۰(٪٤۹/٤)
تخمک GV باسلول کومولوس با فاکتور رشد شبه انسولینی ۱	۱۲۲	۱۰٤(٪۸۵/۲)	۹٤(٪۷۷)	۲۸(٪۲۲/۹۵)
تخمک GVبدون سلول کومولوس با فاکتور رشد شبه انسولینی۱	۱۰۵	۷۳(٪٦۹/۵)	٦۰(٪۵۷/۱)	٤۵(٪٤۲/۸۵)

جدول ۲: مقایسه میزان لقاح و تکوین جنین به مرحله دوسلولی تخمک‌های ژرمینال وزیکول

متغیر / گروه	تعداد تخمک متافاز دوم	لقاح تخمک تعداد(درصد)	تکوین جنین به مرحله دوسلولی تعداد(درصد)	تخریب تعداد جنین ها(Degenerated embryos) تعداد(درصد)
تخمک GV باسلول کومولوس	۵۰	۳۵(٪۷۰)	۳۱(٪٦۲)	۲۹(٪٤۸)
تخمک GV بدون سلول کومولوس	٤۱	۲۵(٪٦۱)	۲۰(٪٤۸/۸)	۲۱(٪۵۱/۲)
تخمک GV با سلول کومولوس با فاکتور رشد شبه انسولینی	۹٤	۷۸(٪۸۳)	۷۰(٪۷٤/۵)	۲٤(٪۳۵/۵)
تخمک GV بدون سلول کومولوس با فاکتور رشد شبه انسولینی	٦۰	۳۸(٪٦۳/۳)	۳۵(٪۵۸/۳)	۲۵(٪٤۱/۷)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 3:45 +0430 on Saturday September 19th 2020

بحث

بلوغ و لقاح تخمک در محیط آزمایشگاه یکی از روش‌های کمک باروی می‌باشد که تحولی بزرگ در علم تولید مثل ایجاد کرده است(۲ و ۱). هدف این مطالعه بررسی اثر فاکتور رشد شبه انسولینی(IGF-1) بر روی بلوغ، لقاح و تکامل جنین به مرحله دو سلولی در محیط کشت بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حضور سلول های کومولوس باعث افزایش میزان رسیدن تخمک‌های ژرمینال وزیکول به MII می‌شود، هرچند که تخمک‌های ژرمینال وزیکول بدون کومولوس هم پتانسیل رسیدن به مرحله MII را دارند. در مطالعه‌های دیگر نشان داده شد که تخمک ژرمینال با سلول کومولوس نسبت به به تخمک ژرمینال وزیکول بدون کومولوس توانایی بیشتری برای تبدیل شدن به تخمک متافاز دوم، لقاح و تکامل جنینی به مرحله دو سلولی را دارند، زیرا وجود اتصال سوراخ دار بین تخمک و سلول کومولوس برای انتقال مواد ضروری برای تکامل و لقاح تخمک ضروری می‌باشند(۲۳ ـ۲۱). وجود سلول‌های کومولوس باعث القای میوز و سبب بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک می‌شود که برای تکامل جنین بعد از لقاح ضروری می‌باشند(۲٦ ـ۲٤). ضمن این که تخمک‌های بدون کومولوس به علت نبودن هماهنگی بین بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی‌توانایی بقای کمتری دارند(۲۲).

در این مطالعه در گروه‌هایی که فاکتور رشد به محیط‌ها اضافه شده بود میزان بلوغ در تخمک‌های با سلول کومولوس بیشتر بود که مطرح کننده این مطلب است که فاکتورهای رشد تأثیر خود را بیشتر از طریق سلول‌های کومولوس اعمال می‌کنند، علت آن تأثیر وجود تعدادی از گیرنده‌های فاکتورهای رشد بر روی سلول‌های کومولوس می‌باشد. میزان لقاح هم در این بررسی در حضور سلول‌های کومولوس نسبت به گروه‌های بدون کومولوس افزایش بیشتری داشت، ولی این تفاوت فقط در گروه هایی که به آنها فاکتو رشد اضافه شد معنی‌دار بود که شاید مطرح کننده این مطلب باشد که فاکتور رشد میزان لقاح تخمک‌های با سلول کومولوس را بیشتر افزایش می‌دهد(۲۵ و ۲٤). در مورد نقش سلول‌های کومولوس مطرح شده که احتمالاً این سلول‌ها با افزایش ظرفیت‌پذیری و قدرت نفوذ اسپرم‌ها میزان لقاح را افزایش می‌دهند و نیز تغییراتی در سیتوپلاسم و زوناپلوسیدای تخمک ایجاد می‌کنند که احتمال باروری طبیعی را بالا می‌برند(۲۷).

به نظر می‌رسد که سلول‌های کومولوس میزان پیشرفت به سمت مرحله دو سلولی را هم افزایش می‌دهد، ولی در این بررسی این افزایش در گروه هایی معنی‌دار بوده که به آنها فاکتور رشد هم اضافه شد، یعنی تأثیر فاکتور های رشد در پیشرفت به سمت مرحله دو سلولی در تخمک‌های با کومولوس نسبت به تخمک‌های بدون کومولوس بیشتر است که مطرح کننده این مطلب می‌باشد که شاید هورمون‌ها و فاکتورهای موجود در مایع فولیکولار اثر خود را از طریق سلول های کومولوس اعمال می‌کنند. نتایج این مطالعه نشان داد، فاکتورهای رشد شبه انسولینی

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 3:45 +0430 on Saturday September 19th 2020

باعث افزایش میزان بلوغ تخمک‌ها می‌شود(۲۸). در بررسی پرهیت و همکاران(۲۰۰۵) میزان بلوغ تخمک‌ها در حضور فاکتور رشد افزایش یافته بود(۲۹). گولر و همکاران(۲۰۰۰)در بررسی مطرح کردند که IGF-1 نتوانست باعث افزایش میزان بلوغ هسته ای و سیتوپلاسمی‌تخمک گوسفند شود که احتمالاً مربوط به غلظت استفاده شده بوده است، ولی در همین بررسی فاکتور رشد اپیدرمی(EGF) در غلظت مورد استفاده بلوغ تخمک‌ها را افزایش داده بود(۳۰). زوهو و همکاران(۱۹۹۱) در مطالعه خود تأثیر غلظت‌های مختلف فاکتورهای رشد را در رشد تخمک‌ها بررسی کرد که مشخص شد EGF در غلظت ۵۰ نانوگرم باعث کاهش رشد تخمک‌ها شده و IGF-1 در غلظت ۱۰۰ نانوگرم رشد تخمک‌ها را افزایش داده بود(۳۱). در بلوغ تخمک در گروه‌هایی معنی‌دار بوده که تخمک با کومولوس وجود داشته است و در گروه‌های که تخمک بدون سلول کومولوس فاکتور رشد اثر کمتری داشته است(۳۳ و ۳۲).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد اثر فاکتور رشد بر روی لقاح تخمک در تمام گروه‌ها بیشتر از گروه کنترل بوده است. در مطالعه‌ای نشان داده شد که فاکتورهای رشد در غلظت‌های مناسب باعث افزایش لقاح تخمک و رشد به مرحله دو سلولی می‌شوند(۳٤). هم‌چنین مطالعه نشان داد که فاکتورهای رشد باعث افزایش میزان لقاح تخمک می‌شوند(۲۹). در مطالعه حاضر تأثیر فاکتور رشد در لقاح تخمک‌های با کومولوس بیشتر از تخمک بدون کومولوس بود و این تفاوت بین دو گروه کاملاً معنی‌دار بود که شاید نشان دهنده نقش مثبت سلول‌های کومولوس در روند لقاح تخمک باشد. طبق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر فاکتور رشد باعث افزایش تکامل تخمک لقاح یافته به سمت مرحله دو سلولی می‌شود.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان می‌دهد پتانسیل بلوغ، لقاح و تکامل به مرحله دو سلولی در تخمک ژرمینال وزیکول با و بدون سلول کومولوس وجود دارد، ولی تخمک ژرمینال وزیکول با سلول کومولوس و افزودن فاکتور رشد شبه انسولینی به محیط کشت TCM199 میزان بلوغ، لقاح و تکامل به مرحله دو سلولی در تخمک ژرمینال وزیکول با سلول کومولوس بیشتر از تخمک ژرمینال وزیکول بدون کومولوس می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان نامه دکترای پزشکی عمومی بود که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فنآوری دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شد.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 3:45 +0430 on Saturday September 19th 2020

REFRENCES

1.Asen A. Article review. In vitro maturation of oocytes.OBG Net 2002; URL: www.obgyn. net livf vitro-maturation-oocytes.
2.Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction 2001; 121: 51-5.
3.Park JY, Su YQ, Ariga M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. Science 2004; 303(5658):682–4.
4.Dekel N, Sherizly I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. Endocrinology 1985; 116 (1): 406–9.
5.Wood AW, Duan CM, Bern HA. Insulin-like growth factor signaling in fish. Int Rev Cytol 2005; 243: 215-85.
6.Wood AW, Duan CM, Bern HA. Insulin-like growth factor signaling in fish. Int Rev Cytol 2005; 243: 215-85
7.Kagawa H, Moriyama S, Kawauchi H. Immunocytochemical localization of IGF-I in the ovary of the red seabream, Pagrus major. Gen Comp Endocr 1995; 99: 307-15.
8.Wandji SA, Wood TL, Crawford J, Levison SW, Hammond JM. Expression of mouse ovarian insulin growth factor system components during follicular development and atresia. Endocrinology 1998; 139: 5205-14.
9.Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Woad KJ. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. Reproduction 2002; 123: 789-97.
10.Lonergan P, Carolon C, Langendonckt AV, Donway I, Khatri H, Mermillod P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and pre-implantation embryo development in vitro. Biol Reprod 1996; 54: 1420–9.
11.Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried Rutledge ML, Nagai T, First NL. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. Reproduction 2002; 123: 135–42.
12.Herrler A, Lucas Hann A, Niemann A. Effects of insulin like growth factors-1 on in vitro production of bovine embryos. Theriogenology 1992; 37: 1213–24.
13.Palma GA, Muller M, Brem G. Effect of insulin-like growth factor 1 at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. J Reprod Fertil 1997; 110: 347–53.
14.Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factors on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. J Reprod Fertil 1994; 100: 439–46.
15.Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs in-vivo and in-vitro in the activation of ovarian eggs. J Exp Med 1935; 62: 665-75.
16.Suzuki M, Isumi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, et al. Successful piglet production by IVF of oocytes matured in vitro using NCSU-37 supplemented with bovine serum. Theriology 2006; 20: 374-86.
17.Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. Theriogenology 1999; 51: 59-70.
18.Farin PW, Crosier AE, Farin CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. Theriogenology 2001; 55: 151-70.
19.Yang BS, Im GS, Park SJ. Characteristics of Korean native,Hanwoo, calves produced by transfer of in vitro produced embryos. Anim Reprod Sci 2001; 67: 153-8.
20.Mahmoudi R, Rajaei F, Ragardi Kashani I, Abbasi M, Amidi F, Sobhani A, et al. The rate of blastocysts production following vitrification with step-wise equilibration of immature mouse oocytes.Iran J Reprod Med 2012; 10(5): 453-8.
21.Khosravi-Farsani S, Sobhani A, Amidi F, Mahmoudi R. Mouse oocyte vitrification: the effects of two methods on maturing germinal vesicle breakdown oocytes. J Assist Reprod Genet 2010; 27: 233–8.
22.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): 74-8.
23.Mahmodi R, Abbasi M, Amiri I, Ragardi Kashani I, Pasbakhsh P, Saadipour K, et al. Cumulus cell role on mouse germinal vesicle oocyte maturation,fertilization, and subsequent embryo development to blastocyst stage in vitro. Yakhteh Medical Journal 2009; 11(3): 299-302.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 3:45 +0430 on Saturday September 19th 2020

24.Mattioli M, Barboni B. Signal transduction mechanismfor LH in the cumulus–oocyte complex. Mol Cell Endocrinol 2000; 16: 19–23.
25.Mori T, Amano T, Shimizu H. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. Biol Reprod 2000;62: 913–9.
26.Mahmoudi R, RagardiKashani I, Abbasi M, Amidi F, Sobhani A, Abolhasani F, et al. In vitro maturation and fertilization capacity of mouse gv stage oocyte following stepwise vitrification. Journal of Clinical and Diagnostic Research 2008; 2: 1234-9.
27.Mahmoud RI, Amir II, Pasbakhsh P, Ragardi Kashani I, Abbasi M, Aboulhasani F, et al. The effects of vitrification on spindle apparatus of in vitro matured germinal vesicle in mice. Iranian Journal of Reproductive Medicine 2008; 6(4): 209-15.
28.Combelle CM, Cekleniak NA, Racowsky C, Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. Hum Reprod 2002; 17: 1006-16.
29.Purohit GN, Brady MS, Sharma SS. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexesin serum free media and their subsequentdevelopment in vitro 2005; 87: 229-39.
30.Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognié Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. Theriogenology 2000; 54(2): 209-18.
31.Zhou J, Chin E, Bondy C. Cellular-pattern of insulin-like growth factor-I (IGFI) and IGF-I receptor gene-expression in the developing and mature ovarian follicle. Endocrinology 1991; 129: 3281-8.
32.Izadiar F, Vatolht A, Colenbrander B, Bevers MM. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovin oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-1. Mol Reprod Dev 1997; 77: 80-175.
33.Kolle S, Sinowats F, Boie G, Lincoln D. Development changes in the expretion of the growth hormone reseptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovinovary. Biolreprod 1998; 59: 42-836.
34.Shabankareh HK, Zandi M. Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. Fertil Steril 2010; 94(1): 335-40.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 3:45 +0430 on Saturday September 19th 2020

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Influence of Insulin-like Growth Factor 1 on Nuclear Maturation of Germinal Vesicle Mouse Oocytes.

mahmoudi R1*, Mousavi E[2], Rabani SM, Akbartabar toori M, Deghani M [3], Deghani F[1]

[1]Cellular and Molecular Research Center,Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [2]Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [3] Social Determinants of Health Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [4] Shiraz University of Medical Sciences, Namazi Hospital, Shiraz, Iran

Received: 25 Sep 2013 Accepted: 15 Mar 2015

Abstract

Background & aim: In vitro maturation and fertilization of oocytes play an important role in reproductive biotechnology. The aim of this study is to define the IGF-1 effect on in vitro maturation, fertilization and development of mice immature oocytes to 2-cells in TCM199 medium cultures.

Methods: In this study 4 week old NMRI mice were used. Ovaries stimulation carried out using PMSG. GV oocytes with or without cumulus cells were isolated from ovaries and cultured in TCM199 in presence of 100 ng IGF-1 for 24hr.The oocytes (MII) were inseminated with sperm in T6 medium for fertilization and development of 2-cells stage and they were investigated under inverted microscope. Data analysis was performed by using Chi- 2 test.

Results: In cumulus cell group and in the presence of insulin-like growth factor fertilization of oocytes, forming embryos and the formation of 2-cells compared to the group without cumulus cells significantly increased ($p < 0.05$).

Conclusion: As the results showed oocytes with cumulus cells in the presence of insulin-like growth factor enhances maturation, fertilization and embryonic development in 2-cells oocytes compared to group without cumulus cells TCM199.

Key word: Oocytes, Cumulus cell, in vitro maturation, insulin-like growth factor 1

***Corresponding Author**: **Mahmoudi R,** Cellular and Molecular Reseach Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
Email: rmahmoudi40@yahoo.com