اثر گنادوتروپین جفتی انسان بر میزان تخمک‌های بالغ شده انسان در محیط کشت و جنین‌های هشت سلولی ایجاد شده به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک

دکتر جواد بهار آرا [*]
دکتر نزهت موسوی‌فر [**]
دکتر محسن جلالی [***]
فرزانه عدل [****]

[*] دکترای زیست‌شناسی سلولی تکوینی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

[**] متخصص زنان و نازایی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد ، مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری منتصریه، گروه زنان ، زایمان و مامایی.

[***] دکترای علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ، مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری منتصریه، آزمایشگاه مرکزی

[****] کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ وصول: ۱۳۸۶/۷/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۱۲/۸

مؤلف مسئول: دکتر جواد بهارآرا
پست الکترونیک:baharara@yahoo.com

چکیده:

مقدمه و هدف: درمان ناباروری با استفاده از بلوغ تخمک‌ها در محیط کشت آزمایشگاهی کاربردهای فراوانی دارد. این کار خطر تحریک بیش از حد تخمدان‌ها را کاهش داده و یک درمان جایگزین مناسب برای زنان دارای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک می‌باشد که در اثر تحریک تخمدان برای لقاح آزمایشگاهی دچار مشکل می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر گنادوتروپین جفتی انسان بر میزان تخمک‌های بالغ شده انسان در محیط کشت و جنین‌های هشت سلولی ایجاد شده به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک انجام گرفته است.

مواد روش‌ها: این مطالعهٔ تجربی در سال‌های ۱۳۸۶ــ ۱۳۸۵ در مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری منتصریه دانشگاه علوم پزشکی مشهد و آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد. تعداد ۱۶۸ تخمک نابالغ از بین تخمک‌های به دست آمده از تخمدان زنان کاندید لقاح آزمایشگاهی به صورت تصادفی به سه گروه مساوی؛ کنترل، تجربی ۱ و ۲ تقسیم‌بندی شدند؛ تخمک‌های نابالغ در گروه کنترل حاوی محیط کشت جی یک به علاوه آلبومین سرم انسانی ۱۰ درصد، گروه تجربی ۱ حاوی محیط کشت جی یک و آلبومین سرم انسانی ۱۰ درصد به علاوه گنادوتروپین جفتی انسان (۱۰ واحد در میلی‌لیتر) و گروه تجربی ۲ حاوی محیط کشت جی یک و آلبومین سرم انسانی ۱۰ درصد به علاوه گنادوتروپین جفتی انسان(۵ واحد در میلی‌لیتر) قرار داده شدند. میزان تخمک‌های بالغ شده پس از ۲۴ ساعت بررسی گردید. سپس تخمک‌های بالغ شده به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک بارور شده و در ادامه تعداد رویان‌های هشت سلولی ایجاد شده ۷۲ ساعت پس از لقاح به وسیله میکروسکوپ معکوس بررسی گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارSPSS و آزمون آماری مجذور کای تحلیل گردید.

یافته‌ها: یافته‌های این تحقیق نشان داد که هر دو غلظت گنادوتروپین جفتی انسان مورد استفاده سبب افزایش معنی‌دار میزان بلوغ اووسیت‌های نابالغ انسانی در هر دو گروه تجربی ۱ و ۲ در مقایسه با گروه کنترل شده است. همچنین میزان رسیدن رویان‌ها به مرحله هشت سلولی در دو گروه تجربی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p<۰/۰۵$). مقایسه آماری بین دو گروه تجربی ۱ و۲ با یکدیگر نشان داد میزان بلوغ اووسیت‌های نابالغ اختلاف معنی‌دار ندارد، اما تعداد رویان‌های هشت سلولی در گروه تیماری گنادوتروپین جفتی انسان(۵ واحد در میلی‌لیتر) نسبت به گروه تیماری گنادوتروپین جفتی انسان (۱۰ واحد در میلی‌لیتر)افزایش معنی‌داری نشان داد.

نتیجه‌گیری: هر دو غلظت گنادوتروپین جفتی انسان در محیط کشت باعث افزایش میزان تخمک‌های نابالغ انسانی و جنین‌های ایجاد شده به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک می‌شوند، اما استفاده از غلظت گنادوتروپین جفتی انسان (۵ واحد در میلی‌لیتر) سبب افزایش بیشتر میزان جنین‌های هشت سلولی ایجاد شده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها، گنادوتروپین جفتی انسان، تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک

مقدمه

بلوغ کامل اووسیت برای رشد و نمو مطلوب جنین در مراحل اولیه ضروری بوده و هر عامل دخیل در فاز رشد اووسیت‌ها و فولیکول‌ها در تخمدان، بر بلوغ اووسیت‌ها، لقاح و رشد و نمو اولیه جنین مؤثر است(۱). بلوغ اووسیت‌های انسان شامل دو فرایند است؛ الف- بلوغ هسته که با خروج اولین گویچه قطبی مشخص می‌شود ب- بلوغ سیتوپلاسمی که سبب سنتز پروتئین‌های لازم برای فرایند لقاح و تشکیل دوک‌های تقسیم می‌شود(۲). فرایند بلوغ اووسیت در محیط کشت برای اووسیت‌های برخی گونه‌های پستانداران و نیز انسان انجام شده است، اما این اووسیت‌ها اغلب فاقد کیفیت لازم برای رشد و نمو می‌باشند، به این دلیل سعی شده است تا شرایط مناسب و مطلوب برای بلوغ اووسیت در محیط کشت ایجاد شود که تا به حال در مورد اووسیت‌های برخی پستانداران موفقیت‌آمیز بوده است(۳).

مطالعات انجام شده نشان داده است محیط اطراف اووسیت، در طی بلوغ اووسیت در محیط کشت نقش بسیار مهمی در رشد و نمو آتی جنین ایفا می‌کند و نوع و غلظت مواد و سوبستراهای اضافه شده به محیط کشت، پروفایل‌های متابولیک و بلوغ اووسیت را تحت تأثیر قرار می‌دهد(۴). درمان ناباروری با استفاده از بلوغ تخمک‌ها در محیط کشت سبب کاهش خطر تحریک بیش از اندازه تخمدان[1] شده و برای زنان دارای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک[2] مفید واقع شده است(۵). سندرم تخمدان پلی‌کیستیک یکی از علل بیماری‌های تولید مثلی در زنان است. علایم کلینیکی آن شامل؛ عدم تخمک‌گذاری و هایپرآندروژنیسم بوده و در تست اولتراسوند لگنی فولیکول‌های فراوان در تخمدان‌ها مشاهده می‌شود(۷و۶).

از سال ۱۹۹۰ گزارش‌های مبنی بر ایجاد موفقیت‌آمیز نوزادان زنده پس از تلقیح تخمک‌های بالغ به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک برای انسان و موش در محیط بدن و تخمک‌های بالغ شده در محیط کشت برای گربه، خرگوش، گوسفند، خوک (۸)، سگ (۹) و موش خرما(۱۰) منتشر شده است. از آن جا که بلوغ آزمایشگاهی[3] یک شیوه نسبتاً ساده است، می‌تواند برای زنان سالم قبل از سیکل‌های لقاح آزمایشگاهی نیز به کار رود، به علاوه می‌تواند یک شیوهٔ درمانی سریع برای انجماد اووسیت یا جنین در بیماران مبتلا به سرطان یا بیماری‌های خود ایمنی پیش از انجام شیمی درمانی باشد(۵). استفاده از روش بلوغ آزمایشگاهی علاوه بر اجتناب از ریسک تحریک بیش از حد تخمدان دارای مزایای دیگری از جمله کاهش هزینه‌ها و طول مدت درمان و سهولت درمان نیز می‌باشد(۷). استفاده از گنادوتروپین‌ها در روش بلوغ آزمایشگاهی بسیار مورد توجه پژوهشگران بوده و تحقیقات نشان داده است که گنادوتروپین جفتی انسان برای بلوغ هسته و سیتوپلاسم ضروری و برای ایجاد اووسیت‌های مطلوب، مفید می‌باشد(۱۱)، اما مسئله مهم این است که

1-Ovarian Hyper Stimulation
2-Polycystic Ovarian Syndrome
3-In Vitro Maturation(IVM)

کدام غلظت از گنادوتروپین جفتی انسان در محیط کشت، بالاترین راندمان میزان بلوغ تخمک‌ها و جنین‌های هشت سلولی را ایجاد می‌کند؟ گنادوتروپین جفتی انسان عمل خود را از طریق گیرنده‌های هورمون لوتئینی کننده اعمال می‌کند که وظیفه اصلی آن حفظ و تولید پروژسترون در جسم زرد در طی مراحل اولیه بارداری است(۱۲). در یک تجربه که بر روی گامت‌های سگ انجام شد، اووسیت‌هایی که در محیط کشت، در معرض گنادوتروپین جفتی انسان قرار گرفته بودند، روند از سرگیری میوز را زودتر آغاز نموده و نسبت به گروه شاهد، تعداد بیشتری از اووسیت‌ها بالغ شدند(۹). با توجه به این که بلوغ تخمک‌ها در محیط کشت برای درمان ناباروری از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار می‌باشد، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر گنادوتروپین جفتی انسان بر میزان تخمک‌های بالغ شده انسان در محیط کشت و جنین‌های هشت سلولی ایجاد شده به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی و به مدت ۱۲ ماه در سال‌های ۱۳۸۶ـ ۱۳۸۵ در مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری منتصریه دانشگاه علوم پزشکی مشهد و آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد. قبل از انجام پژوهش از بیماران رضایت کتبی و آگاهانه اخذ گردید.

تخمک‌های زنان کاندید برای لقاح آزمایشگاهی در محدودهٔ سنی بین ۲۰ تا ۴۰ سال که برای درمان ناباروری تحت درمان سیکل‌های هورمون تحریک کننده فولیکول، هورمون یائسگی انسان و گنادوتروپین جفتی انسان[۱] قرار گرفته بودند آسپیره شد و از تخمک‌های نابالغ (تخمک‌های دارای وزیکول ژرمینال) موجود در بین تخمک‌های به دست آمده، برای انجام این تحقیق استفاده گردید(۶). برای رؤیت اولین گویچه قطبی آزاد شده (نشانه تخمک بالغ شده) سلول‌های گرانولوزای اطراف تخمک زیر استرئومیکروسکوپ به کمک آنزیم هیالورونیداز(۱ میکروگرم در میلی‌لیتر)[۲] جدا گردید.

در این پژوهش از محیط کشت جی یک[۳] به اضافه آلبومین سرم انسانی ۱۰ درصد[۴] ، در سه گروه زیر استفاده شد(۱۰ و۹)؛

گروه کنترل: حاوی محیط جی یک به علاوه آلبومین سرم انسانی ۱۰ درصد

گروه تجربی ۱: حاوی محیط جی یک به علاوه آلبومین سرم انسانی۱۰ درصد و گنادوتروپین جفتی انسان(۱۰ واحد در میلی‌لیتر)[۵]

گروه تجربی ۲: حاوی محیط جی یک به علاوه آلبومین سرم انسانی۱۰ درصد و گنادوتروپین جفتی انسان(۵ واحد در میلی‌لیتر) [۶]

تخمک‌های نابالغ به صورت تصادفی در سه

1-HCG
2-Hyase(Vitrolife,Sweden)
3-Version 3 G1(Vitrolife, Sweden)
4-(HSA)10%(Vitrolife, Sweden)
5-HCG 10 IU/ml(Organon Holland)
6-HCG 5 IU/ml(Organon Holland)

گروه مساوی پنجاه و شش‌تایی (کنترل ، تجربی۱ و ۲) در محیط کشت‌های فوق قرار داده شدند و روی آنها به وسیله روغن مینرال[۱] پوشانده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دی اکسید کربن ۵ درصد قرار داده شدند و در ادامه، بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز به وسیله میکروسکوپ معکوس الیمپوس ساخت ژاپن[۲] مورد مطالعه قرار گرفت. تخمک‌های دارای وزیکول ژرمینال به عنوان تخمک نابالغ و تخمک‌های دارای جسم قطبی به عنوان تخمک بالغ در نظر گرفته شدند.

اسپرم لازم برای انجام تجربیات به روش زیر آماده گردید؛ نمونه تازه مایع منی، در صبح روز عمل تخمک‌گیری تهیه و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا از حالت لخته خارج گردد. سپس در محلول شستشوی اسپرم[۳] با دو رقت ۹۰ درصد در قسمت پایین و ۵۰ درصد در قسمت بالای لوله فالکون[۴] به آهستگی ریخته شد تا دو محلول مخلوط نشود. سپس ۱۰دقیقه (۲۵۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. اسپرم‌های فعال در محلول ۹۰ درصد رسوب نمود و سپس محلول بالای رسوب دور ریخته شد و اسپرم‌های ته‌نشین شده با ۲ میلی‌لیتر محلول شستشوی اسپرم، شستشو داده شدند. پس از آن ۵ دقیقه (۲۰۰۰ دور دقیقه) سانتریفیوژ و محلول بالایی دور ریخته می‌شود(۱۳) .

تخمک‌های بالغ شده به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک تلقیح شدند. بدین‌ترتیب که ۲ میکرولیتر از محلول اسپرم‌های مذکور در قطره‌ای از محلول کاهش دهنده تحرک اسپرم[۵] در پلیت حاوی تخمک‌های بالغ قرار داه شد و به وسیله سوزن میکرواینجکشن در زیر میکروسکوپ معکوس، یک اسپرم فعال به سیتوپلاسم تخمک تزریق گردید. سپس اووسیت‌های لقاح یافته به مدت ۷۲ ساعت جهت مطالعه تسهیم تا مرحله هشت سلولی مورد بررسی قرار گرفتند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS[۶] و آزمون آماری مجذور کای[۷] تحلیل گردید.

یافته‌ها

مطالعه از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ تحت تأثیر هورمون گنادوتروپین جفتی انسان در گروههای تجربی ۱ و۲ نشان داد که از ۵۶ تخمک نابالغ مربوط به گروه کنترل بعد از ۲۴ ساعت ۴۰ تخمک (۷۱/۴ درصد)، از ۵۶ تخمک نابالغ مربوط به گروه تجربی ۱ بعد از ۲۴ ساعت۵۳ تخمک (۹۴/۶ درصد) و از ۵۶ تخمک مربوط به گروه تجربی ۲ پس از ۲۴ ساعت۵۴ تخمک (۹۴/۶درصد) به مرحله متافاز ۲ رسیدند (تصاویر ۲ و۱). بررسی آماری نتایج فوق نشان داده است که از نظر میزان بلوغ نمونه‌های

1-Mineral oil (Ovoil,Vitrolife,Sweden)
2-Olympus,Japan
3-Ham's F10(BIOCHROM-AG)
4-Falcon (New Jersy, USA)
5-PVP(Vitrolife, Sweden)
6-Statistical Package for Social Sciences
7-Chi-Square Test

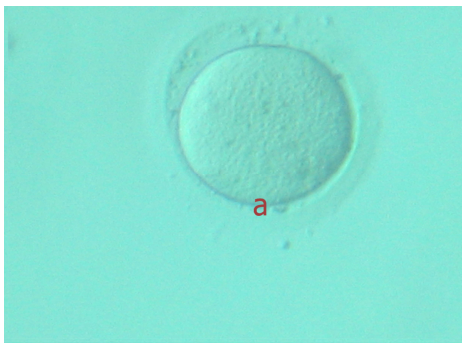
مربوط به گروههای تجربی ۱ و ۲ افزایش معنی‌دار در مقایسه با شاهد دارند ($p< ۰/۰۵$)، در حالی که مقایسه آماری گروه تجربی ۱ با ۲ هیچ گونه اختلاف معنی‌داری از نظر میزان بلوغ تخمک‌ها نشان نداد($p< ۰/۰۵$).

بررسی تکوین تخمک‌های لقاح یافته ، ۷۲ ساعت پس از لقاح به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک نشان داد که از ۴۰ تخمک لقاح یافته مربوط به گروه کنترل ۱۴ تخمک (۳۵ درصد) جنین‌ها در مرحله دو سلولی و ۲۶ تخمک (۶۵ درصد) نکروز شده بودند، در حالی که از ۵۳ تخمک لقاح یافته مربوط به گروه تجربی ۱ ، ۴ تخمک (۷/۵ درصد) از جنین‌ها در مرحله دوسلولی، ۲۲تخمک (۴۱/۵ درصد) در مرحله چهار سلولی و ۱۷ تخمک (۳۲/۱ درصد) در مرحله هشت سلولی قرار داشتند و ۱۰ تخمک(۱۸/۹درصد) نکروز شده بودند. همچنین از ۵۴ تخمک لقاح یافته مربوط به گروه تجربی ۲، ۱۵تخمک (۲۷/۸ درصد) از جنین‌ها در مرحله دو سلولی، ۳۹ تخمک (۷۲/۲ درصد) در مرحله ۸ سلولی قرارداشتند (تصویر ۳). بررسی آماری نتایج فوق نشان داد که از نظر تکوین تخمک‌های بالغ لقاح یافته و ایجاد جنین‌های هشت سلولی بین گروههای تجربی ۱و ۲ در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌دار وجود دارد($p< ۰/۰۵$)، همچنین مقایسه آماری تکوین تخمک‌های لقاح یافته و جنین‌های هشت سلولی بین گروه تجربی ۱ و گروه تجربی ۲با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان داد ($p< ۰/۰۵$)(جدول۱).

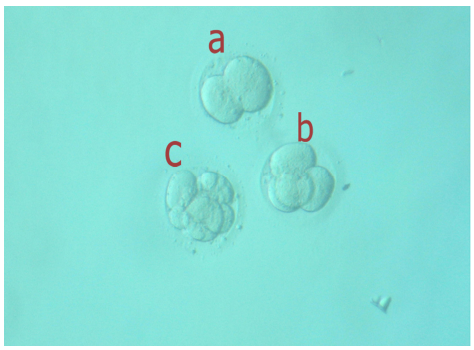
جدول ۱: مقایسه روند تکوین رویان ها ۷۲ ساعت بعد از لقاح به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک

گروهها روند تکوین	کنترل تعداد(درصد)	تجربی۱ تعداد(درصد)	تجربی ۲ تعداد(درصد)
دو سلولی	۱۴(۳۵)	۴(۷/۵)	۱۵(۲۷/۸)
چهار سلولی	۰(۰)	۲۲(۴۱/۵)	۰(۰)
هشت سلولی	۰(۰)	۱۷(۳۲/۱)	۳۹(۷۲/۲)
نکروز	۲۶(۶۵)	۱۰(۱۸/۹)	۰(۰)

تصویر۱: تخمک نابالغ انسان a) ژرمینال وزیکول b) فضای پری ویتلین



تصویر۲: تخمک بالغ انسان a) اولین گویچهٔ قطبی



تصویر۳: جنین‌های به دست آمده از لقاح تخمک‌های بالغ شده در محیط کشت a) دو سلولی b) چهار سلولی c) هشت سلولی

بحث و نتیجه‌گیری

بلوغ اووسیت نیازمند وقایع همزمان در هسته و بخش‌های دیگر اووسیت است که به تخمک این قابلیت را می‌دهد تا مراحل اولیه جنینی را با موفقیت طی کند. محیط مادری دارای یک سری هورمون‌های متنوع و سیگنال‌های پاراکرین است که در فولیکول به طور موقت بلوغ اووسیت را با رشد و نمو سلول‌های کومولوس و اوولاسیون متناسب می‌کند. اگر اووسیت پستانداران از محیط فولیکولی خارج گردد، میوز به طور خود به خود از سر گرفته می‌شود. با این وجود علی رغم بلوغ هسته‌ای در محیط کشت، این اووسیت‌ها موفق به انجام بلوغ سیتوپلاسمی نمی‌شوند، چون محیط کشت در سیگنال‌دهی به اووسیت ناتوان است و ارتباطی بین سلول‌های سوماتیک و تخمک وجود ندارد (۳). مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر گنادوتروپین جفتی انسان بر میزان تخمک‌های بالغ شده انسان در محیط کشت و جنین‌های هشت سلولی ایجاد شده به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک انجام گرفته است.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که این هورمون تعداد تخمک‌های بالغ شده در محیط کشت و جنین‌های حاصل از باروری این تخمک‌ها را افزایش می‌دهد. بر طبق اطلاعات موجود، سیکل میوزی در طی بلوغ اووسیت یک سیستم پویاست که از طریق یک سری وقایع آبشاری سلولی انجام می‌گیرد و تخمک وارد مرحلهٔ متافاز ۲ می‌شوند(۱۴). مطالعات نشان داده است، حضور گنادوتروپین‌ها برای بلوغ و افزایش ظرفیت رشد و نموی اووسیت‌ها مفید می‌باشد(۱). از سوی دیگر چندین سال است که تزریق گنادوتروپین‌ها به عنوان یک روش برای القاء رشد و نمو و افزایش تعداد فولیکول‌ها و تخمک‌گذاری متعدد در حیوانات و انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد و به کمک این روش با تحریک تخمدان تعداد اووسیت‌ها برای ایجاد جنین و مطالعات تولید مثلی در محیط کشت افزایش می‌یابد(۱۵). نتایج مطالعه جونک و همکاران[1](۲۰۰۲) نشان داده است که گنادوتروپین‌ها می‌توانند بلوغ هسته‌ای و از سرگیری میوز را در اووسیت‌های نابالغ به وسیله تأثیر بر غلظت درون سلولی آدنوزین منوفسفات حلقوی[2] کنترل نمایند(۱۶). همچنین مطالعات دیگر نشان داده است که بلوغ اووسیت‌ها و ایجاد بارداری و رشد جنین با تزریق گنادوتروپین جفتی انسان، ۳۶ ساعت پیش از آسپیراسیون تخمک‌های نابالغ در زنان دارای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک افزایش می‌یابد (۱۷و۱۳). نتایج حاصل از پژوهش‌های دیگر نیز بیان‌گر آن است که ۱/۵ تا ۵ ساعت پس از تزریق گنادوتروپین جفتی انسان علامت‌های لازم برای هماهنگی و کنترل سیکل سلولی ایجاد می‌شود(۳) و عدم توانایی در پاسخ به سیگنال‌های بلوغ منجر به نقص در از سرگیری میوز می‌گردد(۱۸). همچنین مطالعات انجام شده به وسیله اوکانا و همکاران[3](۱۹۹۹) نشان داده است که استفاده از گنادوتروپین جفتی انسان سبب افزایش اووسیت‌های بالغ، میزان لقاح و تعداد جنین‌ها در گاو می‌شود (۱۹). این یافته‌ها با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر

1-Junk et al
2-CAMP
3-Ocana et al

مطابقت دارد.

همچنین بر طبق تجربیات انجام شده به وسیله ریز و همکاران[1](۲۰۰٤) در سگ، گامت‌هایی که تحت تأثیر گنادوتروپین جفتی انسان قرار می‌گیرند، روند از سرگیری میوز را زودتر آغاز نموده و میزان بیشتری از تخمک‌ها نسبت به آنها که فاقد تیمار هورمونی هستند به بلوغ می‌رسند (۹). به علاوه تجربیات لی و همکاران[2](۲۰۰۲) بر اووسیت‌های موش خرما نشان داده است که کاربرد گنادوتروپین جفتی انسان به صورت تزریقی و نیز در محیط کشت سبب افزایش میزان بلوغ تخمک‌ها می‌شود(۱۰). این گزارش‌ها نیز با نتایج پژوهش حاضردر زمینه افزایش میزان تخمک‌های بالغ شده تحت تأثیر هورمون گنادوتروپین جفتی انسان هماهنگی دارد.

لچنیاک و همکاران[3](۲۰۰۵) نیز طی تحقیقات خود بر اووسیت‌های خوک گزارش نموده اند که ۹۸/٤ درصد تخمک‌ها در محیط حاوی گنادوتروپین جفتی انسان به مرحلهٔ متافاز II می‌رسند(۲۰). همچنین طبق یافته‌های به دست آمده از مطالعات براکت و زولک[4](۲۰۰۵) این گنادوتروپین سبب افزایش اکسیداسیون گلوکز در طی بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های گاو شده و ظرفیت رشد و نموی آن را افزایش می‌دهد(۲۱). نتایج وی بیانگر افزایش تعداد اووسیت‌های بالغ شده در محیط کشت و جنین‌های حاصل از آنها می‌باشد که با نتایج مطالعه حاضر سازگاری دارد.

بررسی‌های اونو و همکاران[5](۲۰۰۵) نیز نشان داده است، بلوغ سیتوپلاسمی ناکافی در محیط کشت سبب ایجاد تغییراتی در میکروتوبول‌های اووسیت، نقص در دوک تقسیم، ایجاد پیش هسته‌های نابالغ و نقص در رشد و نمو آتی جنین می‌شود؛ به این دلیل این هورمون سبب بلوغ سیتوپلاسمی، افزایش ظرفیت رشد و نموی اووسیت‌ها و در پی آن افزایش جنین‌های حاصل از باروری این اووسیت‌ها می‌شود(۲۲). تحقیقات انجام شده به وسیله اتویی و همکاران[6](۲۰۰٦) بر اووسیت‌های سگ نیز مشخص نموده است، درصد اووسیت‌هایی که در مرحله ژرمینال وزیکول متوقف می‌شوند در محیط کشت حاوی گنادوتروپین جفتی انسان بسیار کمتر از محیط فاقد این گنادوتروپین است(۲۳).

در پژوهش حاضر با استفاده از دو غلظت گنادوتروپین جفتی انسان (۵ و ۱۰ واحد در میلی‌لیتر) در محیط کشت، مشخص گردید که هر دو این غلظت‌ها منجر به افزایش تعداد اووسیت‌های بالغ می‌شود، اما پس از تلقیح تخمک‌ها به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک استفاده از گنادوتروپین جفتی انسان با غلظت ۵ واحد در میلی‌لیتر افزایش قابل ملاحظه‌تری در تعداد رویان‌های هشت سلولی نسبت به گنادوتروپین جفتی انسان با غلظت ۱۰ واحد در میلی‌لیتر ایجاد می‌کند. به نظر می‌رسد استفاده از غلظت بالاتر گنادوتروپین جفتی انسان باعث کاهش هماهنگی بین بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی می‌شود که می‌تواند

1-Reyes et al
2-Li et al
3-Lechniak et al
4-Brackett & Zuelke
5-Ueno et al
6-Otoi et al

به علت اختلال در روند ساخت پروتئین‌های لازم برای لقاح در شروع نمو اولیه باشد. به نظر می‌رسد در این وضعیت از سرگیری میوز قبل از اتمام بلوغ سیتوپلاسمی اتفاق می‌افتد. عدم ایجاد رویان‌های هشت سلولی در محیط کشت کنترل نیز این احتمال را تأیید می‌کند، زیرا محیط کنترل فاقد سیگنال‌های لازم برای بلوغ سیتوپلاسمی بوده و اگر چه اووسیت‌ها به بلوغ هسته‌ای نائل می‌شوند، اما در ایجاد پروتئین‌های لازم برای لقاح و رشد و نمو سلول تخم تا مرحله رویان‌های هشت سلولی ناتوان می‌باشند.

در مجموع یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که هر دو غلظت گنادوتروپین جفتی انسان در محیط کشت باعث افزایش بلوغ تخمک‌های نابالغ انسانی و جنین‌های ایجاد شده به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک می‌شوند، اما استفاده از غلظت گنادوتروپین جفتی انسان ۵ واحد در میلی‌لیتر سبب افزایش بیشتر میزان تکوین تخمک‌های لقاح یافته و ایجاد جنین‌های هشت سلولی به روش تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک نسبت به غلظت گنادوتروپین جفتی انسان ۱۰ واحد در میلی‌لیتر می‌گردد، لذا کاربرد غلظت۵ واحد در میلی‌لیتر این هورمون مناسب‌تر می‌باشد.

تقدیر و تشکر

از کلیه همکاران محترم مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری منتصریه دانشگاه علوم پزشکی مشهد به ویژه معصومه غلامیان و طوعه عبداللهی و نیز همکاران آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد سپاسگزاری می‌شود.

The Effect of HCG on in Vitro Maturation of Human Immature Oocytes and Rate of 8 Cell Embryos Mediated by ICSI

Baharara J [*], **Moosavifar N** [**], **Jalali M** [***], **Adl F** [****].

[*]Assistant Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
[**]Assistant Professor of Mashhad University of Medical Sciences, Montaserieh IVF Center, Mashhad, Iran
[***]Medical Laboratory Sciences Doctor, Montaserieh IVF Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad , Iran
[****]MA of Developmental Biology ,Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

KEYWORDS:
In Vitro Maturation(IVM), Human Chorionic Gonadotropin (HCG), Intra Cytoplasmic Sperm Injection(ICSI)

Received: 25/7/1386
Accepted: 8/12/1386

Corresponding Author: Baharara J
Email:baharara@yahoo.com

ABSTRACT:

Introduction & Objective: The infertility treatment by using in vitro matured oocyte has many potential applications. It minimizes the risk of ovarian hyper stimulation and is an alternative treatment for women with polycystic ovarian syndrome who may have problems regarding stimulation for IVF. This method may prove important for subjects in need of fertility preservation and also provides information about the final stage of oocyte maturation. The aim of this study was to determine the effect of HCG on the rate of in vitro matured oocyte and 8 cell embryos mediated by ICSI.

Materials & Methods: This experimental study was done in Montaserieh IVF center and Islamic Azad University at Mashhad. One hundred sixty eight immature oocytes aspirated from women undergoing IVF cycles were divided into 3 equal groups and allocated for maturation in 3 medium cultures. All of 3 culture groups contained G1 medium supplemented with HSA 10% (Human Serum Albumin). Control group had no gonadotropin, but the first experimental group contained HCG 10 IU/ml and the second experimental group contained HCG 5 IU/ml. Matured oocytes were fertilized by ICSI and numbers of 8-cell embryos were investigated 72 hours after fertilization by invert microscope.

Results: The results showed that both of the HCG concentrations significantly increased the rate of matured oocytes and also the rate of 8-cell embryos with respect to control group ($p<0.05$). No significant differences were found in rate of matured oocytes between the two experimental groups ($p>0.05$) while the number of 8-cell embryos was significantly higher in HCG 5IU/ml with respect to HCG 10IU/ml and control group ($p<0.05$)

Conclusion : The results suggests that both of the HCG concentrations increase the rate of maturation of immature oocytes and the rate of 8-cell embryos but HCG (5IU/ml) has more effect on the number of 8-cell embryos mediated by ICSI.

REFERENCES:

1.Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction 2001;121: 51-75.
2.Smith GD. In vitro maturation of oocyte. Current Woman's Health Reports 2001; 1: 145-51.
3.Sanfins M, Plancha CE, Overstorm EW, Albertini D. Meiotic spindle morphogenesis in in vivo and in vitro matured mouse oocytes: insights in to the relationship between nuclear and cytoplasmic quality. Human Reproduction 2004; 19: 2889-99.
4.Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilcrist RB, Thompson JC. Influence of oocyte secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. Reproduction 2003; 126**:** 27-34.
5.Hreinsson J, Rosenlund B, Friden B, Levkov L, Ek I, Suikkari A M, et al. Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in a clinical in vitro maturation programme : a randomized study. Human Reproduction 2003; 18: 2131-6.
6.Child TS, Philips SJ, Abdul Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for woman with polycystic ovaries. Obstetrics & Gynecology 2002;100: 665-70.
7.Chian RC, Bucket WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. Human Reproduction 2000;15: 165-70.
8.Nakai M, Kashivazaski A, Hyashi Y, Nakatsukasa E, Fuchimoto D, Noguchi J, et al. Viable piglets generated from porcin oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm head injection. Biology of Reproduction 2003;68: 1003-8.
9.Reyes MD, Lange J, Miranda P, Palominos J, Barros C. Effect of human gonadotrophin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocyte. Theriogenology 2004; 64(1): 1-11.
10.Li Z, Jiang Q, Rezaei sabet M, Zhang Y, Ritchie TC, Engelhardt JF. Condition for in vitro maturation and artifical activation of ferret oocytes. Biology of Reproduction 2002; 66: 1380-6.
11.Liu HC, He Z, Rosenwaks Z. Correlation of somatic cell steroid secretion and quality of generated oocytes after in vitro stimulation of mouse follicles. Animal Experimentation 2005;10: 9041-5.
12.Stenman UH, Tiitinen A, Alfthan H, Valmu L. The classification, function and clinical use of different isoform of HCG. Human Reproduction Update 2006;10: 1-16.
13.Son WY, Yoon SH, Park SJ, Yoon HJ, Lee WD, Lim JH. Ongoing twin pregnancy after vitrification of blastocysts produced by in vitro matured oocytes retrieved from a woman with polycystic ovary syndrome: Case report. Human Reproduction 2002; 17: 2963-6.
14.Son WY, Lee SY, Lim JH. Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocyte in in vitro maturation cycles. Human Reproduction 2005; 20: 3204-7.
15.Combelles CMH, Albertini DF. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotrophin stimulation in the mouse. Biology of Reproduction 2003; 68: 812-21.
16.Junk SM, Dharmarajan A, Yovich JL. FSH priming improves oocyte maturation, but priming with FSH or HCG has no effect on subsequent embryonic development in an in vitro maturation program. Theriogenology 2002; 59:1741-9.
17.Son WY, Yoon SH, Lee SW, Ko Y, Yoon HJ, Lim JH. Blastocyst development and pregnancies after in vivo HCG priming: case report. Human Reproduction 2002;17: 134-6.
18.Combelles CMH, Albertini DF, Racowsky C. Distinct microtubule and chromatin characteristics of human after failed in vivo and in vitro meiotic maturation. Human Reproduction 2003;18: 2124-30.
19.Ocana QJM, Moreno MM, Pinedo MM. In vitro bovine embryos production: influence of serum and hormonal supplementation. Arch Zootec 1999; 48:71-4.
20.Lechniak D, Szczepnkiewicz D, Kauss D, Szulc J, Szydlowski M. IVM media, oocyte diameter and donor genotype at RYR1 locus in relation to the incidence of porcine diploid oocytes after mautration in vitro. Hum Rep 2005; 64: 202-12.
21.Brackett BJ,Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. Theriogenology 1999; 39:43-64.
22.Ueno S, Kurome M, Ueda H, Tomii R, Hiruma K, Nagashima H. Effects of maturation condition on spindle morphology in porcine oocytes. Journal of Reproduction and Development 2005; 51: 27-34.
23.Otoi T, Shimizu R, Nooi H, WongsriKeao P. Meiotic competence of canine oocytes in collagen gel. Reproduction in Domestic Animals 2006;41:17-21.