مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۰، شماره۸، آبان ۱۳۹۴(شماره پی در پی۱۰۳)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

اثر فاکتور رشد شبه انسولینی -۱، سیستئامین و بتامرکاپتواتانول بر تکامل آزمایشگاهی تخمک نابالغ موش سوری

علیرضا دهقان منشادی[۱]، مهتاب رستمی‌حسینخانی[۱]، محسن نیک سرشت[۲]، عظیم هدایت پور[۳]، مهدی اکبر تبار طوری[۴]، صدرالله محرابی [۲]، رضا محمودی[۲*]

[۱] کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۳] گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، [۴]مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مؤثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۹۳/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: بلوغ آزمایشگاهی تخمک یک تکنیک نوید بخش برای کاهش هزینه‌ها و عوارض ناشی از تحریک تخمدان به وسیله گونادوتروپین‌ها می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر هم‌زمان فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ و آنتی‌اکسیدان‌های سیستئامین و بتا مرکاپتواتانول بر میزان تکامل آزمایشگاهی تخمک نا بالغ بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۴۸ ساعت پس از تزریق ۷/۵ واحد بین‌المللی PMSG به موش‌های ماده نا بالغ، تخمک‌های ژرمینال وزیکول از تخمدان موش‌ها جدا شدند. سپس این تخمک‌ها به محیط کشت TCM199 حاوی ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد شبه انسولینی -۱ و میزان ۱۰۰ میکرومول سیستئامین و بتا مرکاپتواتانول منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت کشت، تخمک‌ها به متاز دو رسیده و این تخمک‌های بالغ شده در محیط لقاح آزمایشگاهی لقاح داده شدند و تکامل جنینی تا مرحله دو سلولی مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های به دست آمده از این مطالعه به وسیله تست آماری آنالیز واریانس و پس آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بلوغ، لقاح و تشکیل جنین دوسلولی در تخمک ژرمینال وزیکول با سلول کومولوس درمحیط کشت TCM199 حاوی فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ ، سیستئامین و بتا مرکاپتواتانول، به ترتیب ۹۲/۱۰، ۹۳/۳۰، ۸۰/۶۰ درصد و در تخمک ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس در همین محیط کشت به ترتیب ۶۵/۸۰، ۶۴/۰۰، ۵۸/۶۰ بوده است. که این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد($p<0/001$).

نتیجه‌گیری: ترکیب هم‌زمان فاکتور رشد شبه انسولینی، سیستئامین و بتا مرکاپتواتانول، میزان بلوغ، لقاح و تشکیل جنین دو سلولی را در تخمک‌های با سلول کومولوس نسبت به تخمک‌های بدون سلول کومولوس به میزان بیشتری افزایش داد و این بیانگر ضرورت افزودن مکمل های فاکتور رشد و آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط کشت و وجود سلول کومولوس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تخمک ژرمینال وزیکول، فاکتور رشد شبه انسولینی، سیستئامین، بتا مرکاپتواتانول، بلوغ آزمایشگاهی

*نویسنده مسئول: **رضا محمودی**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

Email: rmahmoudi40@yahoo.com

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

مقدمه

بلوغ آزمایشگاهی تخمک پستانداران یک روش مفید برای تولید تخمک‌های بالغ جهت استفاده در تکنیک‌های کمک باروری از جمله لقاح آزمایشگاهی و تزرق درون سیتوپلاسمی‌اسپرم می‌باشد. در بسیاری از مراکز درمان ناباروری، القاء تخمک‌گذاری به منظور تهیه تخمک برای لقاح انجام می‌شود که علاوه بر عدم موفقیت در تحریک تخمدانی در بعضی از زنان، هم‌چنین هزینه بالا، پایین بودن کیفیت تخمک، خطر ایجاد سندرم تخمدانی تحریک بیش ازحد[۱] را نیز به دنبال دارد. از این رو بلوغ آزمایشگاهی می‌تواند یک روش جایگزین مناسب جهت تهیه تخمک بالغ در این موارد باشد(۳-۱). میزان حاملگی و تولد زنده با روش بلوغ و لقاح آزمایشگاهی[۲] تخمک ژرمینال وزیکول[۳] به دست آمده از فولیکول انترال، نسبت به تکنیکهای کمک باروری[۴] پایین‌تر می‌باشد(۴). میزان پایین تشکیل بلاستوسیت با روش بلوغ اووسیت در آزمایشگاه نسبت به بلوغ آن در درون بدن نشان می‌دهد که سیستم معمول بلوغ آزمایشگاهی به طور کافی در تکوین سیتوپلاسمی‌و بلوغ هسته‌ای اووسیت کارایی ندارد. از آنجایی که محیط رحم سرشار از مواد مغذی، هورمون‌های رشد و دیگر پروتئین‌های تنظیمی‌برای رشد و بقاء جنین می‌باشد(۵). بنابراین بهبود سیستم بلوغ اووسیت با هرچه بیشتر شبیه کردن شرایط آزمایشگاه به محیط درون بدن برای افزایش تشکیل جنین بسیار مهم است(۶). مطالعه‌ها نشان داد کلاس‌های مختلفی از فاکتورهای رشد مثل فاکتور رشد شبه انسولینی در مایع فولیکولار انسانی وجود دارند که در روند بلوغ تخمک و رشد و لقاح آن در یک سیکل طبیعی در بدن نقش دارند(۸ و۷). هم‌چنین این هورمون‌ها دارای نقش تنظیمی‌در عملکرد تخمدان، رحم و در نتیجه اثر تروفیک بر اندومتر و جنین می‌باشند(۹-۷). از آنجا که تحت تأثیر داروهای تحریک کننده تخمدان سیکل تولید تخمک ظرف چند ساعت انجام می‌شود فرصت کافی جهت تولید این مواد در مایع فولیکولار نمی‌باشد پس این تخمک‌ها از اثر کمکی هورمون‌های رشد محروم هستند(۸). هورمون رشد شبه انسولینی -۱ یک هورمون رشد مهم در خون می‌باشد که از اهمیت ویژه‌ای در برهم کنش بین اندومتر رحم و محصول حاملگی برخوردار است(۹). هم‌چنین این هورمون در تنظیم عملکرد سلول‌های سوماتیک فولیکول از جمله؛ تمایز، تکثیر و استروئیدوژنز نقش دارد(۱۰). مطالعه‌های متعددی نشان داده است که اضافه کردن فاکتور رشد شبه انسولینی -۱ به محیط کشت می‌تواند باعث پیشرفت بلوغ و تکوین اووسیت گردد(۱۱و۵،۹).

در شرایط محیط کشت تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن[۵] افزایش می‌یابد که این مولکول ها تأثیرات منفی بر تکامل اووسیت و جنین دارند (۱۲). ترکیبات تیولی با وزن مولکولی کم مانند بتا-مرکاپتو اتانول و سیستئامین می‌توانند با افزایش ساخت

1-ovarian hyper stimulating syndrome
2- In Vitro Fertilization (IVF)
3-Germinal Vesicle
4-Assisted reproductive technology (ART)
5- Reactive Oxygen Species

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

گلوتاتیون، موجب بهبود تکامل و کیفیت جنین گردند. گلوتاتیون یک تیول مهم درون سلولی است که عملکردهای بسیار مهمی در وقایع بیولوژیکی دارد، که شامل سنتز اسید نوکلئیک و پروتئین، انتقال آمینواسید و محافظت سلول در برابر اکسیداسیون می‌باشد(۱۲). بیوسنتز گلوتاتیون بستگی به در دسترس بودن سیستئین در محیط دارد. اضافه کردن سیستئین به طور مستقیم به درون محیط کشت، امکان پذیر نیست، چرا که سیستئن در محیط کشت به راحتی اکسیده شده و تبدیل به سیستین می‌گردد و در نتیجه باعث افزایش توکسیسیتی می‌شود. ترکیب‌های تیولی مانند بتا ـ مرکاپتو اتانول و سیستئامین می‌توانند با کمک به افزایش جذب سلولی سیستئین ساخت گلوتاتیون را افزایش دهند و افزودن این دو ترکیب باهم باعث بهبود تکامل و کیفیت جنین می‌شوند(۱۶ـ۱۴ و ۱۲).

در درون فولیکول تنظیم تکامل تخمک و عملکرد سلولی وابسته به ارتباطات سوراخدار۲ ، ارتباطات پاراکرین و بر هم کنش بین عناصر ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. سلول‌های کومولوس نقش مهمی در بلوغ تخمک دارند، این سلول‌ها در تولید و انتقال فاکتورهای ضروری شناخته و ناشناخته شده برای بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک و متعاقباً تکامل جنینی پس از لقاح نقش دارند. مطالعه‌های نشان داده‌اند که سلول‌های کومولوس با ترشح فاکتور القاء کننده میوز باعث شروع میوز می‌گردد. سلول‌های کومولوس نه تنها باعث تنظیم و پیشرفت بلوغ تخمک به مرحله متافاز دوم می‌شود بلکه بلوغ سیتوپلاسمی تخمک را پس از لقاح نیز سبب می‌گردد. ضمن این که در تخمک‌های بدون سلول کومولوس به علت نبود هماهنگی بین بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی توانایی بقای کمتری وجود دارد(۱۹ـ۱۷ و ۹، ۴، ۳).

و با توجه به ضرورت انجام تحقیق‌های بیشتر برای پیشرفت و بهبود روش‌های کمک باروری در محیط آزمایشگاهی، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر ترکیب هم‌زمان فاکتور رشد شبه انسولینی و آنتی‌اکسیدان‌های سیستئامین و بتامرکاپتواتانول بر تکامل تخمک نا بالغ موش سوری بود.

روش بررسی

در این پژوهش تجربی از ۲۷ موش نژاد سوری ماده نابالغ با ۴ هفته سن و ۱۰ موش‌نر نژاد سوری با ۱۲ هفته سن استفاده شد. موش‌ها از انسیتو رازی شیراز خریداری و در شرایط حیوان‌خانه‌ای (که طبق استانداردهای شناخته شده از ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و هم‌چنین آب، غذا، رطوبت و دمای کافی برخوردار بودند) نگهداری شدند. جهت نمونه‌گیری، از تخمدان هر موش به صورت میانگین ۲۵ عدد تخمک مرحله ژرمینال وزیکول به دست آمد. تعداد تخمک‌های مورد مطالعه در گروه اول تا چهارم به ترتیب ۱۸۱، ۱۸۰، ۱۷۴ و ۱۶۴ عدد بوده است. از نظر اخلاقی این طرح در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی یاسوج به تصویب رسید

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

و تمام کدهای اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی یاسوج رعایت گردید.

برای تحریک تخمدان‌ها، به موش‌های ماده نابالغ نژاد سوری، که ۴ هفته سن داشتند، ۷/۵ واحد بین المللی PMSG با استفاده از سرنگ انسولین به طریق داخل صفاقی تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG ، موش‌ها با کشش و جا به جای مهره‌های گردن کشته شده و بلافاصله تخمدان موش در داخل محیط کشت TCM199 قرار داده شد که این محیط کشت از شب قبل برای تعادل به مدت حداقل ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شده بود. تخمک‌های مرحله ژرمینال وزیکول همراه با سلول کومولوس و تخمک مرحله ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس با پاره کردن فولیکول آنترال تخمدان و سپس جدا کردن سلول‌های کومولوس اطراف تخمک به وسیله دو سوزن انسولین در زیر استریومیکروسکوپ از هم جداشدند. در نهایت تخمک‌های با و بدون سلول کومولوس با استفاده از پیپت‌های پاستوری که از قبل استریل شده و نوک آنها متناسب با قطر اووسیت‌ها نازک شده بود، برداشته و به طور تصادفی در چهار گروه مورد مطالعه قرار گرفتند که شامل؛ گروه اول، تخمک‌های ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس در معرض محیط کشت TCM199 قرار گرفتند (گروه کنترل). گروه دوم، تخمک‌های ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس که در معرض محیط کشت TCM199 به اضافه ی فاکتور رشد شبه انسولینی -۱ و سیتئامین وبتاـ مرکاپتواتانول قرار داده شد (گروه مداخله). گروه سوم، تخمک‌های ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس در معرض محیط کشت TCM199 قرار گرفتند(گروه کنترل). گروه چهارم، تخمک‌های ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس در معرض محیط کشت TCM199 به اضافه فاکتور رشد شبه انسولینی -۱ و سیتئامین و بتاـ مرکاپتواتانول قرار داده شد (گروه مداخله). در گروه‌های کنترل (گروه ۱ و ۳)، تخمک‌های ژرمینال وزیکول به دست آمده از تخمدان موش در داخل قطره ۱۰۰ میکرولیتری از محیط کشت TCM199، حاوی ۰/۲۳ میلی‌مول پیروات سدیم، یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فتوئین، ۱۰۰ واحد پنی سیلین، ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۷۵ میلی واحد بر میلی‌لیتر هورمون محرک فولیکولی و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سرم جنین گاو و در گروه‌های مورد مداخله (گروه ۲ و ۴) تخمک‌های ژرمینال وزیکول در همان محیط کشت به اضافه ی ۵۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد شبه انسولینی -۱ و میزان ۱۰۰ میکرومولار سیتئامین و بتاـ مرکاپتواتانول، در دیش ۳۵ میلی‌متری (در هر قطره ۱۰ عدد تخمک) که قبلاً در انکوباتور به تعادل رسیده بود قرار داده شدند. سپس تخمک‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 منتقل گشتند. بعد از ۲۴ ساعت کشت، اووسیت‌های ژرمینال وزیکول با و بدون سلول کومولوس که به متافاز ۲ رسیده بودند، جهت لقاح به محیط IVF (محیط T6) حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

سرم آلبومین گاوی که به وسیله روغن معدنی پوشیده شده بودند منتقل شدند. جهت بلوغ تخمک GV ابتدا غشا هسته‌ای آن ناپدید می‌شود و که به آن GVBD می‌گویند. سپس تخمکGVBD به تخمک MII تکامل می‌یابد. که این مرحله با نمایان شدن اولین جسم قطبی تأیید می‌شود. تخمک MII قابلیت بارور شدن به وسیله اسپرم را دارد(۱۹ـ۱۷و۴،۳).

جهت انجام لقاح آزمایشگاهی موش‌های نر سوری که ۱۲ هفته سن داشتند، به روش جا به جایی مهره‌های گردنی کشته شدند. سپس دم اپیدیدیم موش‌ها جدا گردید و در قطره ۲۰۰ میکرولیتری از محیط IVF (محیطT6)، حاوی ۴ میلی‌گرم سروم جنینی البومین گاوی بر هر میلی‌لیتر قرار داده شد و با سرنگ انسولین اسپرم‌ها از دم اپیدیدیم جدا شده و به داخل قطره محیط IVF که قبلاً در انکوباتور به تعادل رسیده بودند منتقل گشتند. اسپرم‌ها به مدت ۲ــ۱/۵ ساعت جهت ظرفیت دار شدن در شرایط انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 نگهداری شدند. و اسپرم های فعال و سالم که به طریق Swim-up در کناره‌های قطره جمع شده بودند به قطره‌های ۲۰۰ میکرولیتری محیط IVF حاوی تخمک‌ها اضافه گردید. به گونه ای که در هر میلی‌لیتر ۱۰۶×۱ اسپرم موجود باشد. به مدت ۶ـ۴ ساعت تخمک‌ها در مجاورت اسپرم قرار گرفته و سپس تخمک‌ها چندین بار در محیط IVF شستشو داده شد تا اسپرم ها کاملاً شسته شوند (۱۹ـ۱۷ و ۴، ۳).

پس از گذشت ۸ـ۶ ساعت، فرآیند لقاح [تشکیل پیش هسته (2PN)]، و پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان لقاح تشکیل جنین دو سلولی در زیر میکروسکوپ معکوس به ترتیب مورد بررسی قرار گرفت.

بعد از انجام آزمایش‌ها و جمع‌آوری داده‌ها ابتدا داده‌ها به صورت درصد در گروه‌های مختلف و در مراحل مختلف بلوغ و تکوین بیان شد و داده‌ها وارد نرم‌افزار SPSS و با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس و پس آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که میانگین درصد تکامل تخمک ژرمینال وزیکول به مرحله GVBD و MII در گروه کنترل، تخمک‌های با سلول کومولوس در محیط کشت TCM199 و هم‌چنین در گروه تخمک‌های با سلول کومولوس در محیط کشت TCM199 همراه با فاکتور رشد شبه انسولینی ـ۱و آنتی‌اکسیدان‌های سیستئامین و بتاــ مرکاپتواتانول بعد از ۲۴ ساعت کشت، به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های تخمک بدون سلول کومولوس بوده است($p<0/05$)، هر چند افزودن فاکتور رشد شبه انسولینی ـ۱و آنتی اکسیدان‌های سیستئامین و بتاــ مرکاپتواتانول به محیط کشت TCM199 حاوی تخمک بدون سلول کومولوس باعث افزایش بلوغ تخمک شده است، ولی

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

تفاوت آن با گروه کنترل معنی‌دار نبوده است(جدول ۱).

بر اساس نتایج حاصله، میانگین درصد لقاح و تکامل تخمک‌های ژرمینال وزیکول از متافاز دوم به مراحل لقاح و جنین دو سلولی در اووسیت‌های با سلول کومولوس در مقایسه با اووسیت‌های بدون کومولوس بیشتر بوده است. در ضمن هم در گروه‌های اووسیت با سلول کومولوس و هم گروه‌های اووسیت بدون سلول کومولوس میانگین درصد تکامل به مراحل لقاح تا جنین دوسلولی در محیط کشت TCM199 به اضافه ی فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ و آنتی اکسیدان‌های سیستئامین و بتاــ مرکاپتواتانول، بیشتر از محیط کشت TCM199 بوده است (جدول ۲).

همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، میانگین درصد لقاح(2PN) و تکامل به جنین دوسلولی، در گروه تخمک‌های با سلول کومولوس درمحیط کشت TCM199 حاوی مکمل‌های اضافه شده، بیشترین میزان و در گروه تخمک‌های بدون سلول کومولوس در محیط کشت TCM199، کمترین میزان بوده است که از لحاظ آماری، در بین تمام گروه‌ها تفاوت معنی‌دار آماری وجود داشته است (p<۰/۰۵)، تنها دربین دو گروه تخمک‌های بدون سلول کومولوس درمحیط کشت TCM199 به اضافه ی مکمل‌ها و تخمک‌های بدون کومولوس درمحیط کشت TCM199 تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد(جدول ۲).

میزان تخریب تخمک و جنین در گروه‌های حاوی سلول کولوس به طور معنی‌داری نسبت به تخمک‌های بدون کومولوس بیشتر بود(p<۰/۰۵) . همچنین وجود سلول کومولوس همراه با مکمل‌های اضافه شده بر ر وی بلوغ و تکامل جنینی اثر مثبت داشت و باعث کاهش تخریب تخمک و جنین شد(جداول۱و۲).

جدول ۱: مقایسه میزان بلوغ تخمک ژرمینال وزیکول بعد از ۲۴ ساعت کشت در محیط TCM199 با استفاده از فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ ، سیستئامین و بتامرکاپتواتانول

متغییر گروه ها	تعداد تخمک مرحله GV بدست آمده	تکامل به تخمک GVBD[a] تعداد(درصد)	تکامل تخمک به متافاز دوم(MII)[a] تعداد(درصد)	تخریب تخمک‌ها [a]تعداد(درصد)
تخمک GV بدون سلول کومولوس	۱۸۱	۱۳۲(۷۳/۳۰)	۱۱۳(۶۲/۷۰)	۶۸(۳۷/۶۰)
تخمک GV بدون سلول کومولوس همراه با فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ ، سیستئامین و بتامرکاپتواتانول	۱۸۰	۱۳۶(۷۶/۰۰)	۱۱۸(۶۵/۸۰)	۶۲(۳۴/۴۰)
تخمک GV با سلول کومولوس	۱۷۴	۱۵۱(۸۶/۹۰)[b]	۱۳۷(۷۸/۷۰)[b]	۳۷(۲۱/۳۰)[b]
تخمک GV با سلول کومولوس همراه با فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ ، سیستئامین و بتامرکاپتواتانول	۱۶۴	۱۵۷(۹۵/۸۰)[c]	۱۵۱(۹۲/۱۰)[d]	۱۳(۷/۹۰)[c]

a: آنالیز واریانس p<۰/۰۰۱

b: بین گروه ۳ در مقایسه با گروه ۱و۲ تفاوت معنی دار آماری وجود دارد(p<۰/۰۰۱)

c: بین گروه ۴ در مقایسه با گروه ۱و۲ (p< ۰/۰۰۱) و گروه ۳ (p< ۰/۰۵) تفاوت معنی دار آماری وجود دارد.

d: بین گروه ۴ در مقایسه با گروه ۱،۲ و ۳ ، تفاوت معنی دار آماری وجود دارد(p<۰/۰۰۱)

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

جدول۲: مقایسه میزان لقاح و تکوین جنین به مرحله دوسلولی تخمک‌های ژرمینال وزیکول

گروه ها / متغییر	تعداد تخمک متافاز دوم	لقاح تخمک تعداد(درصد)[a]	تکوین جنین به مرحله دوسلولی [a]تعداد(درصد)	تخریب چنین ها [a]تعداد(درصد)
تخمک GV بدون سلول کومولوس	۱۱۳	۶۸(۶۰/۴۰)	۶۳(۵۹/۹۰)	۵۰(۴۴/۲۰)
تخمک GV بدون سلول کومولوس همراه با فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ ، سیستئامین و بتامرکاپتواتانول	۱۱۸	۷۵(۶۴/۰۰)	۶۹(۵۸/۶۰)	۴۹(۴۱/۵۰)
تخمک GV با سلول کومولوس	۱۳۷	۱۰۴(۷۵/۹۰)[b]	۱۰۰(۷۲/۹۰)[b]	۳۷(۲۷/۰۰)[b]
تخمک GV با سلول کومولوس همراه با فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ ، سیستئامین و بتامرکاپتواتانول	۱۵۱	۱۴۱(۹۳/۳۰)[c]	۱۳۴(۸۸/۶۰)[c]	۱۷(۱۱/۳۰)[c]

a: آنالیز واریانس: p<۰/۰۰۱ و f =۲۶۲/۷۰

b: بین گروه ۳ در مقایسه با گروه ۱و۲ تفاوت معنی دار آماری وجود دارد (p<۰/۰۰۱).

c: بین گروه ۴ در مقایسه با گروه ۱،۲ و ۳ ، تفاوت معنی دار آماری وجود دارد (p<۰/۰۰۱).

بحث

با توجه به مشکلاتی که تحریک بیش از حد تخمدان برای جمع‌آوری تخمک های اضافی ایجاد می‌کند، لزوم بالغ سازی تخمک‌ها در محیط آزمایشگاهی به منظور کاهش این مشکلات و بهبود شرایط لقاح آزمایشگاهی در دهه اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است(۲۰). در مطالعه حاضر، تأثیر ترکیب هم‌زمان فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ و آنتی‌اکسیدان‌های سیستئامین و بتا ـ مرکاپتواتانول بر میزان تکامل آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ (با و بدون سلول کومولوس) ژرمینال وزیکول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان افزودن مکمل‌های، فاکتور رشد شبه انسولینی و سیستئامین و بتا مرکاپتو اتانول به محیط کشت حاوی تخمک برای بلوغ، لقاح و تکوین آزمایشگاهی تخمک ژرمینال وزیکول بسیار ضروری هستند. علاوه بر مکمل‌ها حضور سلول‌های کومولوس باعث افزایش میزان بلوغ تخمک‌های ژرمینال وزیکول و تشکیل جنین دوسلولی شده است، هر چند که تخمک‌های بدون سلول کومولوس نیز پتانسیل بلوغ به این مرحله را دارند، ولی در مقایسه با اووسیت‌های با سلول کومولوس میزان آن پایین‌تر است. محیط کشت TCM199 به همراه فاکتور رشد شبه انسولینی ـ۱ و آنتی‌اکسیدان‌های سیستئامین و بتاـ مرکاپتواتانول در تخمک‌های بدون سلول کومولوس در مقایسه با محیط کشت TCM199، توانسته است به میزان کمتری بلوغ تخمک افزایش دهد. در گروه‌هایی که فاکتور رشد شبه انسولینی ـ۱ به همراه آنتی‌اکسیدان‌های سیستئامین و بتاـ مرکاپتواتانول به محیط‌ها اضافه شده بود میزان بلوغ در تخمک‌های با سلول کومولوس بیشتر بود که به نظر می‌رسد این مکمل‌ها تأثیر خود را بیشتر از طریق سلول‌های کومولوس اعمال می‌کنند. سلول‌های کومولوس با توقف میوزی تخمک و سپس القاء ادامه میوز و همچنین بلوغ سیتوپلاسمی‌آن نقش بسیار

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

مهمی را در بلوغ تخمک بازی می‌کنند(۹و۳). در مطالعه حاضر هم‌چنین میزان لقاح و تکوین جنین دو سلولی در گروه‌های با سلول کومولوس به طور قابل توجهی بیشتر از گروه‌های بدون سلول کومولوس در محیط مشابه بوده است. همان‌طور که در مطالعه سوم و همکاران مطرح شده است که احتمالاً سلول‌های کومولوس با افزایش ظرفیت پذیری و قدرت نفوذ اسپرم‌ها میزان لقاح را افزایش می‌دهند. هم‌چنین این سلول‌ها تغییراتی در سیتوپلاسم و زوناپلوسیدای تخمک ایجاد می‌کنند که احتمال باروری نرمال را بالا می‌برند(۲۱). در مطالعه‌های انجام شده به وسیله محققان دیگر نشان داده شد که تخمک ژرمینال وزیکول با سلول کومولوس نسبت 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 سوخدار بین تخمک و سلول کومولوس برای انتقال مواد ضروری برای تکامل و لقاح تخمک ضروری می‌باشند(۲۴-۲۲و۹). وجود سلول‌های کومولوس باعث القای میوز(۲۵) و افزایش بلوغ سیتوپلاسمی می‌شوند(۲۶). بلوغ کافی و مناسب سیتوپلاسمی تخمک نقش تعیین کننده‌ای در توانایی تکاملی جنین بعد از باروری دارد. مطالعه‌ها نشان داده است که تخمک‌های GV بدون سلول کومولوس، به علت عدم هماهنگی بین بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی دارای تکامل کمتری نسبت به تخمک‌های همراه با سلول‌های کومولوس می‌باشند(۲۹-۲۷). هم‌چنین میزان خون رسانی و اکسیژن رسانی به تخمک‌ها وابسته به سلول‌های کومولوس می‌باشد که این نیز در میزان بقای جنین نقش دارد(۳). کونیشی و همکاران دریافتند که افزودن سلول‌های گرانولوزا به محیط کشت اووسیت گاوی، باعث بهبود کیفیت تخمک، افزایش تشکیل پرونوکلئوس نر و هم‌چنین افزایش تکامل جنینی می‌گردد(۳۰). که نتایج آنها مطابق با یافته‌های این مطالعه بوده است.

بر خلاف مطالعه حاضر آسادا و همکاران(۳۱) در تحقیق خود بیان کردند که سلول‌های کومولوس در مینکی وال، تأثیری بر میزان بلوغ اووسیت‌ها ندارد. هم‌چنین گیل و همکاران در مطالعه‌ای بر روی تخمک‌های خوک عنوان کردند که میزان لقاح و تکامل جنینی در تخمک‌های با سلول کومولوس کمتر از تخمک‌های بدون سلول کومولوس است(۳۲).

هم‌چنین در این مطالعه نشان داده شد که با اضافه کردن فاکتور رشد شبه انسولینی -۱ و آنتی‌اکسیدان‌های سیتئامین و بتا- مرکاپتواتانول به محیط کشت TCM199 میزان بلوغ، لقاح و تکامل جنین دو سلولی افزایش می‌یابد، به طوری که که این میزان در گروه اووسیت‌های با سلول کومولوس قابل توجهی می‌باشد، ولی در گروه سلول های بدون کومولوس با وجود این که اضافه کردن این مکمل‌ها میزان بلوغ، لقاح و تکامل جنینی را افزایش داده است، ولی این افزایش مختصر بوده است. آرمسترانگ و همکاران در مطالعه خود دریافتند که IGF-I با افزایش تکثیر سلول های کومولوس در بلوغ اووسیت تأثیر

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

مثبت دارد(۳۳). در بررسی پروهیت میزان بلوغ تخمک‌ها در حضور فاکتور رشد افزایش یافته بود (۳۴). گولر در بررسی خود مطرح کرد که IGF-1 نتوانسته است باعث افزایش میزان بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی‌تخمک گوسفند شود که احتمالاً مربوط به غلظت استفاده شده بوده است، ولی در همین بررسی فاکتور رشد اپیدرمی در غلظت مورد استفاده بلوغ تخمک‌ها را افزایش داده بود(۳۵). زوهو 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(۳۶). سیلویا و همکاران تأثیر سیستئامین را بر روی تولید آزمایشگاهی جنین گاو مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که به کار بردن ۱۵۰ میکرومولار سیستئامین در IVM، IVC، IVF، باعث افزایش تکوین جنینی می‌شود(۳۷). هرچند دوز به کار رفته در مطالعه آنها متفاوت با مطالعه حاضر می‌باشد، ولی مطابق با یافته‌های ما بوده است.

نتیجه‌گیری

ترکیب هم‌زمان فاکتور رشد شبه انسولینی ـ۱ و آنتی‌اکسیدان‌های سیستئامین و بتا مرکاپتواتانول در محیط کشت TCM199 باعث افزایش میزان بلوغ، لقاح و تکامل جنینی تخمک ژرمینال وزیکول با سلول کومولوس در موش نژاد سوری شده است، که این نشان دهنده اثر مثبت سلول‌های کومولوس بر بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی‌تخمک GV می‌باشد. هم‌چنین ترکیب هم‌زمان فاکتور رشد شبه انسولینی ـ۱ و آنتی‌اکسیدان‌های سیستئامین و بتا مرکاپتواتانول باعث افزایش بلوغ، لقاح و تکامل جنین دوسلولی در تخمک ژرمینال وزیکول با و بدون سلول کومولوس در موش نژاد سوری شده است، ولی این افزایش در تخمک‌های بدون سلول کومولوس قابل توجه نبوده است. هرچند تخمک‌های GV با و بدون سلول کومولوس پتانسیل تکامل را دارند، ولی وجود سلول‌های کومولوس در اطراف تخمک‌های GV برای بلوغ و تکوین جنینی ضروری می‌باشد. پس حفظ سلول‌های کومولوس برای تکامل،بلوغ و تکوین جنینی به دوسلولی بسیار اهمیت دارد.

از جمله محدودیت‌های این مطالعه بررسی نکردن پژوهش از نظر مولکولی، اندازه نگرفتن میزان رادیکال های آزاد در محیط کشت بوده است.

تقدیر و تشکر

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

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

REFRENCES

1. Asen A. Article review. In vitro maturation of oocytes. OBG Net 2002.
2.Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction 2001; 121: 51-5.
3.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.
4.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.
5. Simmen RCM, Ko Y, Simmer FA. Insulin-Like Growth Factor and blastocyst Development. Theriogenology 1993; 39: 163- 75,
6. Wang ZH, Chunquan FU, Songdong YU. Effects of green tea polyphenols, insulin-like growth factor I and glucose on developmental competence of bovine oocytes. Revista Brasileira de Zootecnia 2012; 41(12): 2418-23.
7. Toori MA, Mosavi E, Nikseresht M, Barmak MJ , Mahmoudi R. Influence of Insulin-Like Growth Factor-I on Maturation and Fertilization Rate of Immature Oocyte and Embryo Development in NMRI Mouse with TCM199 and α-MEM Medium. J Clin Diagn Res. 2014 Dec; 8(12): AC05-AC08.
8. Dekel N, Sherizly I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. Endocrinology 1985; 116(1): 406–9.
9. Palma GA, Muller M, Brem G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. Journal of Reproduction and Fertility 1997; 110: 347-53.
10. Pereira GR, Lorenzo PL, Carneiro GF, Ball BA, Pegoraro LMC, Pimentel CA, et al. Influence of equine growth hormone, insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins on in vitro maturation and cytoskeleton morphology in equine oocytes. The Animal Consortium 2013; 7(9) 1493- 99.
11. 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 complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. Anim Reprod Sci 2005; 87(3-4): 229-39.
12. Mohammadiroushandeh A, Pasbakhsh P, Habibiroudkenar M. Presence of antioxidant in in vitro maturation medium and its effects on glutathione level, spindle area and rate of in vitro fertilization. Iran J Med Sci 2008; 33 (1): 37-43
13. Meister A, Anderson ME. Glutathione. Annu Rev Biochem 1983; 52: 711-60.
14. Nikseresht M, Toori MA, Rasti T, Kashani IR, Mahmoudi R. The Nuclear Maturation and Embryo Development of Mice Germinal Vesicle Oocytes with and without Cumulus Cell after Vitrification. J Clin Diagn Res. 2015 9(1): AF01-4.
15. Anand T, Kumar D, Chauhan MS, Manik RS, Palta P. Cysteamine supplementation of in vitro maturation medium, in vitro culture medium or both media promotes in vitro development of buffalo (Bubalusbubalis) embryos. Reproduction, Fertility and Development 2008; 20: 253–7.
16. Kobayashi M, Lee ES, Fukui Y. Cysteamine or b-mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology 2006; 65: 1191–9.
17.Mahmoudi R, Ragardi Kashani 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.
18.Mahmoudi R, Rajaei F, Ragardi Kashani I, Abbasi M, Amidi F, Amiri I. The rate of blastocysts production following vitrification with step-wise equilibration of immature mouse oocyte. Iranian Journal of Reproductive Medicine 2012; 10(5): 453-8.
19.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.
20. Hreinsson J, Rosenlund B, Friden B, Levkov L. Recombinant LH is equally effective as recombinant HCG in promoting oocyte maturation in clinical in vitro maturation programme. Hum Repro 2003; 18: 2131-6.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

21. Tanghe S, Soom AV, Nauwynck H, Coryn M, Dekruif A. function of the cumulus ophorous during oocyte maturation, ovulation and fertilization. Mol. Repord Dev 2002; 61: 414-24.
22. McEvoy TG, Robinson JJ, Sinclair KD. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. Reproduction 2001; 122(4): 507-18.
23. Silva DS, Pereira LP, Navarro RB, Rosa DC, Pessoa GA, Silva CAM, et al. In vitro production of Bostaurusindicus embryos with cysteamine. Anim Reprod 2010; 7(1): 29-34.
24. Gasparrini B1, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, et al. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (Bubalusbubalis) oocytes with thiol compounds. Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. Theriogenology 2006; 65: 275-87.
25. Mattioli M, Barboni B. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus–oocyte complex. Mol Cell Endocrinol 2000; 161: 19–23.
26. 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.
27. Smitz J, Nogueira D, Albanao C, Cortvrindt R, Devroey P. Improving in vitro maturation of oocytes in the human taking lessons from experience in animal species. Reprod Dom Anim 2001; 36: 11–7.
28. Ebrahim Nasiri, Reza Mahmoudi, Mohammad Hadi Bahadori, Iraj Amiri. The Effect of Retinoic Acid on *In vitro* Maturation and Fertilization Rate of Mouse Germinal Vesicle Stage Oocytes. Cell J. 2011; 13(1):19-24.
29. Abbasi M, Akbari M, Amidi F, Ragerdi Kashani I, Mahmoudi R, Sobhani A, et al. Nitric oxide acts through different signaling pathways in maturation of Cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *DARU 2009 17 (1); 49-52*.
30. Kinship M, Aoyagi Y, Takedomi T, Itakura H, Itoh T, Yazawa S. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved in vitro development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. Theriogenology 1996; 45(3): 573-81.
31. Asada M, Horii M, Mogoe T, Fukui Y, Ishikawa H, Ohsumi S. In vitro maturation and ultrastructural observation of cryopreserved minke whale. (Balaenopteraacutorostrata) follicular oocytes. Biol Reprod 2000; 62(2): 253-9.
32. Gil MA, Ruiz M, Cuello C, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. Influence of sperm: oocyte ration during in vitro fertilization of in vitro matured cumulus-intact pig oocytes on fertilization parameters and embryo development. Theriogenology 2004; 61: 551-60.
33. Armstrong DT, Xia P, Gillian DE, Gannes GD, Tekpetey FR, Firouz KH. Differential Effects of Insulin-Like Growth Factor-I and Follicle-Stimulating Hormoneon Proliferation and Differentiation of Bovine Cumulus Cells and Granulosa Cells. Biology of Reproduction 1996; 54: 331-8.
34. Purohit 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 subsequent development in vitro. Animal Reproduction Science 2005; 87: 229-39.
35.Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, CogniéY. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. Theriogenology 2000; 54(2): 209-18.
36. 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: 3281-88.
37. Silva DS, Pereira LP, Navarro RB, Rosa DC, Pessoa GA, Silva CAM, Rubin MIB. In vitro production of Bostaurusindicus embryos with cysteamine. Animal Reproduction Science 2010; 7(1): 29-34.

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

Original Article

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:48 +0430 on Friday June 18th 2021

The Effect of Insulin-like Growth Factor-1, Cysteamine and β-Mercaptoethanol on the In Vitro Maturation of Immature Mice Oocytes

Dehghan Manshadi A[1], Rostami Hosseinkhani M[1], Nikseresht M[2], Hedayatpoor A[3], Akbartabar toori M[4], Mehrabi S[2], Mahmoudi R[2*]

[1]Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [2]Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [3]Department of Anatomy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, [4]Social Determinants of Health Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

Received: 5 Jan 2015 Accepted: 19 Aug 2015

Abstract

Background & aim: In vitro maturation of oocytes is a promising technique for reducing the costs and complications of ovarian stimulation by gonadotropins. The aim of this study was to investigate the effects of combination of insulin-like growth factor-1 and antioxidant cysteamine and **β-**Mercaptoethanol on maturation and fertilization of immature oocytes.

Methods: in this experimental study, following 48 hrs injection of 7.5 IU PMSG to immature female mice, the germinal vesicle oocytes from ovaries were removed and transferred to TCM199 culture medium containing 50 ng /ml insulin-like growth factor-1 and 100 µmol Cysteamine and **β** -Mercaptoethanol. After 24 hrs of culture, the oocytes of MII in IVF were fertilized and embryonic development to the two cells was studied under an inverted microscope. Data analysis was performed by using ANOVA and Post hoc Tukey test.

Results: The results showed that the rate of maturation, fertilization and 2-cell embryo formation in GV oocytes with cumulus cells in TCM199 medium containing insulin-like growth factor-1, Cysteamine and BME were 92.10, 93.30, 80.60% and in the GV oocytes without Cumulus cells were cultured in the same medium were 65.80, 64.00, 58.60% respectively which were statistically significant (P <0.001).

Conclusion: In the present study, the simultaneous combination of insulin-like growth factor-1, **β-**Mercaptoethanol and CYS increased maturation, fertilization and developmental rate to 2-cells stage with cumulus cells more than the oocyte without cumulus cells to a greater extent. This represented the need of adding supplemental growth factors and antioxidants to the medium and is associated with cumulus cells.

Key words: Germinal vesicle oocytes, insulin-like growth factor 1, Cysteamine, Beta-Mercaptoethanol, Cumulus cell, in vitro maturation

***Corresponding author: Mahmoudi R**, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Email: rmahmoudi40@yahoo.com

Please cite this article as follows:

Dehghan Manshadi A, Rostami Hosseinkhani M, Nikseresht M, Hedayatpoor A, Akbartabar toori M, Mehrabi S. et al. The Effect of Insulin-like Growth Factor-1, Cysteamine and β-Mercaptoethanol on the In Vitro Maturation of Immature Mice Oocytes. Armaghane-danesh 2015; 20 (8): 720-731.