مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره دوازدهم، شمارهٔ ۴، مهر- آبان ۱۳۸۹، صفحه ۳۴-۲۷

ارزیابی تاثیر هورمون FSH بر رشد و بلوغ اووسیت و فولیکولهای پری آنترال موش در حالت Invitro

فاطمه برزگری فیروزآبادی(MSc)[1*]، آمنه جاوید(MSc)[2]، سعید رضایی زارچی(PhD)[1]

۱- دانشگاه پیام نور یزد، مرکز تفت
۲- مرکز پژوهش بالینی ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

دریافت: ۸۹/۳/۴ ، اصلاح: ۸۹/۵/۱۳، پذیرش: ۸۹/۷/۱۴

خلاصه

سابقه و هدف: بلوغ اووسیت در محیط Invitro (IVM) تکنیکی موثر برای کاهش قیمت و تقلیل اثرات جانبی تحریکات گنادوتروپین ها در لقاح Invitro (IVF) شناخته شده است. انواع سیستم های کشت فولیکولی Invitro که در مراحل مختلفی از رشد به سر میبرند به ما اجازه شناسایی این فاکتور ها و درک مکانیسم فعالیت آنها را می دهد. این مطالعه به منظور ارزیابی تاثیر هورمون FSH روی رشد فولیکول های پره آنترال موش و تمایز آن ها در طول دوره کشت در محیط Invitro انجام شد.

مواد و روشها: این مطالعه نیمه تجربی بر روی ۳۰ موش سوری ۶ تا ۸ هفته ای ماده انجام شد. برای آماده سازی فولیکول های پره آنترال تخمدان ها با دقت جدا شده و در پتریدیش های پر شده با محیط کشت پایه در دمای اتاق قرار داده شد. مقادیر خاصی از FSH (غلظت های۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۰۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و ۲۲۰ واحد / لیتر از FSH) به محیط کشت های انتخابی (حاوی ۳۰-۲۵ فولیکول) اضافه شد. اثرات غلظت های مختلف گنادوتروپین محرک فولیکولی (FSH) روی رشد، زیست پذیری فولیکولها و بلوغ اووسیت ها پس از ۶ روز ارزیابی شد.

یافته ها: درصد بقاء فولیکول ها در روز ششم به ۳۰٪ در مقایسه با روز دوم (۱۷٪)، چهارم (۲۴٪) و روز هشتم (۲۹٪) افزایش یافت ($p<0/05$). در طول مطالعه غلظت ۱۰۰ واحد / لیتر از FSH بیشترین اثرات معنی دار را روی رشد فولیکول ها و اووسیت نشان داد، به طوری که میزان زیست پذیری فولیکولی به ۹۱٪ در مقایسه با شرایط بدون FSH (۲۸٪) رسید. درصد بقاء فولیکولها در روز ششم به ۳۰٪ در مقایسه با روز دوم (۱۷٪)، چهارم (۲۴٪) و روز هشتم (۲۹٪) افزایش یافت ($p<0/05$). بلوغ اووسیت (۶۱٪) و میزان گسیختگی وزیکول ژرمینال (۸۱٪) نیز افزایش قابل توجه ای نشان دادند.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که سرعت رشد فولیکولی تا روز ششم به طور خطی افزایش می یابد اما بعد از آن تقریبا ثابت می شود. ثبات تدریجی این سرعت در طول دو روز آخر کشت در محیط TCM199 بر این نکته اشاره دارد که این شرایط محیط کشت برای نگهداری یک محیط کشت فولیکولی کافی نیست و فولیکول ها به مکمل های رشدی بیشتری نیاز دارند.

واژه های کلیدی: ***هورمون محرک فولیکولی، فولیکول های پره آنترال، موش سوری، بلوغ اووسیت.***

مقدمه

توسعه و بهبود شرایط کشت آزمایشگاهی برای بلوغ اووسیت در محیط (Invitro)، پیشرفتی در درمان ناباروری انسان و حیوانات محسوب می شود (۱). بلوغ اووسیت در محیط Invitro (IVM) به عنوان تکنیکی موثر برای کاهش قیمت و تقلیل اثرات جانبی تحریکات گنادوتروپین ها در لقاح Invitro (IVF) شناخته شده است. میزان باروری اووسیت آزمایشگاهی نسبت به اووسیتی که در محیط Invivo تحریک شده، بسیار کمتر و کندتر است که نشان می دهد هنوز

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۳۰/۱۱۲۸۷ دانشگاه پیام نور یزد، مرکز تفت می باشد.
* مسئول مقاله:
آدرس: یزد، دانشگاه پیام نور یزد، مرکز تفت، تلفن: ۰۳۵۲-۶۲۳۲۸۰۰
e-mail:f.barzegary@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.4.4.2]

در این زمینه کارهای زیادی برای پژوهش وجود دارد (۲). دست یابی به روش های نوین می تواند در تکثیر بسیاری از حیوانات اهلی و غیر اهلی (که نسل آنها در معرض انقراض است) مورد استفاده قرار گیرد (۳و۲). تحقیق و پژوهش در این زمینه از بیولوژی انسانی بسیار سخت و مشکل است. امروزه استفاده از مدل جوندگان پیشرفته ترین و عالی ترین سیستم را برای مطالعه در زمینه پیشرفت فولیکولی در محیط Invitro فراهم کرده است (۵و۴و۱).

اووژنز (تولید تخمک) فرآیند پیچیده ای است که بوسیله فاکتور های مختلف اتوکرین و پاراکرین تنظیم می‌شود. در طول هر سیکل و دوره جنسی، افزایش غلظت هورمون محرک فولیکولی باعث رشد فولیکول های پره آنترال می‌شود (۶و۱). مطالعاتی که بر روی حیوانات بدون مخ انجام شده نشان می دهد که گنادوتروپین های FSH و LH، همچنین گیرنده هایشان برای حفظ تولید مثل جانور ماده ضروری است (۸و۷و۱). به طوری که موش های ماده ای که دارای هورمون محرک فولیکولی ناقص هستند، قدرت باروری ندارند (۹). در افراد ماده، اندام و هدف اصلی هورمون محرک فولیکولی، بافت تخمدان است جائیکه هورمون محرک فولیکولی گسترش فولیکولی، بلوغ اووسیتی و تخمک گذاری را تحریک می کند (۱۱و۱۰و۵). هورمون محرک فولیکولی همچنین از آپوپتوزیز سلول های گرانولوزا در محیط های Invitro و invivo ممانعت بعمل می آورد (۱۲و۴و۱). این هورمون با چندین فاکتور رشد از جمله EGF، ActivinA، اینهیبین، فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF-۱) واکنش می دهد و آنها را فعال می کند. برای تقلید این فعالیت ها در شرایط Invitro، معمولا FSH به محیط کشت فولیکول های پره‌آنترال موش اضافه می شود (۱۵-۱۳).

زمانی که فولیکول ها در شرایط Invitro کشت داده می شود شرایط موجود در محیط کشت و مواد غذایی محیط کشت در میزان زیست پذیری، رشد، بلوغ اووسیت و میزان اووسیت هایی که می توانند تخمک گذاری کنند بسیا حائز اهمیت است بنابراین کشف این شرایط احتیاج به آزمایشات زیادی دارد. همانگونه که Eppig نشان داد تقابل و واکنش اووسیت و سلول های توده‌ای اطراف اووسیت در تعیین کفایت اووسیت در حال رشد بسیار اهمیت دارد. با تعدیل مناسب ترکیبات محیط کشت از جمله انواع سلول ها (وجود سلول های تکا یا فقدان آن) نسبت و غلظت گنادوتروپین ها، فاکتور های رشد (انسولین، IGFI، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و منابع پروتئین (آلبومین، مکمل های ترکیبی سرم) می توان به یک محیط کشت مناسب دست یافت (۴). هم چنین حفظ فاکتور هایی مثل PH و درجه حرارت که تحت کنترل شدیدی هستند برای دست یابی به نتیجه و محصولات ایده آل مهم و ضروری است. زمانی که فولیکول ها در محیط Invitro کشت داده می شوند تهیه مواد غذایی لازم و فاکتور های طبیعی برای لایه های داخلی فولیکول خیلی حیاتی و ضروری است (۱۶و۱۵). مواد غذایی، فاکتور های رشد و اکسیژن باید از طریق یک لایه فولیکولی بدون رگ انتشار یابد. آزمایشات نشان می دهد در چنین شرایطی درصد فولیکول ها و اووسیت های زیست پذیر کاهش می یابد احتمالا به این علت که در کشت Invitro، جبران شبکه رگی پیشرفته ای که به طور طبیعی در دیواره سلول های تکا وجود دارد امکان ناپذیر است. استفاده از محیط کشت های مصنوعی شرایط را برای دست یابی به اطلاعات بیشتر فراهم می‌کند (۱۴و۴). در مطالعاتی که از محیط کشت NCSU23 برای کشت فولیکول های خوک استفاده شد تعداد کمی از اووسیت های به دست آمده از این فولیکول ها توانستند بعد از بلوغ در محیط invitro لقاح یابند. این امر نشان می دهد تحقیقات بیشتری برای دست یافتن به محیط کشت ایده آل لازم است، محیط کشتی که بتواند تمایز سلول های گرانولوزا را حمایت کند و اتصال اووسیت به سلول های گرانولوزا را جهت رشد و توسعه اووسیت پشتیبانی کند (۱۷و۱۴و۴).

Mao و همکارانش که اثرات هورمون محرک فولیکولی روی رشد فولیکولی در حضور سرم را بررسی کردند نشان دادند که هورمون محرک فولیکولی برای عملکرد بهتر احتیاج به مکمل هایی در محیط کشت دارد به طوری که با حضور سرم مناسب، هورمون محرک فولیکولی دارای عملکرد بهتری می شود (۱۸). آزمایشات مشابه ای توسط محققین دیگر انجام شد که در تمام آزمایشات نتیجه گیری شد، هورمون محرک فولیکولی به تنهایی نمی تواند رشد فولیکولی در محیط invitro را به افزایش قابل توجه ای برساند و نیاز به مکمل هایی در محیط کشت می باشد (۲۰و۱۹). دست یابی به روشهای نوین در افزایش درصد اووسیت های بالغ و لقاح یافته انسان و حیوانات در invitro می تواند در درمان بعضی از مشکلات ناباروری برای انسان، همچنین در تکثیر بسیاری از حیوانات اهلی و غیر اهلی (که نسل آنها در معرض انقراض است) مورد استفاده قرار گیرد. یافتن احتیاجات فولیکول ها برای رشد بهتر در محیط کشت invitro می تواند به کم کردن موانع موجود بر سر راه درمان ناباروری کمک کند از این رو در این تحقیق بر آن شدیم تا اثرات هورمون محرک فولیکولی روی رشد فولیکولی را در چند محیط کشت مختلف بررسی کنیم برای ارزیابی کیفیت فولیکول های کشت داده شده تاکید روی تفاوت های ساختاری فولیکول در حضور و عدم حضور این فاکتورها قرار گرفت و اثرات هر یک به تنهایی و ترکیبی روی قطر فولیکولی، میزان زیست پذیری و درصد بلوغ اووسیت و گسیختگی وزیکول ژرمینال (Germinal Vesicle Breakdown) (GVB) بررسی شد.

مواد و روشها

این مطالعه نیمه تجربی پس از رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات بر روی ۳۰ سر موش در پارک علم و فناوری یزد انجام شد.

مدل های حیوانی و جمع آوری فولیکول های تخمدانی: ۳۰ سر موش سوری ماده از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه و داخل لانه حیوانات تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگه داری شدند. موشها در خوردن آب و غذا محدودیتی نداشتند (۲۰و۱۹و۱۱و۶و۵و۱). روش انتخاب موشها به صورت تصادفی بود. برای جدا کردن فولیکول های حاوی تخمک از موش های ماده ۶ تا ۸ هفته ای استفاده شد (۲). تمام مراحل آزمایش طبق اصول اخلاقی انجام گرفت. موش ها به روش جابجایی گردن، همان طور که Yding شرح داد، کشته شدند (۲۱). برای تهیه فولیکول های پره آنترال، تخمدان ها جدا و در داخل پتریدیش های کاملا استریل قرار داده شدند. در ابتدا بافت های پیوندی موجود در محیط کشت جدا شد. تخمدان ها به ذرات ریز قطعه قطعه و کورتکس تخمدانی با استفاده از اسکالپل برداشته شد. تعداد ۳۰ عدد فولیکول پره آنترال با قطر ۵±۹۵ میکرومتر با یک یا دو لایه از سلول های گرانولوزای اطراف اووسیت به همراه لایه پایه ای دست نخورده که حاوی سلولهای تکا می باشد از برش های غشایی زیر میکروسکوپ جدا شدند. فولیکول‌های جدا شده در ۵

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.4.4.2]

میلی لیتر محیط کشت پایه به همراه مکمل هایش داخل انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت ۹۲٪ و میزان Co_2 برابر ۵٪ کشت داده شدند.

مواد شیمیایی و هورمون ها: هورمون محرک فولیکولی در محیط کشت بدون مکمل آماده و در ۱۰۰ میلی لیتر الکل در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد تا برای تهیه غلظت‌های نهایی ۵، ۲۰، ۴۰،۶۰، ۱۰۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و ۲۲۰ واحد / لیتر از هورمون محرک فولیکولی استفاده شود. از محیط کشت TCM199 به عنوان یک محیط کشت استاندارد جهت فعالیت بهتر هورمون محرک فولیکولی استفاده شد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشات کاملا خالص و بدون آلودگی بودند و از شرکت سیگما (Sigma)، USA خریداری شدند. طرح آزمایشی فاکتوریل 2×A2 برای آزمایش استفاده شد (۱۸). قطر فولیکولی روزانه با میکرومتر چشمی اندازه گیری شد میزان زیست پذیری فولیکول ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایشات دو مرتبه و هر بار با تعداد ۳۰ عدد از فولیکول ها تکرار شد.

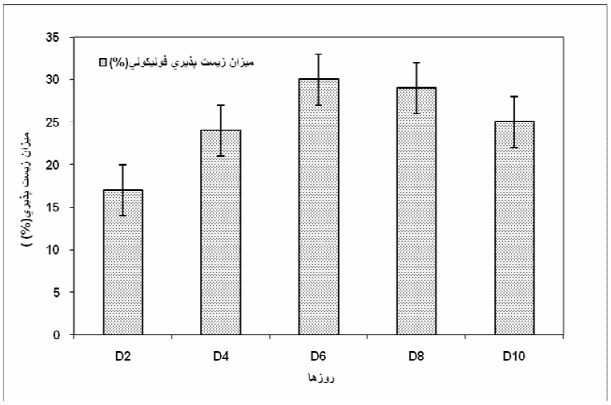
روش کار: اطلاعات از رشد فولیکول هایی که در تمام دوره کشت ۶ روزه سالم ماندند، جمع آوری شد. در روز دوم دوره، تمام فولیکول های سالم به محیط کشت تازه منتقل شدند و فولیکول هایی که در این مدت ۲ روزه، آسیب دیده بودند از مسیر آزمایش خارج شدند. یکبار در روز، محیط کشت فولیکول ها تعویض شد. آزمایش ها دوبار تکرار شد و در هر بار تکرار گروه های ۳۰ تایی فولیکول مورد بررسی قرار گرفت که در مجموع برای هر گروه آزمایشی تعداد ۶۰ فولیکول تخصیص داده شد.

روزانه حداقل و حداکثر طول (قطر) فولیکول ها با استفاده از میکرومتر چشمی نصب شده بر روی میکروسکوپ انعکاسی اندازه گیری شد. در اندازه‌گیری قطر فولیکول از سلول های تکا و اینترستیشیال اطراف غشاء پایه صرف نظر شد و قطر متوسط هر فولیکول با میانگین گیری مقادیر حداقل و حداکثر بدست آمد. در پایان انکوباسیون، تغییرات مورفولوژیکی اووسیت و تشکیل جسم قطبی توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و تنها فولیکول هایی که دارای غشاء پایه سالم بودند، برای آنالیزهای بعدی باقی ماندند. اثرات مواد مختلف روی بلوغ اووسیت، گسیختگی وزیکول ژرمینال، تغییر قطر فولیکول ها و میزان ماندگاری آنها با استفاده از آزمون آماری ANOVA یکطرفه بررسی و Post Hoc Tests و Tukey's Test برای مقایسه های چند گانه با درجه اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

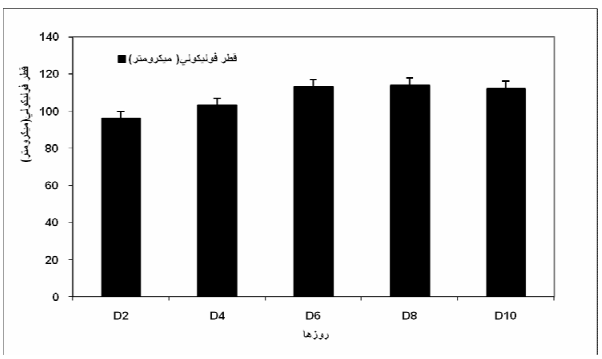
جدا سازی، انتخاب و توصیف خصوصیات فولیکول های پره آنترال ابتدائی جهت کشت در محیط invitro: قطر فولیکول های مورد آزمایش برابر ۵±۹۵ میکرومتر بود. در اطراف فولیکول های انتخابی، سلول های تکا بعنوان سلول های پهن و مسطحی که قسمت بیرونی غشاء پایه ۸۲٪ از فولیکول ها را می پوشاند وجود داشت (۱۴). در بین فولیکول های انتخابی به ندرت یک فولیکول با اووسیت متلاشی شده یافت شد که همگی از مسیر آزمایش خارج گردیدند.

مقایسه تاثیر طول مدت کشت روی قطر و میزان ماندگاری فولیکول: درصد بقاء فولیکول ها در روز ششم به ۳۰٪ در مقایسه با روز دوم (۱۷٪)، چهارم (۲۴٪) و روز هشتم (۲۹٪) رسید ($p<0/05$). قطر فولیکول ها در طول مدت ۶ روز (۱۱۳ میکرومتر) افزایش بیشتری نسبت به روزهای دوم و چهارم (به ترتیب ۹۶ میکرومتر و ۱۰۳ میکرومتر) نشان داد($p<0/05$). مقایسه قطر فولیکول ها در روزهای متفاوت کشت نشان داد که سرعت رشد در طول ۶ روز اول به طور طور قابل توجه ای افزایش می یابد اما در روز هشتم ثابت می شود بنابراین آزمایشات در همین جا متوقف شد و دوره ۶ روزه کشت برای آزمایشات بعدی انتخاب شد (نمودار۲و ۱).



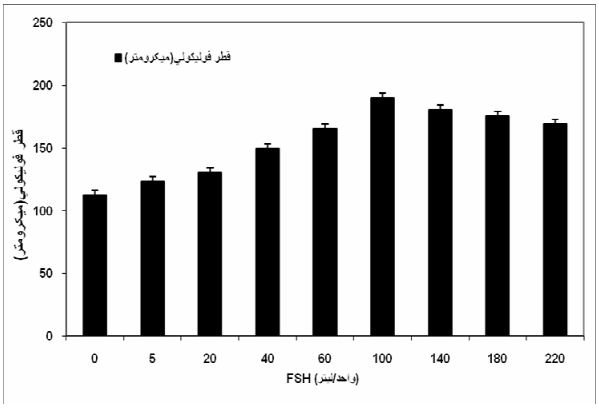
شکل ۱: اثرات محیط TCM199 روی و درصد بقاء فولیکولی درطی روزهای مختلف کشت. روزششم کشت مناسب ترین طول دوره کشت شناخته شد.

اثرات هورمون محرک فولیکولی بر میزان رشد و بلوغ فولیکولهای کشت شده در محیط invitro و اووسیت محصور در آن: فولیکولهای پره آنترال تیمار شده با غلظت های۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و ۲۲۰ واحد / لیتر از هورمون محرک فولیکولی هیچ تغییرات معنی داری در قطر و میزان ماندگاری در مقایسه با گروه کنترل نشان ندادند. در مقابل افزایش معنی داری در قطر (۱۹۰میکرومتر) و قدرت زیست پذیری (۹۱٪) فولیکولها در غلظت ۱۰۰ واحد/ لیتر از هورمون محرک فولیکولی در دوره ۶ روزه کشت بدست آمد که با گروه کنترل و دیگر گروههای آزمایشی مقایسه شده است ($p<0/0001$) (نمودار ۴و۳). بلوغ اووسیت (۶۱٪) و میزان گسیختگی وزیکول ژرمینال (۸۱٪) نیز افزایش قابل توجه ای نشان دادند (نمودار ۵).

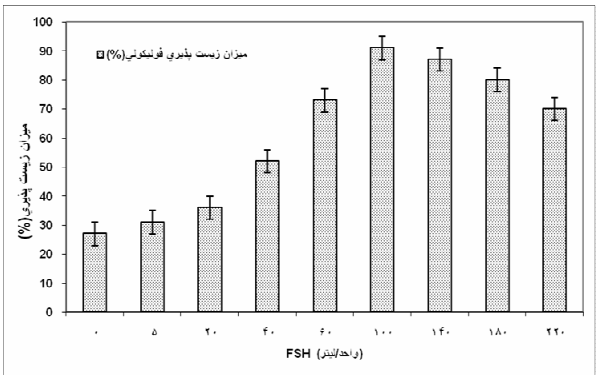


شکل ۲: اثرات محیط TCM199 روی قطر فولیکولی درطی روزهای مختلف کشت. روزششم کشت مناسب ترین طول دوره کشت شناخته شد.

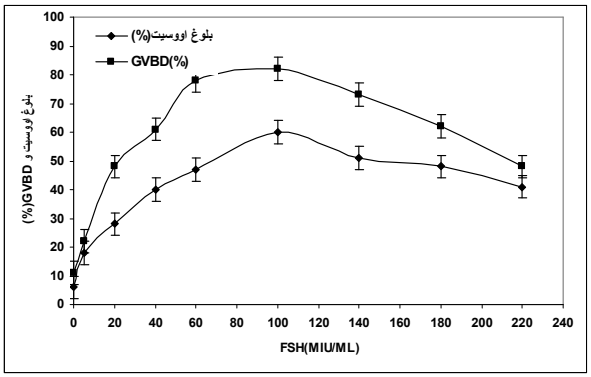
[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.4.4.2]



شکل ۳: اثرات غلظت های مختلف هورمون محرک فولیکولی روی قطر فولیکولی (میکرومتر) غلظت ۱۰۰ واحد/ لیتر از هورمون محرک فولیکولی مناسب ترین دوز شناخته شد.



شکل ۴: اثرات غلظت های مختلف هورمون محرک فولیکولی روی درصد بقاء فولیکولی(٪).غلظت ۱۰۰ واحد/ لیتر از هورمون محرک فولیکولی مناسب ترین دوز شناخته شد.



شکل ۵: اثرات غلظت های مختلف هورمون محرک فولیکولی روی بلوغ اووسیت و GVBD. غلظت ۱۰۰ واحد / لیتر از هورمون محرک فولیکولی مناسب ترین دوز شناخته شد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که هورمون محرک فولیکولی به میزان زیادی بلوغ اووسیت و GVBD در محیط Invitro را افزایش می‌دهد و وضوح نقش کلیدی هورمون محرک فولیکولی در افزایش رشد و تمایز فولیکول های پره آنترال ابتدائی در محیط Invitro را نشان داد. این مشاهدات مشابه گزارشات Cortvrindt، Hirao و Mao است (۲۲و۱۸و۱۴). همانطور که منحنی وابسته به دوز برای اثرات هورمون محرک فولیکولی در طول کشت فولیکولی پره آنترال نشان می دهد با افزایش غلظت هورمون محرک فولیکولی تا حداکثر ۱۰۰ واحد / لیتر، یک افزایش در سرعت رشد متوسط فولیکولی مشاهده می شود (۲۳). با کشت فولیکول ها در حضور غلظت ۱۰۰۰ واحد / لیتر از هورمون محرک فولیکولی نسبت تخمک گذاری فولیکولی به طور قابل ملاحظه ای در مقایسه با غلظت ۱۰۰ واحد / لیتر کاهش می یابد. زمانی که فولیکول ها به مقدار زیاد در معرض هورمون محرک فولیکولی باشند طی تنظیمات سلولی، رسپتور ها کاهش می یابد که این امر منجر به پاسخ فولیکولی پایین تر از سطح مطلوب می شود (۲۴). هورمون محرک فولیکولی برای ساخت استروئید در پاسخ به آنزیم های تحریک کننده تمایز سلول های گرانولوزا و همچنین تشکیل حفره آنتروم فولیکولی لازم و ضروری است. هورمون محرک فولیکولی همچنین تنظیم کننده پیوستگی بین اووسیت و سلول های گرانولوزای (GCs) اطراف آن است (۲۶و۲۵و۱۷و۱۴). بعلاوه وجود گنادوتروپین ها تحریک کننده عملکرد بازدارنده های پروتئین های آپوپتوزیزی (IAP) می باشند این بازدارنده ها توسط سلول های گرانولوزا در محیط های invivo و Invitro تشکیل می شوند (۱۲). هورمون محرک فولیکولی با چندین فاکتور رشد از جمله ActivinA، اینهیبین، فاکتور رشد شبه انسولینی۱ (IGF-1) واکنش می دهد و بدین وسیله رشد فولیکولی را تحریک می کند. این تنظیم های داخل تخمدانی واسطه اثرات گنادوتروپین ها در واکنش های سلولی است. گنادوتروپین ها واکنش های سلولی را بوسیله مکانیسم های اتوکرین و پاراکرین تنظیم می کنند (۲۷). بدین ترتیب نقش حیاتی هورمون محرک فولیکولی در رشد فولیکولی و اووسیت محصور در آن تایید و اثبات می شود. حضور هورمون محرک فولیکولی نقش بسیار کلیدی و مهم در مهار آترزی فولیکولی داراست. در روند آترزی، آپوپتوزیز سلولی یک رکن پایه محسوب می شود که با حضور هورمون محرک فولیکولی در محیط کشت فولیکول های آنترال و پره آنترال موش های خانگی مهار می گردد (۲۸و۲۶و۲۱و۶و۲).

برای اینکه به حداکثر عملکرد هورمون محرک فولیکولی در محیط Invitro برسیم لازم است شرایط محیطی برای رشد و توسعه فولیکول ها فراهم شود در غیر این صورت فولیکول ها قبل از این که به مرحله بلوغ برسند از بین می روند (۲۹). سیستم های کشت برای حیوانات اهلی و جوندگان در مراحل اولیه پیشرفت می باشد و فعلا در ابتدای مسیر هستیم تا ویژگی های رشدی و توسعه فولیکول های پره آنترال تعیین شود. (۳۰و۱۴و۴). محیط کشت TCM199 محیط مرکبی شامل آمینواسیدها، ویتامین ها، ریبونوکلئوزیدها و دی اکسی ریبونوکلئوزیدها بعلاوه نمک های معدنی متداول و منابع انرژی (گلوکز) در مقایسه با یک محیط کشت ساده مثل NCSU23 است (۱۸). در نتیجه زمانی که فولیکول ها در محیط های NCSU23 یا L-15 کشت داده می شوند میزان رشد کمتر و درصد زیست پذیری پایین تری در فولیکول های کشت داده شده دیده می شود. این حالت به این دلیل است که اووسیت های موش بعد از تشکیل آنتروم به رشد خود ادامه می دهند. بنابراین باید به این مطلب توجه کرد که فولیکول ها به تمام عناصر و اجزائی که در محیط کشت مرکب

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.4.4.2]

برای سنتز پروتئین و RNA وجود دارد برای رشد و بلوغ خود نیاز دارد (۱۴). طبق داده های آزمایش، رشد فولیکولی در طول مدت ۶ روز کشت در محیط TCM199 به طور خطی افزایش پیدا می کند اما بعد از این مدت میزان رشد فولیکولی تقریبا ثابت می‌شود و بعد از ۱۲ روز به یک پایداری تدریجی می رسد این مطلب بیان می کند با این که محیط TCM199 یک محیط کشت غنی از مکمل های محیطی برای رشد فولیکول ها در محیط invitro است ولی برای کشت طولانی مدت فولیکول ها چندان مناسب نیست و حاوی تمام فاکتورهای مورد نیاز برای رشد طولانی مدت نمی باشد و برای رشد بهتر فولیکول ها احتیاج به تقویت کننده های رشد بیشتری است. دوره ماندگاری کوتاه اووسیت ها در محیط invitro یک مسئله مهم است که این تحقیق سعی کرده تعدادی از مواد موثر در طولانی تر کردن این دوره را بررسی کند ولی این مسیر هنوز احتیاج به پژوهش های زیادی دارد که امیدواریم تحقیقات بعدی در این راستا مشکل گشا باشد.

نتایج آزمایشات این مطالعه به وضوح نقش کلیدی هورمون محرک فولیکولی را در افزایش رشد و تمایز فولیکولهای پره آنترال ابتدائی در محیط invitro نشان می دهد. در این مطالعه با افزودن هورمون محرک فولیکولی به محیط کشت، رشد فولیکولهای پره آنترال، درصد بقاء فولیکولها و تشکیل حفره آنتروم فولیکولی موش های خانگی و صحرایی افزایش یافت. با افزایش غلظت FSH تا حداکثر ۱۰۰ واحد / لیتر، یک افزایش در سرعت رشد متوسط فولیکولی مشاهده شد. نقش فاکتورهای محیطی در رشد فولیکول ها در محیط invitro به خوبی شناخته شده است.

به طور کلی رشد فولیکولی و بلوغ آن فرآیند های پیچیده ای هستند که توسط فاکتور های آندوکرینی مختلفی از قبیل گنادوتروپین ها، فاکتور های موضعی و ویتامین ها کنترل می شود تنظیمات شرایط کشت invitro فاکتور اصلی در افزایش یا کاهش قدرت زیست پذیری، بلوغ و قابلیت باروری فولیکولها و اووسیت های محصور در آن است. با نزدیک کردن شرایط invitro به شرایط طبیعی invivo می توان به موفقیت‌های بزرگی در زمینه لقاح invitro دست یافت. این مطالعه با امید ساخت و گسترش محیط مناسب کشت با استفاده از گونه موش خانگی انجام شد که مدل مناسبی برای ارزیابی اثرات ترکیبات مختلف روی توسعه و رشد فولیکولی در محیط invitro است. آزمایشات زیادی برای بهبود بخشیدن به بلوغ invitro لازم است انجام شود که امید می رود مطالعه حاضر کمکی در جهت هموارتر کردن مسیر باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مسئولین محترم پارک علم و فناوری یزد که در انجام این تحقیق همکاری های لازم را مبذول فرمودند و از دانشگاه پیام نور که اعتبارات مالی این تحقیق را فراهم آوردند، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.4.4.2]

In Vitro Evaluation of Influence of FSH Hormone on Growth and Maturation of Oocyte and Rat Preantral Follicular

F. Barzegary Firouzabadi (MSc) [1*], A. Javed (MSc) [2], S. Rezaei Zarchi (PhD) [1]

1. Payam-e-Noor University, Taft, Yazd, Iran
2. Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

J Babol Univ Med Sci;12(4); Oct-Nov 2010

Received: May 25th 2010, Revised: Aug 4th 2010, Accepted: Oct 6th 2010.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: In vitro maturation (IVM) of oocyte is a promising technique to reduce the costs and avert the side-effects of gonadotropin stimulation for in vitro fertilization (IVF). In vitro follicular culture systems at various developmental stages allow the identification of these factors and the understanding of their mechanisms of action. The aim of this study was to evaluate the influence of FSH hormone on preantral follicular growth and differentiation during in vitro follicular culture using the rodent (mouse) model.

METHODS: This semi experimental study was performed on 30 numbers of six to eight week Syrian mice. For preparation of preantral follicular, the ovaries were removed aseptically and placed in petri dishes filled at room temperature with the basal medium. Special quantities of FSH (5, 20, 40, 60, 100,140, 180 and 220M IU/l of FSH) was added to the culture mediums (containing 25-30 follicles) during separate experiments. Effect of gonadotrophin (FSH) was evaluated on the growth and viability of the follicles and oocyte maturation after 6 days.

FINDINGS: During present study, 100 mIU/ml FSH showed highly significant effect on follicle and oocyte growth as follicle survival rate also increased (91%) as compared to the follicles survived when the culture was grown without this gonadotrophin (28%). The survival rate of the follicles increased (30%) up to day 6 as compared to days 2 (17%), 4 (24%) and 8 (29%), $p<0.05$. Oocyte maturation (61%) and germinal vesicle breakdown rates (81%) also showed a significant increase.

CONCLUSION: The results of this study show that the follicular growth rate was increasing linearly up to the day-6 but after this it became almost constant. A gradual constancy of these rates was noticed during the last 2 days of culture in TCM199 medium, implying that these culture conditions were not enough to sustain a long-term follicular culture and follicles needed some growth enhancers.

KEY WORDS: *Follicle-Stimulating Hormone, Preantral follicles, Syrian mice, Oocyte maturation.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Payam-e-Noor University, Taft, Yazd, Iran
Tel: +98 352 6232800
E-mail: f.barzegary@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.4.4.2]

References

1. Mitchell LM, Kennedy CR, Hartshorne GM. Effects of varying gonadotrophin dose and timing on antrum formation and ovulation efficiency of mouse follicles in vitro. Hum Reprod 2005;17(5):1181-8.
2. Mahmoudi R, Subhani AGh, Pas Bakhsh F, et al. The effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes. Iran J Reprod Med 2005;3(2):74-8.
3. Cheung A, Swann K, Carroll J. The ability to generate normal Ca2+ transients in response to spermatozoa develops during the final stages of oocytes growth and maturation. Hum Reprod 2000;15(6):1389-95.
4. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. Biol Reprod 1996;54(1): 197-207.
5. Eppig JJ, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: follicle stimulating hormone and insulin. Biol Reprod 1998;59(6):1445-53.
6. McGee EA. The regulation of apoptosis in preantral ovarian follicles. Biol Signal Recept 2000;9(2):81-6.
7. Kendall SK, Samuelson LC, Saunders T, Wood RI, Camper SA. Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. Gene Dev 1995;9(16):2007-19.
8. Kumar TRY, Wang N, Lu V, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. Nat Gen 1997;15(2):201-4.
9. Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. Endocrinology 2000;141(5):1795-803.
10. Chappel SC. Heterogeneity of follicle stimulating hormone: control and physiological function. Hum Reprod 1995; 1(5):479-87.
11. Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr, Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. Endocr Rev 1995;16(6):765-87.
12. Wang Y, Rippstein PU, Tsang BK. Role and gonadotrophic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein expression during rat ovarian follicular development in vitro. Biol Reprod 2003;68(2):610-9.
13. Smitz JE, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. Reproduction 2002;123(2):185-202.
14. Cortvrindt R, Smitz J, Van-Steirteghem AC. In vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. Hum Reprod 1996;11(12): 2656–66.
15. Cortvrindt RJ, Smitz J, Van-Steirteghem AC. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. Hum Reprod 2002;12(4):759-68.
16. Johnson LD, Albertini DF, McGinnis LK, Biggers JD. Chromatin organization, meiotic status and meiotic competence acquisition in mouse oocytes from cultured ovarian follicles. Reprod Fertil 1995;104(2):277-84.
17. Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and follicle stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. J Clin Endocrinol Metab 1999;84(8):2951-6.
18. Mao J, Wu G, Smith MF, et al. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. Biol Reprod 2005;67(4):1197-203.
19. Cecconi SN, Rucci N, Scaldafferi ML, et al. Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity. J Endocrinol 1999;140(4):1783-8.
20. Liu X, Andoh K, Mizunuma H, et al. Effects of recombinant human FSH (rhFSH), urinary purified FSH (uFSH) and hMG on small preantral follicles and tertiary follicles from normal adult and androgen-sterilized female mice. Fertil Steril 2000;73(2):372-80.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.4.4.2]

21. Yding Andersen C, Leonardsen L, Ulloa Aguirre A, Barrios De Tomasi J, Moore L, Byskov AG. FSH -induced resumption of meiosis in mouse oocytes: effect of different isoforms. J Mol Human Reprod 1999;5(8):726-31.
22. Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M, Kato S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. J Reprod Fertil 2000;100(2):333-9.
23. Nayudu PL Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. Reprod Fertil 1992;95(2):349-62.
24. LaPolt PS, Tilly JL, Aihara T, Nishimori K, Hsueh AJ. Gonadotropin induced up- and down-regulation of ovarian follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene expression in immature rats: effects of pregnant mare's serum gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and recombinant FSH. Endocrinology 1992;130(3):1289-95.
25. Albertini DFC, Combelles M, Benecchi E, Carabatsos M. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. Reproduction 2001;121(5):647-53.
26. Baker SJ, Spears N. Follicle stimulating hormone inhibits apoptosis in pre-and early-antral murine follicles in vitro. J Reprod Fertil 1997;19(Abstract Series): 21(Abstract 40).
27. Yong EL, Baird DT, Yates R, Reichert LE Jr, Hillier SG. Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells. J Clin Endocrinol Metab 1992;74(4):842-9.
28. Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafriri A, Gross A. Gonadotropins enhance caspase-3 and -7 activity, and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. Endocrinology 2004;145(4):1943-51.
29. Wu J, Emery BR, Carrell DT. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. Biol Reprod 2001;64(1):375-81.
30. Spears N, Baker S, Srsen V, et al. Mouse ovarian follicles secrete factors affecting the growth and development of like-sized ovarian follicles in vitro. Biol Reprod 2002;67(6):1726-33.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.4.4.2]