

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

رضامحمودی^{۱*}، اسماعیل موسوی^۲، سید محمدرضا ربانی^۱، مهدی اکبرتبارتوری^۳، مینا دهقانی^۴، فاطمه دهقانی^۱

^۱مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۲کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۳مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۴بیمارستان 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 ۴ هفته‌ای استفاده شد. برای تحریک تخمدان‌ها از ۷/۵ واحد PMSG استفاده شد. سپس تخمک‌های GV 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 ۲۴ 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 و لقاح تخمک‌ها و تشکیل جنین دوسلولی در گروه با سلول کومولوس نسبت به گروه بدون کومولوس در محیط TCM199 را به طور معنی‌داری افزایش داد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد افزودن فاکتور رشد شبه انسولینی به محیط کشت TCM و حفظ سلول‌های کومولوس اثر مفیدی بر میزان بلوغ، لقاح و تکوین به مرحله دو سلولی تخمک ژرمینال و زیکول 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

مقدمه

تخمک‌ها از اثر کمکی هورمون‌های رشد محروم هستند. یکی از این فاکتورهای رشد^(۵) EGF می‌باشد که تأثیر آن بر روی بلوغ تخمک و گسترش سلول‌های کومولوس مفید بوده است^(۴). دیکل و شریزلی^(۱۹۸۵) اولین کسانی بودند که مطرح کردند فاکتور رشد می‌تواند باعث القای بلوغ تخمک‌های درون فولیکول موش صحرایی شود^(۴). سیستم فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1) پروسه‌های متفاوتی شامل؛ تمایز سلول‌ها، تکثیر و مهاجرت آنها را تنظیم می‌کند^(۵). فاکتور رشد شبه انسولینی نوع ۱ و ۲ در تخمدان گونه‌های مختلف مهره‌داران یافت شده است^(۷ و ۶). 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

امروزه دانسته‌های ما از علم تولید مثل رو به افزایش است. کشت تخمک مرحله ژرمینال وزیکول و رشد آن تحولی در روش‌های کمکی تولید مثل^(۱) ایجاد کرده است^(۱). رشد و نمو تخمک در خارج از بدن^(۲) 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^(۲ و ۱).

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 کلاس‌های مختلفی از فاکتورهای رشد مثل فاکتور رشد شبه انسولین^(۳) 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^(۴) (IVF) انجام شده ارتباط هورمون‌های رشد را با نقش LH در تخمک‌گذاری مرتبط دانسته‌اند^(۴ و ۳)، 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

- 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)

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از موش‌های نژاد NMRI که ۴ 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 و ۱۲ 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^(۱) (PMSG) به طریق داخل صفاقی به موش تزریق شد. بعد از ۴۸ ساعت موش‌ها با کشتش و جا به جای مهره‌های گردن^(۲) کشته شده و بلافاصله تخمدان موش را برداشته و در داخل محیط کشت HTF حاوی Bovine serum Albumin (5mg/mlBSA) قرار داده شدند. تخمک‌های مرحله GV همراه با کومولوس (COCs) و تخمک مرحله بدون سلول‌های کومولوس (Denuded oocytes) DOs را به وسیله دو سوزن انسولین از فولیکول آنترال تخمدان پانچر 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؛ تخمک‌های GV بدون سلول‌های کومولوس که در معرض محیط کشت TCM199 و فاکتور رشد شبه انسولینی قرار گرفتند. گروه سوم؛ تخمک‌های GV با سلول‌های کومولوس که

تخمک می‌شوند (۱۱). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که فاکتور شبه انسولینی (۱۳ و ۱۲) و EGF فاکتور رشد اپیدرمی در بلوغ هسته‌ای تخمک‌ها مؤثر هستند (۱۴ و ۱۰). کشت آزمایشگاهی تخمک (IVM) درصد بالایی از تخمک‌های مرحله ژرمینال و زیگول 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 (۱۶ و ۱۵) و هنوز پروتکل استاندارد 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 و ۱۷). 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 و جنین دو سلولی تخمک موش نژاد NMRI در محیط کشت TCM199 بررسی شد.

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

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 پیرووات سدیم، ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین؛ ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر 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 دی‌اکسید کربن منتقل شدند. بعد از ۲۴ 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 ۴ 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 ۴ 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 ۲-۱/۵ ساعت جهت ظرفیت دار شدن در شرایط انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند. اسپرم‌های فعال و سالم که به طریق Swim-up در کناره‌های قطره جمع شدند را به ۲۰۰ میکرولیتر محیط IVF حاوی تخمک‌ها اضافه شدند. به گونه‌ای که در هر میلی‌لیتر 1×10^6 اسپرم موجود باشد. به مدت ۶-۴ ساعت تخمک‌ها در مجاورت اسپرم در محیط IVF حاوی ۴ میلی‌گرم بر هر میلی‌لیتر BSA قرار داده شدند و سپس تخمک‌ها چندین بار در محیط IVF قرار داده شده تا اسپرم‌ها کاملاً شسته شوند. پس از گذشت ۸-۶ ساعت از زمان لقاح تشکیل پیش هسته و پس از گذشت ۲۴ 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 و زیگوت در گروه کنترل با سلول کومولوس و همچنین افزودن فاکتور رشد شبه انسولینی به محیط کشت TCM199 حاوی تخمک با کومولوس بعد از ۲۴

کومولوس بودند به طور معنی داری بیشتر از تخمک ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس بودند ($P < 0.05$). 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 معنی داری 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 (جدول ۱ و ۲).

ساعت کشت، میزان بلوغ تخمک در گروه با سلول کومولوس به طور معنی داری بیشتر از تخمک بدون کومولوس بود ($P < 0.05$). 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 کنترل معنی دار نبود (جدول ۱).

بر اساس نتایج حاصله تعدادی تخمک ژرمینال وزیکول بعد از ۲۴ ساعت کشت در محیط TCM199 به مرحله متافاز دوم رسیدند با اسپرم لقاح داده شدند و میزان لقاح و تکوین جنین به مرحله 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

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

انسولینی

گروه	متغیر	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 با سلول کومولوس	۸۰	۶۰ (%۷۵)	۵۰ (%۶۲/۵)	۳۰ (%۳۷/۵)	
تخمک GV بدون سلول کومولوس	۸۱	۴۹ (%۶۰/۵)	۴۱ (%۵۰/۶)	۴۰ (%۴۹/۴)	
تخمک GV با سلول کومولوس با فاکتور رشد شبه انسولینی ۱	۱۲۲	۱۰۴ (%۸۵/۲)	۹۴ (%۷۷)	۲۸ (%۲۲/۹۵)	
تخمک GV بدون سلول کومولوس با فاکتور رشد شبه انسولینی ۱	۱۰۵	۷۳ (%۶۹/۵)	۶۰ (%۵۷/۱)	۴۵ (%۴۲/۸۵)	

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

گروه	متغیر	تعداد تخمک متافاز دوم	لقاح تخمک (تعداد(درصد))	تکوین جنین به مرحله دوسلولی (تعداد(درصد))	تخریب تعداد جنین‌ها (Degenerated embryos) (تعداد(درصد))
تخمک GV با سلول کومولوس	۵۰	۳۵ (%۷۰)	۳۱ (%۶۲)	۲۹ (%۴۸)	
تخمک GV بدون سلول کومولوس	۴۱	۲۵ (%۶۱)	۲۰ (%۴۸/۸)	۲۱ (%۵۱/۲)	
تخمک GV با سلول کومولوس با فاکتور رشد شبه انسولینی	۹۴	۷۸ (%۸۳)	۷۰ (%۷۴/۵)	۲۴ (%۳۵/۵)	
تخمک GV بدون سلول کومولوس با فاکتور رشد شبه انسولینی	۶۰	۳۸ (%۶۳/۳)	۳۵ (%۵۸/۳)	۲۵ (%۴۱/۷)	

بحث

بلوغ و لقاح تخمک در محیط آزمایشگاه یکی از روش‌های کمک باروری می‌باشد که تحویلی 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 سلول‌های کومولوس باعث افزایش میزان رسیدن تخمک‌های ژرمینال و زیکول به MII می‌شود، هرچند که تخمک‌های ژرمینال و زیکول بدون کومولوس هم پتانسیل رسیدن به مرحله MII را دارند. در مطالعه‌های دیگر نشان داده شد که تخمک ژرمینال با سلول کومولوس نسبت به تخمک ژرمینال و زیکول 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 (۲۳-۲۱). وجود سلول‌های کومولوس باعث القای میوز و سبب بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک می‌شود که برای تکامل جنین بعد از لقاح ضروری می‌باشند (۲۶-۲۴). ضمن این که تخمک‌های بدون کومولوس به علت نبودن هماهنگی بین بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی توانایی 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 گروه‌هایی که به آنها فاکتور 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 ۲۴). 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 زونا پلوسیدای 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 گروه‌هایی معنی‌دار بوده که به آنها فاکتور رشد هم اضافه شد، یعنی تأثیر فاکتورهای 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 سلول‌های کومولوس اعمال می‌کنند. نتایج این مطالعه نشان داد، فاکتورهای رشد شبه انسولینی

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 و زیکول با و بدون سلول کومولوس وجود دارد، ولی تخمک ژرمینال و زیکول 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 و زیکول با سلول کومولوس بیشتر از تخمک ژرمینال و زیکول بدون کومولوس می‌باشد.

تقدیر و تشکر

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

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 سیتوپلاسمی تخمک 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 (۳۲ و ۳۳).

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 (۳۴). 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

REFERENCES

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, Langendonck 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.

24. Mattioli M, Barboni B. Signal transduction mechanism for 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, 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.
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 complexes in serum free media and their subsequent development 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 (IGF1) 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 expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovin ovary. *Biol Reprod* 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.

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

mahmoudi R^{1*}, Mousavi E², Rabani SM, Akbartabar toori M, Deghani M³, Deghani F¹

¹Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ²Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ³Social 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