مطالعه اثرات α توکوفرول و هورمون محرک فولیکولی روی بلوغ فولیکول‌های پره آنترال موش‌های نابالغ و اووسیت محصور در آن

چکیده

زمینه و هدف: بلوغ اووسیت در محیط *in vitro* (IVM) راه تازه‌ای برای کاهش هزینه و تقلیل اثرات جانبی تحریکات گنادوتروپین برای لقاح در محیط *in vitro* (IVF) است. برای ارزیابی بهتر ماهیت و اثرات هورمون‌های مختلف و پارامترهای مهم روی رشد و حفظ اووسیت‌ها در محیط *in vitro*، مطالعه حاضر انجام شد. هدف از انجام این پژوهش مطالعه اثرات α توکوفرول و هورمون محرک فولیکولی روی بلوغ فولیکول‌های پره آنترال موش‌های نابالغ و اووسیت محصور در آن بود.

روش کار: برای انجام آزمایش، فولیکول‌های پره آنترال سالم از تخمدان‌های موش‌های ماده ٦ هفته‌ای جدا و در محیط *in vitro* کشت داده شدند. فولیکول‌های پره آنترال در طول دوره ٦ روزه کشت در حضور غلظتهای ٥، ٢٠، ٤٠، ٦٠، ١٠٠، ١٤٠، ١٨٠ و ٢٢٠mIU/ml از FSH و غلظت‌های ٢٠، ٤٠، ٨٠، ٢٤٠، ٣٠٠ و ٤٠٠ nmol/ml از α توکوفرول (ویتامین E) قرار گرفتند. فولیکول‌ها داخل انکوباتور با درجه حرارت ٣٧° C، رطوبت ٩٢٪ و CO_2 ٥٪ در هوا قرارگرفتند. اثرات مواد مختلف روی بلوغ اووسیت، گسیختگی وزیکول ژرمینال، تغییر قطر فولیکولها و میزان ماندگاری آنها مورد بررسی قرار گرفت. نوع مطالعه تحقیقی بود و آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون ANOVA یکطرفه انجام گرفت.

یافته‌ها: در غلظت FSH ١٠٠IU/l افزایش قابل توجهی در قطر فولیکولی (**٥ ±١٩٠ µm**)، میزان زیست پذیری(٤ ± ٩١٪)، GVBD(٣ ± ٨١٪) و بلوغ اووسیت(٦ ± ٥٩٪) مشاهده شد. α توکوفرول بقاء فولیکولی را افزایش داد اما روی قطر، GVBD و میزان بلوغ اووسیت اثری نداشت. در حالیکه محیط حاوی ترکیب α توکوفرول و FSH افزایش قابل توجهی در تمام پارامترها شامل قطر فولیکولی (**٥ ±٢١٠ µm**)، میزان زیست پذیری(٣ ± ٩٥٪)، GVBD(٣ ± ٩٣٪) و بلوغ اووسیت(٥ ± ٧٦٪) نشان داد.

نتیجه‌گیری: FSH و ویتامین E هر یک به تنهایی میزان بلوغ فولیکول و اووسیت داخل آن را افزایش می‌دهند اما ترکیب آنها تأثیر قابل توجه‌تری روی سرعت رشد فولیکول‌ها و اووسیت محصور در آن دارد.

کلیدواژه ها: ١- هورمون محرک فولیکولی ٢- ویتامین E ٣- فولیکول‌های پره آنترال ٤- اووسیت

* **فاطمه برزگری فیروزآبادی**I

آمنه جاویدII

دکتر سعید رضایی زارچیIII

تاریخ دریافت: ٨٨/٧/١٥، تاریخ پذیرش: ٨٩/٢/٨

مقدمه

بلوغ اووسیت در محیط *In vitro* (IVM) به عنوان تکنیکی موثر برای کاهش قیمت و تقلیل اثرات جانبی تحریکات گنادوتروپین‌ها در لقاح *In vitro* (IVF) شناخته شده است. متابولیسم و پیشرفت تفکیکی فولیکولهای تخمدانی توسط بسیاری از محققین مورد مطالعه قرار گرفته است که بر روی جوندگان خصوصا رت، همچنین دیگرپستانداران مانند گاوها، خوک، و حتی انسان بوده است.[١-٨] امروزه استفاده از مدل جوندگان پیشرفته‌ترین و عالی‌ترین سیستم را برای مطالعه در زمینه پیشرفت فولیکولی در محیط *In vitro* فراهم کرده است. در حال حاضر، موش تنها گونه‌ای است که در مورد آن مطالعات کشت *In vitro* از مراحل بسیار ابتدائی تا مرحله زاد و لد انجام گرفته است[٢، ٣ و ٤]. با وجود اینکه تفاوتهای اساسی در فیزیولوژی تخمدانی جوندگان و انسان وجود دارد، موشها مدلی مناسب برای تشخیص و تعیین مکانیسم‌های موضعی و

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه پیام نور تفت در قالب طرح تحقیقاتی کد٣٠/٣٥٩ در سال ١٣٨٧ انجام گردیده است.

I) مربی و کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تفت، یزد (* نویسنده مسؤول)

II) کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز پژوهشی بالینی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، یزد

III) استادیار و دکترای بیوفیزیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تفت، یزد

Archive of SID

www.SID.ir

اندوکرینی تاثیرگذار بر رشد فولیکولی هستند. اووژنز (تولید تخمک) فرآیند پیچیده‌ای است که بوسیله فاکتورهای مختلف اتوکرین و پاراکرین تنظیم می‌شود. در طول هر سیکل و دوره جنسی، افزایش غلظت FSH باعث رشد فولیکولهای آنترال می‌شود.[۹] لقاح موفق وابسته به فعالیت منظم هورمون محرک فولیکولی است.[۶و۱۰] FSH هیپوفیزی رشد فولیکولی در محیط *In vitro* را حمایت و تایید می‌کند.[۲، ۹و۱۱]

FSH بوسیله گنادوتروپ های هیپوفیزی ترشح و به رسپتورهای خود در گنادها باند شده تولید هورمونهای استروئیدی و تولید گامت‌ها (گامتوژنز) را تحریک می‌کند.[۹و۱۲] در موشهای خانگی و رتها (موش‌های صحرایی) فاکتورهایی مثل FSH، واکنشهای فیزیولوژیکی را تحریک می‌کنند این واکنشها درصد زیست پذیری فولیکولها را افزایش می‌دهند.[۹،۱۳و۱۴] تمایز سلول‌های گرانولوزا از فتوتیپ تکثیری غیر بالغ به یک فرم فعال تولید کننده استروئید، مرحله اصلی و کلیدی در رشد فولیکولی تخمدانی است. FSH با اتصال به رسپتورهای غشائی مخصوص به خود و فعال کردن cAMP بعنوان پیک شیمیایی ثانویه، تکثیر سلول‌های گرانولوزا را تحریک می‌کند.[۲،۴و۱۵] با تمایز سلول‌های گرانولوزا بوسیله FSH، تسریع تشکیل فضای آنتروم، افزایش بیان آنزیم‌های سازنده استروئید. و سرانجام استقرار رسپتورهای LH تحریک می‌شود.[۱۶] ویتامین E واژه‌ای است که به گروهی از مولکول‌های آنتی اکسیدانت محلول در چربی اطلاق می‌شود و مهم‌ترین آن‌ها α توکوفرول نام دارد. خواص آنتی اکسیدانی ویتامین E به خوبی شناخته شده است.[۱۷] آنتی اکسیدانها از گسترش فعالیت رادیکال‌های آزاد ممانعت به عمل آورده و سلول‌ها را در برابر آسیب‌های واکنش‌های استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند. به علت خواص آنتی اکسیدانی ویتامین E، مطالعه حاضر در جهت شناخت و ارزیابی بهتر خصوصیات این مکمل غذایی روی رشد و بلوغ فولیکول‌های پره آنترال و اووسیت محصور در آن در حضور و عدم حضور FSH انجام گرفت.

روش کار

مواد شیمیایی و هورمون ها

برای رشد و بلوغ فولیکول‌های پره آنترال موش از محیط کشت TCM199 استفاده شد. FSH در محیط کشت بدون مکمل آماده و در ML ۱۰۰ الکل در دمای ^{o}C ۲۰ نگهداری شد تا برای تهیه غلظت‌های نهایی mIU/ml ۲۰۰-۰ استفاده شود. محلول‌های α (۵mg/ml) توکوفرول در محیط کشت TCM199 و الکل آماده و در دمای ^{o}C ۷۰- برای مدت یک ماه نگهداری شد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشات کاملا خالص و بدون آلودگی بودند و از شرکت سیگما(Sigma)، USA خریداری شدند. این پژوهش در پاییز ۱۳۸۷ در پارک علم و فناوری یزد انجام شد. روش مطالعه در این بررسی از نوع تحقیقی بوده است.

مدل‌های حیوانی و جدا سازی فولیکول ها

۳۰ عدد موش‌های 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. روش انتخاب موش‌ها به صورت تصادفی بود. برای انجام آزمایشات از نمونه‌های ۶ تا ۸ هفته‌ای استفاده شد. تمام مراحل آزمایش طبق اصول اخلاقی انجام شد. موش‌ها در خوردن آب و غذا محدودیتی نداشتند.[۱۱و۱۸] نمونه‌ها برای جدا کردن فولیکول‌های حاوی تخمک استفاده شدند.[۱۹] موش‌ها به روش جابجایی گردن، همان طور که Yding در سال ۱۹۹۹ شرح داد کشته شدند.[۲۰] برای تهیه فولیکول‌های پره آنترال، تخمدان‌ها جدا و در داخل پتریدیش‌های کاملا استریل قرار داده شدند. پتریدیش‌ها در دمای اتاق با محیط کشت پایه Tcm199 همراه با مکمل‌های پیروات سدیم (۲mm)، گلوتامین(۲mm)، پنی سیلین (۷۵μg/ml) و استرپتومایسین (۵۰μg/ml) پر شده بودند.[۱۳و۲۱] در ابتدا

Archive of SID
www.SID.ir

بافت‌های پیوندی موجود در محیط کشت جدا شد.
تخمدان‌ها به ذرات ریز قطعه قطعه و کورتکس تخمدانی با استفاده از اسکالپل برداشته شد. تعداد ۳۰ عدد فولیکول پره انترال (μm ۵± ۹۵) با یک یا دو لایه از سلول‌های گرانولوزای اطراف اووسیت به همراه لایه پایه‌ای دست نخورده که حاوی سلول‌ها ی تکا می‌باشد از برش‌های غشایی زیر میکروسکوپ جدا شدند. فولیکول‌های جدا شده حاوی اووسیت سالم مرکزی و یک لایه نازک از سلول‌های تکا در ۵ میلی لیتر محیط کشت TCM199 به همراه مکمل هایش داخل انکوباتور با درجه حرارت ^{oC} ۳۷، رطوبت ٪۹۲ و میزان Co2 برابر ٪۵کشت داده شدند.

اثرات هورمون محرک فولیکولی(FSH) روی رشد فولیکولی و بلوغ اووسیت

اثرات غلظت‌های مختلف rhFSH بر روی میزان ماندگاری، قطر فولیکولها، بلوغ اووسیت و گسیختگی وزیکول ژرمینال(GVBD) ارزیابی شد. غلظت‌های ۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۰۰، ۱۴۰،۱۸۰ و ۲۲۰ mIU/ml از rhFSH به مدت ۶ روز به محیط کشتهای حاوی فولیکولهای پره انترال واجد اووسیت اضافه شد. آزمایشات گروه کنترل نیز به موازات انجام شد. در طول مدت ۶ روز با استفاده از میکرومتر چشمی نصب شده بر روی میکروسکوپ انعکاسی قطر فولیکولها اندازه گیری شد. در این مدت تعداد فولیکولهای زنده و درصد آنها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

اثرات ویتامین E بر روی مورفولوژی، رشد فولیکولی و پیوستگی غشاء پایه

برای ارزیابی اثرات ویتامین E روی رشد اووسیت و فولیکول، آزمایشها در ۲ گروه تقسیم شدند.
غلظت‌های۲۰، ۴۰، ۸۰، ۲۴۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ nmol/ml از α توکوفرول به محیط کشتهای حاوی فولیکولها اضافه گشت. آزمایشات کنترلی نیز انجام گرفت. قطر فولیکولها یکبار در روز بوسیله میکرومتر چشمی بررسی شد.
اطلاعات حاضر از رشد فولیکولها تنها در مورد آنهایی است که در تمام دوره کشت ۶ روزه سالم مانده بودند. در روز دوم دوره، تمام فولیکولهای سالم به محیط کشت تازه منتقل شدند و فولیکولهایی که در این مدت ۲ روزه، آسیب دیده بودند از مسیر آزمایش خارج شدند. یکبار در روز، محیط کشت فولیکولها تعویض می‌شد. آزمایشها دوبار تکرار شدند و در هر بار تکرار گروههای ۳۰ تایی فولیکول مورد بررسی قرار گرفت که در مجموع برای هر گروه آزمایشی تعداد ۶۰ فولیکول تخصیص داده شد. آزمایش ذکر شده در بالا با اضافه کردن غلظت ۱۰۰mIU/ml از FSH به محیط دوباره انجام شد.

آنالیزهای آماری

روزانه حداقل و حداکثر طول (قطر) فولیکولها توسط میکروسکوپ انعکاسی اندازه گیری شد. در اندازه‌گیری قطر فولیکول از سلول‌های تکا و اینترشتیشیال اطراف غشاء پایه صرف نظر شد و قطر متوسط هر فولیکول با میانگین گیری مقادیر حداقل و حداکثر بدست آمد.
اثرات مواد مختلف روی بلوغ اووسیت، گسیختگی وزیکول ژرمینال، تغییر قطر فولیکولها و میزان ماندگاری آنها بوسیله آزمون ANOVA یکطرفه بررسی شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت.
P value<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

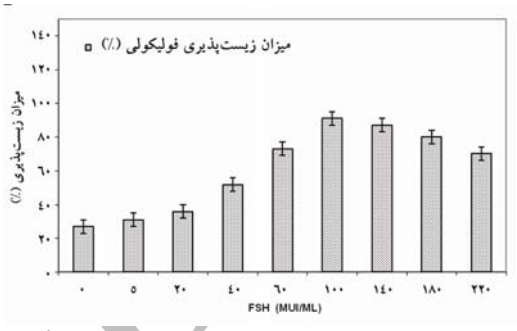
یافته‌ها

اثرات FSH بر میزان رشد و بلوغ فولیکولهای کشت شده در محیط *in vitro* و اووسیت محصور در آن

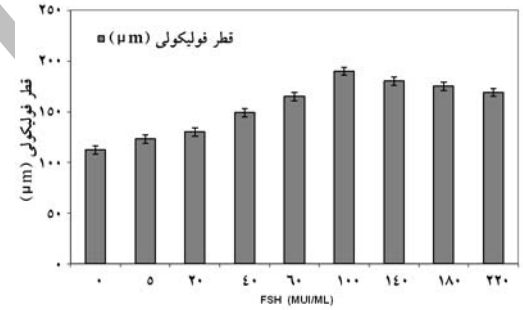
تغییرات مورفولوژیکی فولیکولهای پره آنترال موشهای نابالغ در طول یک دوره کشت ۶ روزه در حضور غلظت‌های ۵، ۲۰، ۴۰،۶۰، ۱۰۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و ۲۲۰IU/l از FSH در شکل‌های شماره ۱ ، ۲، ۳ و جدول ۱نشان داده شده است. فولیکولهای پره آنترال تیمار شده با غلظت‌های ۵، ۲۰، ۴۰،۶۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و ۲۲۰IU/l از FSH هیچ تغییرات معنی داری در قطر و میزان ماندگاری در

Archive of SID
www.SID.ir

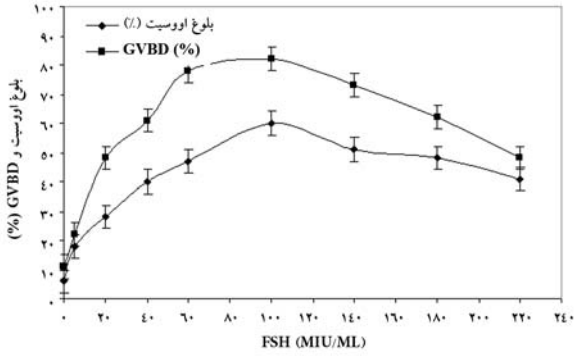
مقایسه با گروه کنترل نشان ندادند (P≥۰/۰۵). در مقابل افزایش معنی داری در قطر (۱۹۰µm) و قدرت زیست پذیری(۹۱٪) فولیکولها در غلظت FSH ۱۰۰mIU/ml در دوره ٦ روزه کشت بدست آمد که با گروه کنترل و دیگر گروههای آزمایشی مقایسه شده است (P <۰/۰۰۰۱).



شکل شماره۱- اثرات غلظت‌های مختلف FSH روی میزان زیست‌پذیری فولیکولی(٪). N =۳۰ (تعداد کلی فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش). غلظت ۱۰۰mIU/ml از FSH مناسب‌ترین دوز شناخته شد.



شکل شماره ۲- اثرات غلظت‌های مختلف FSH روی قطر فولیکولی(µm). N =۳۰ (تعداد کلی فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش). غلظت ۱۰۰mIU/ml از FSH مناسب‌ترین دوز شناخته شد.



شکل شماره ۳- اثرات غلظت‌های مختلف FSH روی بلوغ اووسیت و GVBD: N = ۳۰ (تعداد کلی فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش). غلظت ۱۰۰mIU/ml از FSH مناسب‌ترین دوز شناخته شد. شاخص میانگین در محور عمودی آورده شده است.

جدول شماره ۱- اثرات غلظت‌های مختلف FSH روی رشد فولیکول‌های پره آنترال و اووسیت محصور در آن در طول مدت ٦ روز کشت در محیط *in vitro*. مقادیر ارائه شده به صورت میانگین می‌باشند.

FSH concentrations (mIU/ml)	Follicle diameter (µm)	Survival rate (%)	GVBD (%)	Oocyte maturation (%)
0	۱۱۲±٥	۲۸±۳	۹±۳	۲±۱
٥	۱۲۱±٥	۳٥±۳	۲۱±۳	۱٤±۳
۲۰	۱۳٤±٥	٤۱±۳	٤٦±۳	۲۷±٥
٤۰	۱٥۰±٥	٥۲±۳	٦۱±۳	۳۹±٥
٦۰	۱٦۷±٥	٦۷±۳	۷٦±۳	٥۲±٥
۱۰۰	۱۹۰*±٥	۹۱*±۳	۸۱*±۳	٥۹*±٥
۱٤۰	۱۸۱±٥	۷۰±۳	٦۲±۳	٥۳±٥
۱۸۰	۱۷۱±٥	٦۰±۳	٤٥±۳	۳۷±٥
۲۲۰	۱٦۹±٥	٥۸±۳	٤۲±۳	۳٥±٥

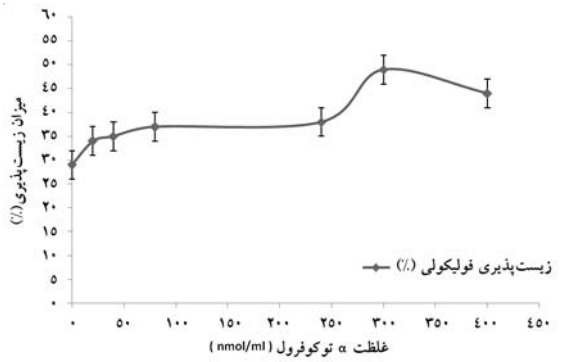
Values are Mean ± SEM
*Significant increase (P<۰/۰۰۰۱)

اثرات α توکوفرول روی رشد و بلوغ فولیکولها و اووسیت‌های محصور در آن

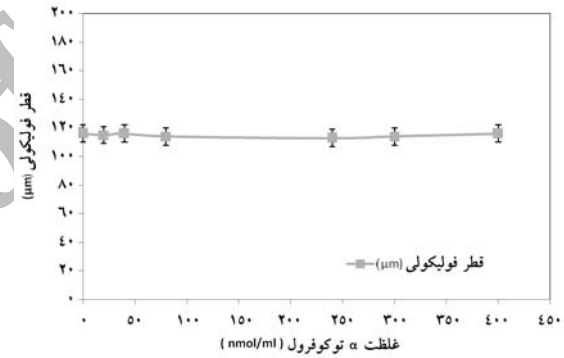
فولیکولها به مدت ٦ روز در محیط کنترل و محیطهای تیمار شده با ۲۰، ٤۰، ۸۰، ۲٤۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ nmol/ml از α توکوفرول کشت داده شدند. همان طور که در شکل‌های شماره ٤ و ٥ نشان داده شده است در غیاب α توکوفرول تنها ۲۸٪ فولیکولها سالم باقی ماندند. قطر فولیکولها تحت تاثیر هیچ کدام از غلظت‌های مورد آزمایش قرار نگرفت و تمام فولیکولهای گروه کنترل و گروه‌های تیمار در تمام طول دوره دارای قطر یکسان و مشابه‌ای بودند (۱۱۰ ± µm). در محیط کشتهای حاوی ۱۰ و ٥۰ nmol/ml ویتامین E یک افزایش ناچیز در میزان بقاء فولیکولی (به ترتیب ۳۲٪ و ۳٥٪) مشاهده شد. (P≥۰/۰٥). در غلظت ۳۰۰ nmol/ml ویتامین E، افزایش قابل توجهی در زیست پذیری فولیکولها (٥٥٪) در مقایسه با گروه کنترل دیده شد(شکل ٥) (P<۰/۰٥). درصد گسیختگی وزیکول ژرمینال و بلوغ اووسیت هیچ افزایشی را

Archive of SID
www.SID.ir

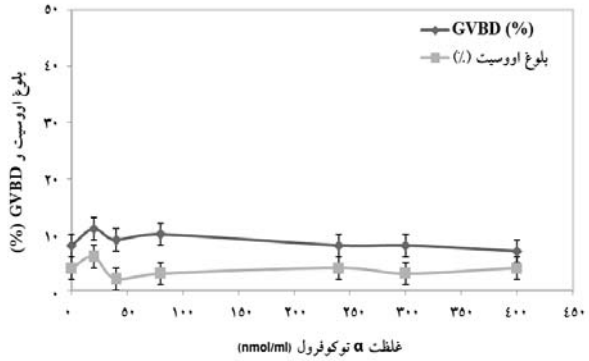
در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد (شکل شماره ٦).



شکل شماره۴- اثرات غلظت‌های مختلف αتوکوفرول روی زیست پذیری فولیکولی. تعداد فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش برابر ۳۰ عدد بود. غلظت nmol/ml ۳۰۰ از α توکوفرول دارای بیشترین اثربود. شاخص میانگین در محور عمودی آورده شده است.



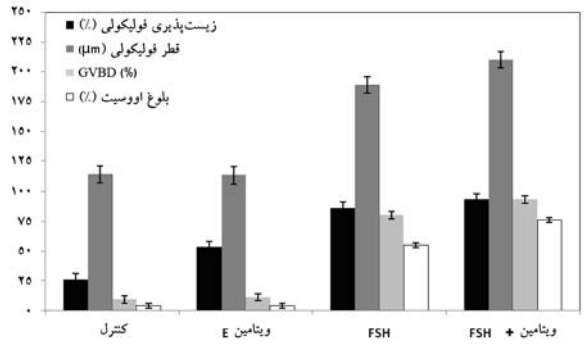
شکل شماره ۵- اثرات غلظت‌های مختلف αتوکوفرول روی قطر فولیکولی(µm). تعداد فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش برابر ۳۰ عدد بود. غلظت nmol/ml ۳۰۰ از αتوکوفرول دارای بیشترین اثربود. شاخص میانگین در محور عمودی آورده شده است.



شکل شماره ۶- اثرات غلظت‌های مختلف αتوکوفرول روی در صد GVBD و بلوغ اووسیت: تعداد فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش برابر ۳۰ عدد بود. غلظت nmol/ml ۳۰۰ از αتوکوفرول دارای بیشترین اثر بود. شاخص میانگین در محور عمودی آورده شده است.

اثرات مقایسه‌ای و ترکیبی α توکوفرول و FSH روی فولیکولها و اووسیت‌های محصور در آنها

آزمایشات یکسان با nmol/ml ۳۰۰ ازα توکوفرول و mIU/mlFSH ۱۰۰ تکرار شد. درصد فولیکولهای زیست پذیر (باقیمانده) به بالاتر از ٪۹۵ در مقایسه با کنترل (٪۳۰) و گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف α توکوفرول (٪ ۵۵) رسید (P< ۰/۰۰۰۱). ترکیب α توکوفرول و FSH افزایش معنی داری در قطر فولیکولی (µm ۲۱۰) ایجاد می‌کند که در مقایسه با کنترل و گروه دریافت کننده nmol/ml ۳۰۰ ازα توکوفرول (بدون FSH) (به ترتیب µm ۱۱٤ و µm ۱۱۳) کاملاً معنی دار است (P< ۰/۰۰۰۱). افزایش مشابهی در میزان GVBD (٪ ۹۳) و بلوغ اووسیت (٪ ۷٦) دیده می‌شود که در مقایسه با کنترل (٪۹ : GVBD و بلوغ ٪ ۳) کاملاً معنی دار است (P<۰/۰۰۰۱) (شکل شماره ۷).



شکل شماره ۷- اثرات ترکیبی و مقایسه‌ای αتوکوفرول و FSH روی رشد فولیکولی و اووسیت محصور در آن در طی مدت ٦ روز:. تعداد کلی فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش برابر ۳۰ عدد بود. شاخص میانگین در محور عمودی آورده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

به طور کلی رشد فولیکولی و بلوغ آن فرایندهای پیچیده‌ای هستند که توسط فاکتورهای اندوکرینی مختلفی از قبیل گنادوتروپین ها، فاکتورهای موضعی و ویتامین‌ها کنترل می‌شوند. تنظیمات شرایط کشت *in vitro* فاکتور اصلی در افزایش یا کاهش قدرت زیست پذیری، بلوغ و قابلیت باروری فولیکولها و اووسیت‌های محصور در آن

www.SID.ir

است. با نزدیک کردن شرایط *in vitro* به شرایط طبیعی *invivo* می‌توان به موفقیت‌های بزرگی در زمینه لقاح *in vitro* دست یافت.

چندین فاکتور اندوکرینی و موضعی فعال در طول فرایند پیچیده رشد فولیکول تخمدانی و بلوغ اووسیت شرکت می‌کنند. انواع سیستم‌های کشت فولیکولی *in vitro* که در مراحل مختلفی از رشد به سر می‌برند به ما اجازه می‌هد این فاکتورها را شناسایی و مکانیسم فعالیت آنها را درک کنیم. نتیجه کشت بهینه فولیکولی در محیط *in vitro* باید تولید اووسیت‌های بالغ با قابلیت لقاح و تشکیل جنین زیست پذیر باشد. دوره ماندگاری کوتاه اووسیت‌ها در محیط *in vitro* یک مسئله مهم است که این تحقیق سعی کرده است تعدادی از مواد موثر در طولانی‌تر کردن این دوره را بررسی کندآزمایشات ما به وضوح نقش کلیدی FSH در افزایش رشد و تمایز فولیکولهای پره آنترال ابتدائی در محیط *in vitro* را نشان می‌دهد. از دیدگاه بیو شیمیایی با شروع تمایز لایه‌های سلولی گرانولوزا و سلول‌های داخلی و خارجی تکا، رسپتورهای FSH بر روی سلول‌های گرانولوزای فولیکولهای پره آنترال ظاهر می‌شوند و در نتیجه فولیکولها به گنادوتروپین‌ها وابسته می‌گردند.[۱۰،۱۱و۲۲] با افزودن FSH به محیط کشت، رشد فولیکولهای پره آنترال، درصد بقاء فولیکولها و تشکیل حفره آنتروم فولیکولی موش‌های خانگی و صحرایی افزایش می‌یابد.[۱۰،۱۱و۲۳] حضور FSH نقش بسیار کلیدی و مهم در مهار آترزی فولیکولی داراست. در روند آترزی، آپوپتوزیس سلولی یک رکن پایه محسوب می‌شود که با حضور FSH در محیط کشت فولیکولهای آنترال و پره آنترال موشهای خانگی مهار می‌گردد.[۱۱و۲۴] با تایید این فعالیت‌های اصلی، معمولا FSH به محیط کشت فولیکولهای پره آنترال موش خانگی و دیگر پستانداران بزرگ اضافه می‌شود.[۱۰و۱۳] همانطور که منحنی وابسته به دوز برای اثرات FSH در طول کشت فولیکولی پره آنترال نشان می‌دهد، با افزایش غلظت FSH تا حداکثر ۱۰۰ mIU /ml، یک افزایش در سرعت رشد متوسط فولیکولی مشاهده می‌شود.[۳] با کشت فولیکولها در حضور غلظت۱۰۰۰ FSHmIU/ml نسبت تخمک گذاری فولیکولی به طور قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با غلظت ۱۰۰ mIU /ml کاهش می‌یابد. زمانیکه فولیکولها به مقدار زیاد در معرض FSH باشند، طی تنظیمات سلولی، رسپتورها کاهش می‌یابد که این امر منجر به پاسخ فولیکولی پایین‌تر از سطح مطلوب می‌شود.[۱۰و۲۵] نتایج ما بیان می‌کند که FSH به میزان زیادی بلوغ اووسیت و GVBD را افزایش می‌دهد. این مشاهدات همچنین توسط(۱۹۹۷) Cortvrindt ، (۲۰۰۰) Hirao و (۲۰۰۲) Mao گزارش شده است. در غلظت ۱۰۰ FSHmIU/ml بیشترین درصد زیست پذیری فولیکولها مشاهده می‌شود اما در غلظت‌های بالاتر از آن، میزان بقاء فولیکولی، GVBD و بلوغ اووسیت کاهش می‌یابد.[۳]

نقش ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی به خوبی شناخته شده است.[۱۷و۲۶] درمحیط کشت‌هایی که فولیکول‌ها در فقدان ویتامین E کشت داده شدند میزان فعالیت گلوتاتیون s ترانسفراز (GSH) و سوپراکسید افزایش می‌یابد و در نتیجه میزان آسیب‌های سلولی و درصد آپوپتوزیس هم به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد.[۲۶و۲۷] در طول مطالعه حاضر ویتامین E هیچ تاثیری روی قطر فولیکول‌ها نشان نداد اما قدرت زیست پذیری فولیکول‌ها به طور قابل توجهی افزایش یافت. این نتایج موافق با گزارشات Rose در سال ۱۹۹۹ و Qvist در سال ۲۰۰۲ است.[۴و۲۸] با اضافه کردن سلنیوم درصد فولیکول‌هایی که قادرند شکل کروی و تمامیت غشاء پایه خود را هنگام کشت در محیط *in vitro* به طور کامل حفظ کنند افزایش می‌یابد. به سیستم کشتی که در این مطالعه استفاده شد هیچ سلنیومی اضافه نشد اما با اضافه کردن ویتامین E به

Archive of SID
www.SID.ir

محیط رشد فولیکول‌ها اثرات آنتی اکسیدان‌ها به خوبی مشاهده شد.[۲۷و۲۹]

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ترکیب α توکوفرول و FSH می‌تواند درصد زیست پذیری فولیکولها را افزایش دهد. این امر درصد اووسیت‌های زیست پذیری که قادر به لقاح در محیط *in vitro* باشند افزایش می‌دهد. حمایت ویتامین E کاهش دهنده میزان مرگ اووسیت‌ها و نقصان تخمک گذاری آنها در محیط *in vitro* است. این یافته‌ها می‌تواند جهت به کارگیری آنتی اکسیدان‌ها در مکمل‌های غذایی استفاده شود. آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند به عنوان تدابیر مؤثر در جهت ممانعت از استرس اکسیداتیو خصوصاً آسیب DNA، کروموزوم و میکروتوبول در طی فرآیندهای اکسیداسیون باشند.[۱۷،۳۰و۳۱]

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 *in vitro* است. آزمایشات زیادی برای بهبود بخشیدن به بلوغ *in vitro* باید انجام شود که امید می‌رود مطالعه حاضر کمکی در جهت هموارتر کردن مسیر باشد.

فهرست منابع

1- Gore-Langton RE, Daniel SA. Follicle-stimulating hormone and estradiol regulate antrum-like reorganization of granulosa cells in rat preantral follicles cultures. Biol Reprod. 1990; 43(6): 65–72

2- Eppig JJ, O'Brien M J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. Biol Reprod. 1996; 54(2): 197–207

3- Nayudu PL, Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. Reprod Fertil. 1992; 95(10): 349–62

4- Qvist RLF, Blackwell H, Bourne C, Brown JB. Development of mouse ovarian follicles from primary to pre-ovulatory stages in vitro. J Reprod Fertil. 2002; 89(1): 169–80

5- 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(1): 277–84

6- Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. Mol Cel Endocrinol. 2005; 163(5): 53–60

7- Hirao YT, Nagai M, Kubo T, Miyano M, Miyake K, Kato S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. J Reprod Fertil. 2000; 100(4): 333–39

8- Roy SK, Treacy BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. Fertil Steril. 2002; 59(12): 783–90

9- McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev. 2000; 21(2): 200–14

10- Mao JG, Wu MF, Smith TC, McCauley TC, Cantley RS, Prather BA, 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. 2002; 67(1): 1197–203

11- Liu XK, Andoh H, Mizunuma T, Kamijo N, Kikuchi K, Yamada F, 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. J Fertil Steril. 2000; 73(9): 372–80

12- Catt KJ, Dufau ML. In vitro maturation, fertilization and embryo development. In Reproduct Endocrin eds.1991; 3(4):105-55

13- Cortvrindt RJ, Smitz A, Van-Steirteghem AC. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. Hum Reprod. 1997; 12(4): 759–68

14- Smitz JR, Cortvrindt Y, Hu U, Vanderstichele H. Effects of recombinant activin-A on in vitro culture of mouse preantral follicles. Mol Reprod Dev. 2003; 50(1): 294-304

15- Richards J. Hormonal control of gene expression in the ovary. Endocr Rev. 1994; 15(3): 725–51

Archive of SID

www.SID.ir

16- Hu ZZCH, Tsai-Morris E, Buczko M, Dufau ML. Hormonal regulation of LH receptor mRNA and expression in the rat ovary. FEBS Let. 1990; 274(7): 181–4

17- Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. FASEB J. 1999; 13(2):1145–55

18- Cecconi SN, Rucci ML, Scaldafferi MP, Mascuilli G, Rossi C, Moretti M, et al. Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity. J Endocrinol. 1999; 140 (4): 1783-788

19- Mahmoudi RA, Subhani P, Pasbakhsh F, Abolhasani I, Amiri M, Salehnia A ,et al. The Effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes. Ir J Reprod Med. 2005; 3(2): 74-78

20- Yding CL, Andersen A, Leonardsen J, Ulloa-Aguirre L, Barrios-De-Tomasi L. Moore O, et al. FSH-induced resumption of meiosis in mouse oocytes: effect of different isoforms. J Mol Human Reprod. 1999; 5(8): 726-31

21- Haidari KM, Salehnia D, Valoujerdi MR. The effects of different concentrations of leukemia inhibitory factor on the development of isolated preantral follicles from fresh and vitrified mouse ovaries. Ir Biomed J. 2006; 10(4): 185-90

22- Nakano RT, Akahori K, Katayama S; Tojo S. Binding of LH and FSH to porcine granulosa cells during follicular maturation. Reprod Fertil. 1977; 51(11): 23–27

23- McGee EN, Spears S, Minami SY, Hsu SY, Chun H, Billig G, et al. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 39, 59-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle stimulating hormone. J Endocrinol. 1997; 138(9): 2417–424

24- Baker SJ; Spears N. Follicle stimulating hormone inhibits apoptosis in pre- and early-antral murine follicles in vitro. J Reprod Fertil Abstr. 1997; 19 (21): (abstract 40) 122-23

25- 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. Endocrinol. 1992; 130(3): 1289–295

26- Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. Reproduct. 2001; 122(9): 487–95

27- Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, et al. Role of α-tocopherol in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. Reproduct. 2001; 121(5): 89–96

28- Rose UM, Hanssen JM, Kloosterboer HJ. Development and characterization of an in vitro ovulation model using mouse ovarian follicles. Biol Reprod. 1999; 61(9): 503-11

29- De-la-Asuncio´n JG, Milla´n A; Pla´ R. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. Faseb J. 1996; 10(5): 333–38

30- Cheng TJ, Christiani DC, Xu X. Glutathione S-transferasę genotype, diet and smoking as determinants of sister chromatid exchange frequency in lymphocytes. Cancer Epidemiol Biomark. 1995; 4(1): 535–42

31- Fraga CG, Motchnik PA and Shigenaga MK. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proc Natl Acad Sci USA.1991; 88(1): 1003–6

Archive of SID

www.SID.ir

An in vitro Study of Follicle Stimulating Hormone (FSH) and α-tocopherol Effects on the Maturation of Preantral Follicle-Enclosed Oocytes from Immature Mice

***F. Barzegari Firouzabadi, MS[I] A. Javid, MS[II]**
S. Rezaei Zarchi, PhD [III]

Archive of SID

Abstract

Background & Aim: 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). To better characterize the nature and impact of different hormones and important parameters on the growth and in vitro maintenance of oocyte, the present study was done. The purpose of this study is in vitro investigation of follicle stimulating hormone (FSH) and α-tocopherol effects on the maturation of preantral follicle-enclosed oocytes from immature mice

Material and Method: Intact preantral follicles were isolated from the ovaries of 6-week-old female mice and cultured in TCM-199 medium. Preantral follicles of immature mice were studied during a culture period of 6 days in the presence of 5, 20, 40, 60, 100, 140, 180 and 220 mIU/ml FSH and 20, 40, 80, 240, 300 and 400 nmol/ml of α-tocopherol (vitamin E). Follicles were cultured in an incubator at 37 °C, 92 % humidity and 5% CO_2 in air**.** The effects of several materials were surveyed on follicle diameter, survival, germinal vesicle breakdown (GVBD) and oocyte maturation rates. Our study was experimental. The entire statistical analysis was carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 14.0) and one-way ANOVA.

Results: 100 IU/l FSH showed a significant increase in follicle diameter (190 ± 5μm), survival (91% ± 4), germinal vesicle breakdown (GVBD) (81% ± 3) and oocyte maturation rates (59% ± 6). Vitamin E showed an increase in survival rate but unaffected diameter, GVBD and oocyte maturation rates. The medium containing α-tocopherol and FSH showed a marked increase in all parameters including follicle diameter (210 ± 5μm), survival (95% ± 3), germinal vesicle breakdown (GVBD) (93% ± 3) and oocyte maturation rates (76% ± 5).

Conclusion: It is concluded that FSH and α-tocopherol increase the maturation rate of follicles and enclosed oocytes, but if they are supplied in a combination, this growth rate can increase more significantly.

Key Words: 1) Follicle Stimulating Hormone(FSH) 2) α-tocopherol (Vitamin E) 3) Preantral Follicles 4)Oocyte

This research was financed by Payam-e-Noor University.
*I) MS in Physiology. Instructor. Department of Biology. Payam-e-Noor University. Taft,Yazd,Iran.(*Corresponding Author)*
II) MS in Biochemistry. Clinical Infertility Research Center. Shahid Sadooghi University of Medical Sciences. Yazd, Iran.
III) Assistant Professor of Biophysics. Department of Biology. Payam-e-Noor University. Taft, Yazd, Iran.

www.SID.ir