اثر فاکتور رشد هپاتوسیت بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک موش، لقاح و تکوین جنین‌های حاصل از آن

محمدهادی بهادری،[1] مهناز آذرنیا،[2] فاطمه قاسمیان[3]

۱. دانشیار آناتومی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گیلان
۲. دانشیار زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی تهران (تربیت معلم)، دانشکده علوم
۳. کارشناس ارشد زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی تهران (تربیت معلم)، دانشکده علوم

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۲/۲۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۳/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: بلوغ آزمایشگاهی تخمک یک روش مناسب در جهت درمان ناباروری می‌باشد، که استفاده کلینیکی آن به‌واسطه‌ی موفقیت پایین با محدودیت مواجه می‌باشد. لذا این مطالعه با هدف تاثیر فاکتور رشد هپاتوسیت بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ و تکوین جنین‌های حاصل از آن طراحی شده است.

مواد و روش کار: مجموعه تخمک–کومولوس و وزیکول زاینده از ۱۸ موش ماده ۸-۶ هفته‌ای نژاد NMRI، ۴۸-۴۶ ساعت به دنبال تزریق داخل صفاقی ۵ واحد از PMSG (Pregnant Mares' Serum Gonadotrophin) به‌دست آورده شد. تخمک‌ها در محیط Tissue culture medium-199 تیمار شده با دوزهای صفر، ۱۰ ng/ml، ۲۰ ng/ml، ۵۰ ng/ml و ۱۰۰ ng/ml از فاکتور رشد هپاتوسیت کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، تخمک‌ها در مرحله متافاز II در مجاورت با اسپرم‌ها به مدت ۶-۴ ساعت در محیط T6 انکوبه شدند. تعداد تخمک‌ها و جنین‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس ثبت شد و میزان بلوغ تخمک، لقاح و کلیواژ جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست با استفاده از روش آماری χ^2 مقایسه گردید.

یافته‌ها: در همه گروه‌های مورد مطالعه، میزان بلوغ تخمک‌ها و تکوین جنین‌ها در گروه تیمار شده با ۲۰ng/ml از فاکتور رشد هپاتوسیت به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: ۲۰ng/ml از فاکتور رشد هپاتوسیت در شرایط کشت، بلوغ تخمک و تکوین جنین‌ها را تا مرحله بلاستوسیست بهبود می‌بخشد. [م ت ع پ ز ، ۱۳(۲): ۳۰-۲۶]

کلید واژه‌ها: فاکتور رشد هپاتوسیت، بلوغ آزمایشگاهی، لقاح آزمایشگاهی، تکوین جنین

مقدمه

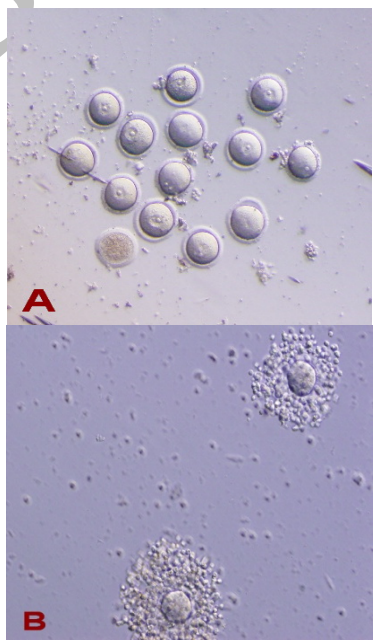
تقریبا در ۱۰ درصد از زوج‌هایی که در سن باروری هستند، ناباروری مشاهده می‌شود، بنابراین می‌توان استنباط کرد که بیش از ۸۰ میلیون زوج در سراسر جهان ناباروری را تجربه می‌کنند و در چنین وضعیتی، یکی از مهمترین موضوعات قابل بحث، روش‌های کمک باروری است.[1] میزان بالای لقاح پلی‌اسپرمی و میزان پایین تشکیل پیش هسته نر بعد از لقاح آزمایشگاهی (IVF) ممکن است به دلیل بلوغ ناقص تخمک در شرایط آزمایشگاهی باشد.[2-4] توجه کردن به فرآیند اووژنز در شرایط آزمایشگاهی بسیار حائز اهمیت می‌باشد چرا که چالشی را در ایجاد شرایط مناسب جهت تکوین تخمک و جنین در شرایط in vitro، به‌همراه دارد.[5] در تخمک‌های پستانداران، میوز از زمان زندگی جنینی آغاز می‌شود و در هنگام تولد، در مرحله دیپلوتن میوز I متوقف می‌شود. بعد از بلوغ، فولیکولژنز آغاز می‌شود که مرحله پیش تخمک‌گذاری با عمل LH همراه است. از سرگیری میوز از مرحله حباب زاینده (GV: Germinal Vesicle) به دنبال تراکم کروموزوم، متلاشی شدن پوشش هسته‌ای و تشکیل دوک مشخص می‌شود. از سرگیری میوز تا تشکیل مرحله متافاز II (MII) به عنوان بلوغ هسته‌ای تخمک تعریف می‌شود. تخمک‌ها هم‌چنین بلوغ سیتوپلاسمی مثل تغییرات مولکولی و ساختاری را کامل می‌کنند تا تخم بالغی را ایجاد کنند که پتانسیل لقاح و تکوین اولیه جنینی را حمایت می‌کند.[6] فاکتورهایی مانند فاکتور رشد هپاتوسیت (HGF) به رشد جمعیت سلول‌های گرانولوزا کمک می‌کند و در جهت عمل هورمون‌های اندوکرینی مانند استروژن و LH، بر تکوین فولیکول‌ها عمل کرده و رشد سلول‌های گرانولوزا را در شرایط آزمایشگاهی تحریک می‌کند. هیچ یک از این هورمون‌ها (استروژن و LH) به عنوان عامل میتوزی سلول گرانولوزا در شرایط in vitro شناخته نشده‌اند.[4] بنابراین اثرات استروژن و LH بر رشد in vivo فولیکول‌ها، با میانجی‌گری غیرمستقیم فاکتورهای رشدی مثل HGF که به طور موضعی تولید می‌شوند، اعمال می‌شود.[4] یکی از مشکلات اصلی در کشت آزمایشگاهی جنین‌ها، فرایندی تحت عنوان توقف در مرحله دو سلولی است.[7] از این رو به نظر می‌رسد که بسیاری از تغییرات در محیط کشت بر تکوین آزمایشگاهی جنین‌ها نیز مفید باشد.[8] محیط نرمال در حالت in vivo، شرایط لازم جهت رشد تخمک، بلوغ هسته‌ای و بلوغ سیتوپلاسمی را فراهم می‌کند. اما اطلاعات بسیار کمی در رابطه با این‌که این شرایط چه هستند و چگونه بر جنبه‌های ویژه‌ی تکوین تخمک‌ها اثر می‌گذارد وجود دارد. شناسایی شرایط مطلوب موضوع بسیار مهمی برای تکنیک‌های IVM است که در تحقیقات بیوتکنولوژی پایه و ناباروری استفاده می‌شود. فیزیولوژی و قدرت بقای جنین توسط سیستم کشت فعلی تحت تاثیر قرار می‌گیرد.[9] متاسفانه شرایط محیط کشت در پستانداران منجر به کاهش پتانسیل تکوینی می‌شود و به عبارت دیگر بقای تخمک تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد.[10] از این رو در این تحقیق سعی شده است که بازدهی سیستم کشت استفاده شده برای تکوین آزمایشگاهی تخمک‌های موش و تکوین جنین‌های حاصل از آن، با تغییر غلظت‌های فاکتور رشد هپاتوسیت اضافه شده به محیط کشت، بهبود یابد.

۲۶ آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی
email: ghasemian.21@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

روش‌کار

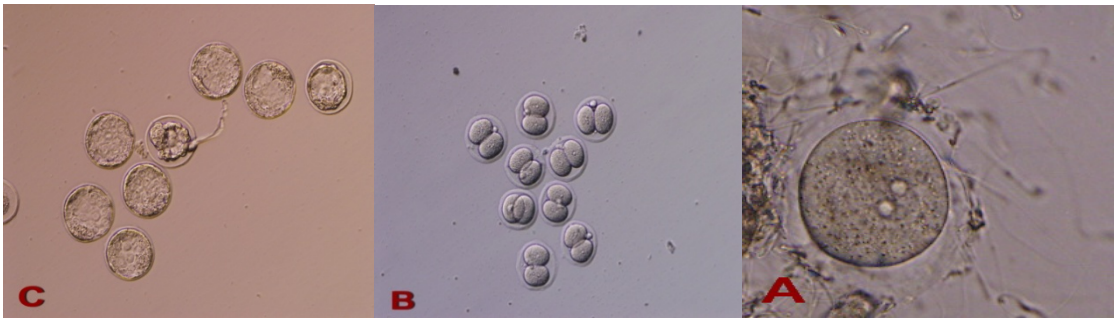
این مطالعه پژوهشی در سال ۱۳۸۷ با استفاده از ۱۸ سر موش ماده‌ی نژاد NMRI با سن ۸-۶ هفته و وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. موش‌های مورد مطالعه از طریق انستیتوی رازی کرج تهیه و حیوانات تحت شرایط کنترل شده (۱۲ ساعت نور/تاریکی) و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری و تیمار شدند. کلیه قوانین و اصول اخلاقی در رابطه با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان رعایت گردید. همه مواد از شرکت سیگما (آلمان) خریداری شد. موش‌ها با تزریق داخل صفاتی ۵ واحد PMSG (Pregnant Mares' Serum Gonadotrophin) جهت تخمک‌گذاری تحریک شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، تخمدان‌ها برداشته و فورا در محیط کشت TCM-۱۹۹ تیمار شده با ۵ درصد FCS (Fetal Calf Serum, Gibco, UK) که از قبل گرم شده بود، کشت داده شدند. تخمک‌های GV و مجموعه‌های تخمک کومولوس (COC: Cumulus Oocyte Complex) از تخمدان جمع‌آوری شد (تصویر ۱).



تصویر ۱ : تخمک‌های موش در مرحله وزیکول زاینده (A, GV) و مجموعه‌ی تخمک کومولوس (B, COC). (بزرگنمایی شکل C:۲۰۰× و شکل های A&B ۱۰۰×).

تخمک‌های نابالغ در مرحله GV و COC جمع‌آوری گردید و به دنبال شستشو، در محیط تازه TCM-199 از پیش انکوبه شده که همراه با ۵ درصد FCS می‌باشد و با روغن پوشیده شده بودند، جهت بلوغ آزمایشگاهی کشت داده شدند. این محیط بلوغ (TCM-199) به‌عنوان محیط کنترل [بدون اضافه کردن HGF (R&D systems, USA)] و محیط‌های تیمار (به دنبال اضافه کردن مقدار مورد نیاز ازفاکتور رشد هپاتوسیت; ng/ml ۱۰ (گروه ۲)، ۲۰ng/ml (گروه ۳)، ۵۰ng/ml (گروه ۴) و ۱۰۰ ng/ml (گروه ۵)استفاده شد و این محیط‌ها در دمای ۳۷°C در هوای مرطوب با ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. تخمک‌های کشت داده شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس (IX71, Olympus, Japan) مورد مطالعه قرار گرفت و تغییرات مورفولوژیک در هسته با آزاد شدن اولین جسم قطبی (متافاز II) که به‌عنوان معیاری برای بلوغ هسته‌ای تخمک‌های نابالغ محسوب می‌شود مورد توجه قرار گرفت. تخمک‌هایی که اولین جسم قطبی را آزاد کردند برای لقاح آزمایشگاهی استفاده شدند. هجده ساعت بعد از بلوغ آزمایشگاهی، تخمک-های بالغ در محیط لقاح [محیط T6 و ۱۵ mg/ml آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA)] شستشو شدند و با اسپرم‌های ظرفیت یافته از موش انکوبه شدند. اسپرم‌ها از دم اپیدیدیم موش نر بالغ ۱۰-۸ هفته‌ای نژاد NMRI استخراج و به مدت ۱ ساعت در محیط IVF جهت ظرفیت‌یابی انکوبه شدند. تخمک‌های بالغ در قطرات ۵۰µL از محیط لقاح پوشیده با روغن در مجاورت با ۱×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی‌لیتر به مدت ۶-۴ ساعت انکوبه شدند. تخمک‌های لقاح یافته از محیط لقاح خارج شدند و در گروه‌های ۱۰-۵ تخم در قطرات µl ۲۰ از محیط T6 تیمارشده با BSA ۴mg/ml (گروه کنترل) و دوزهای مختلف فاکتور رشد هپاتوسیت کشت داده شدند. در این آزمایش، میزان لقاح، ۵ ساعت بعداز IVF و بر اساس میزان تشکیل جنین دو پیش هسته‌ای ارزیابی شد. هم‌چنین میزان کلیواژ و تکوین جنین‌ها با مشاهده مرفولوژی و تعداد جنین‌های دو سلولی تا مرحله بلاستوسیست با استفاده از میکروسکوپ معکوس ثبت و مورد ارزیابی قرار گرفت (تصویر۲).

نتایج حاصل از تاثیر فاکتور رشد هپاتوسیت و گروه کنترل در میزان بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک و تکوین جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیت با استفاده از نرم افزار SPSS-11 و روش $\chi^{۲}$ تجزیه و تحلیل شد و سطوح $p<۰/۰۵$ بیان-کننده اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



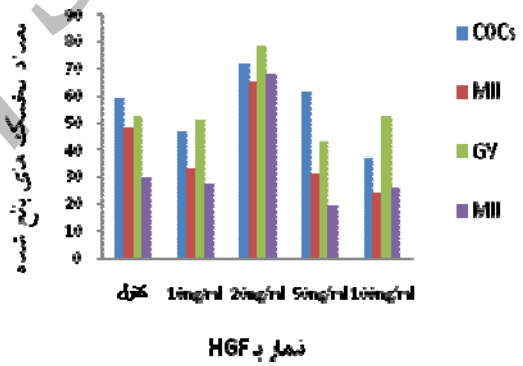
تصویر ۲: تصویر جنین در مرحله دوپیش هسته‌ای (A, 2-PN)، دو سلولی (B)و بلاستوسیست (C) (بزرگنمایی شکل A:۲۰۰× و شکل های A&B ۱۰۰×).

Archive of SID
www.SID.ir

یافته‌ها

۵۵۲ تخمک نابالغ (با و بدون سلول‌های کومولوس) از ۱۸ سر موش جمع‌آوری شد و به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم و کشت داده شدند.

نسبت تخمک‌هایی که در مرحله COC و GV باقی‌مانده است در گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۵۰ ng/ml و ۱۰۰ ng/ml از فاکتور رشد هپاتوسیت بیشتر از گروه کنترل بود ($p>0/05$). همان طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است میزان بلوغ تخمک‌ها در گروه ۳ (۲۰ng/ml HGF) به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل است ($p<0/05$). هم‌چنین اطلاعات به‌دست آمده نشان می‌دهد که میزان تخمک‌های MII حاصل از COCs بیشتر از GV می‌باشد. به طوری که درصد تخمک‌های MII بالغ حاصل از COCs در گروه کنترل ۸۱/۳ درصد و در گروه ۲، ۷۰/۲ درصد؛ گروه ۳، ۹۰/۳ درصد؛ گروه ۴، ۵۰/۸ درصد و گروه ۵، ۶۴/۹ درصد به‌دست آمد و این در حالی است که تخمک‌های MII حاصل از بلوغ GV در گروه کنترل ۵۷/۷ درصد و در گروه ۵۲/۹،۲ درصد؛ گروه ۸۷/۱،۳ درصد؛ گروه ۴، ۴۴/۲ درصد و گروه ۵، ۵۰ درصد بود.



نمودار ۱: درصد تخمک‌های بالغ شده در دوزهای مختلف فاکتور رشد هپاتوسیت

میزان لقاح (۷۴/۶۶٪)، کلیواژ و تکوین متعاقب تا مرحله بلاستوسیت (۶۴/۶۶٪) در گروه تیمار شده با ۲۰ng/ml از HGF به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل است ($p<0.05$). در حالی که درصد جنین‌های رسیده به مرحله دوسلولی در گروه کنترل ۶۰/۴ درصد و در گروه ۲، ۵۳/۱ درصد، گروه ۴، ۳۶/۵ درصد و گروه ۵ ۳۴/۸ درصد و درصد جنین‌های دو سلولی رسیده به مرحله بلاستوسیست در گروه کنترل ۴۸/۶) و در گروه ۲ ۴۶/۹ درصد؛ گروه ۴، ۲۵/۵ درصد و گروه ۵، ۲۷ درصد نشان داده شده است.

بحث

مطالعه حاضر نشان داده است که در حضور ۲۰ng/ml از فاکتور رشد هپاتوسیت، در مقایسه با گروه کنترل، میزان بلوغ، آماده شدن تخمک‌های بلوغ یافته و تشکیل تخمک MII به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. بنابراین به نظر می‌رسد که اضافه کردن HGF در طول بلوغ تخمک بر برنامه‌ریزی تخمک اثر دارد. هم‌چنین حضور فاکتور رشد هپاتوسیت (۲۰ ng/ml) در محیط کشت میزان تکوین جنین به مرحله بلاستوسیست را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد. این فاکتور هترودایمر برای اندام‌زایی و مرفوژنز بسیاری از بافت‌ها و اندام‌های مختلف مهم می‌باشد.[11] فاکتور رشد هپاتوسیت دارای فعالیت میتوژنیک بر هپاتوسیت‌های کشت شده، همانند دیگر سلول‌های کشت داده شده است.[12] بنابراین پذیرفته شده است که فاکتور رشد هپاتوسیت در تهاجم تومور و در تکوین جنین مهم باشد.[13] فاکتور رشد هپاتوسیت فعالیت میتوزی خود را بر هپاتوسیت در کشت اولیه همانند دیگر سلول‌های کشت داده شده اجرا می‌کند.[12]

چندین مطالعه اثر هورمون‌ها و فاکتورهای رشد را بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها مطرح می‌کند. هورمون‌های استروئیدی و گنادوتروپین‌ها تنها بخشی از گروه پیچیده فاکتورهایی هستند که در بلوغ تخمک نقش دارند. گزارش شده است که فاکتورهای رشد متنوعی بر بلوغ تخمک گاو اثر می‌گذارند که اثرشان به واسطه سلول‌های کومولوس احاطه کننده تخمک میانجی‌گری می‌شود. به طوری‌که Nandi و همکارانش گزارش کردند که ۲۰ ng/ml از فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) در محیط کشت تاثیر مثبتی بر میزان پخش شدن کومولوس، بلوغ هسته‌ای و میزان کلیواژ جنین بوفالو دارد اما بر تکوین جنینی متعاقب آن تاثیری ندارد، و ۲۰ ng/ml از فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) پخش شدن سلول‌های کومولوس و بلوغ هسته‌ای تخمک‌های بوفالو را در شرایط کشت افزایش می‌دهد. این در حالی است که دیده شده است که در دوز ۲۰ ng/ml از FGF میزان کلیواژ و تشکیل بلاستوسیست را افزایش می‌دهد.[14] Nilsson و همکارانش نیز گزارش دادند که تیمار تخمدان موش صحرایی با ۴۰ ng/ml از فاکتور رشد فیبروبلاست در شرایط in vitro، منجر به کاهش تعداد فولیکول‌های پریموردیال و در عین حال افزایش تعداد فولیکول‌های در حال تکوین می‌شود.[15] گزارش شده است که تیمار محیط کشت با ۱۰ ng/ml از EGF، بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک‌ها را بهبود می‌بخشد هم‌چنین EGF در همین دوز درصد تخمک‌هایی که به مرحله دو سلولی کلیواژ می‌یابند و در نهایت به بلاستوسیست تکوین می‌یابند را افزایش می‌دهد.[16] نتایج ما مشابه با نتایج گزارش‌های مذکور می‌باشد به طوری که تامین محیط کشت با ۲۰ ng/ml از HGF به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل میزان بلوغ تخمک را افزایش می‌دهد. گزارش شده است که ترکیب ۱۰ ng/ml از EGF و ۱۰۰۰ IU/ml از فاکتور مهارکننده لوکمی، میزان تشکیل بلاستوسیست را همانند میزان هچینگ افزایش می‌دهد.[17]

هم‌چنین تحقیقات zhou و همکارانش نشان داد که استفاده از ۱۰ ng/ml از EGF در محیط کشت میزان تشکیل بلاستوسیست را افزایش می‌دهد[18] و نتایج ما نیز نشان می‌دهد که اضافه کردن ۲۰ ng/ml از HGF میزان کلیواژ و تکوین جنین را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. البته در مقایسه با دیگر فاکتورها، گزارشات کمتری در رابطه با تاثیر فاکتور رشد هپاتوسیت بر بلوغ و تکوین تخمک و جنین وجود دارد که در اینجا سعی شده است تا با مقایسه نتایج حاصل از تاثیر فاکتور رشد هپاتوسیت در تکنیک‌های کمک باروری با

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج مشابه دیگر فاکتورهای رشد بر کارایی فاکتور مذکور در شرایط کشت تخمک و جنین تاکید شود. به طوری‌که گزارش شده است، فاکتور رشد هپاتوسیت در غلظت ۲۰ ng/ml از HGF تکوین آزمایشگاهی جنین‌های موش بالغ شده در شرایط in vivo را افزایش می‌دهد.[19] نتایج ما نشان داد که در دوز ۲۰ ng/ml از فاکتور رشد هپاتوسیت، بلوغ تخمک و تکوین آزمایشگاهی جنین‌های بالغ شده در شرایط آزمایشگاهی بهبود می‌یابد.

نتایج نشان می‌دهد که میزان بلوغ تخمک، لقاح و پتانسیل تکوین جنین تا مرحله بلاستوسیست در حضور غلظت ۲۰ ng/ml از فاکتور رشد هپاتوسیت افزایش می‌یابد. با توجه به این‌که در طول کشت، جنین دچار دژنره شدن و بلوک می‌شود، لازم است که یک شرایط کشت مناسب فراهم شود که به شرایط in vivo نزدیک باشد. در این مطالعه دیده شده است که فاکتور رشد هپاتوسیت در دوزهای بالا اثر منفی بر موارد مذکور دارد درحالی‌که در غلظت ۲۰ng/ml از HGF رشد و تکوین به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌یابد. البته این تحقیق نیاز به بررسی بیشتری دارد که می‌توان تغییرات متابولیک تخمک و جنین به دنبال تیمار با فاکتور رشد مذکور و رفتار سلولی جنین‌های در حال کلیواژ مورد بررسی قرار گیرد. هم‌چنین جهت کاربردی کردن بیشتر این تحقیق در مراکز درمانی و کلینیکی می‌توان تاثیر این فاکتور رشد بر بلوغ و تکوین تخمک‌های انسانی مورد مطالعه واقع شود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه علوم پزشکی گیلان با کد ۶۱۶/۶۲۰ در سال ۱۳۸۷ می‌باشد.

References

1. Navarro JL, Castilla JA, Martínez L, et al. Coverage and current practice patterns regarding assisted reproduction techniques. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2008; 138(1): 3-9.
2. Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, et al. Glutathion concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. Biol Reprod 1993; 49(1): 89-94.
3. Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y. Effect of porcine oocytes matured in vitro. Gamete Res 1988; 21(3): 289-95.
4. Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K and Kikuchi K. Up data of invitro production of porcine embryos. Front Bio Sci 2006; 11: 2565-73.
5. Eppig JJ, Hosoe M, O'Brien MJ, et al. Conditions that affect acquisition of developmenta competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. Mol Cell Endocrinol 2000; 163(1-2): 109-116.
6. Bevers MM, Izadyar F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. Mol Cell Endocrinol 2002; 197(1-2): 173-178.
7. Yeo CX, Gilchrist RB, Thompson JG and Lane M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. Hum Reprod 2008; 23(1):67-73.
8. Papanikolaou EG, D'haeseleer E, Verheyen G, et al. Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. Hum Reprod 2005; 20(11): 3198-203.
9. Preis KA, Seidel GE Jr, Gardner DK. Reduced oxygen concentration improves the developmental competence of mouse oocytes following in vitro maturation. Mol Reprod Dev 2007; 74(7): 893-903.
10. Banwell KM, Lane M, Russell DL, et al. Oxygen concentration during mouse oocyte in vitro maturation affects embryo and fetal development. Hum Reprod 2007; 22(10): 2768-2775.
11. Matsumoto K, Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. J Biochem 1996; 119(4): 591-600.
12. Osuga Y, Tsutsumi O, Momoeda M, et al. Evidence for the presence of hepatocyte growth factor expression in human ovarian follicles. Mol Hum Reprod 1999; 5(8): 703-707.
13. Lokker NA, Mark MR, Luis EA, et al. Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. EMBO J 1992; 11(7): 2503-2510.
14. Nandi S, Ravindranatha BM, Gupta PS, et al. Developmental competence and post-thaw survivability of buffalo embryos produced in vitro: effect of growth factors in oocyte maturation medium and of embryo culture system. Theriogenology 2003; 60(9): 1621-1631.
15. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol 2001; 175(1-2): 123-130.
16. De La Fuente R, O'Brien MJ, Eppig JJ. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. Hum Reprod 1999; 14(12): 3060-3068.
17. Amiri I, Parvini M, Amini A, et al. Relevance of LIF and EGF on mouse preimplantation embryo development. Yakhteh 2008; 10(3): 213-217.
18. Zhou P, Liu DJ, Cang M, et al. TGF- and EGFR in ovine preimplantation embryos and effects on development. Anim Reprod Sci 2007; 104(2): 370-381.
19. Bahadori MH, Azarnia M, Ghasemian F, et al. Relevance of hepatocyte growth factor and fibroblast growth factor on mouse preimplantation embryo development. J Reprod Contracept 2009; 20(4): 195-204.

Archive of SID

www.SID.ir

The effect of hepatocyte growth factor on mouse oocyte in vitro maturation and subsequent fertilization and embryo development

Mohammad H. Bahadori,[1] Mahnaz Azarnia,[2] Fatemeh Ghasemian[3]

Received: 13/May/2010
Accepted: 15/Jun/2010

Background: Oocyte invitro maturation is an enormously promising technology for the treatment of infertility, yet its clinical application remains limited owing to poor success rates. Therefore, this study was devised to evaluate the effect of hepatocyte growth factor (HGF) on in vitro maturation of immature mouse oocytes and resulting embryos development.

Materials and Method: Cumulus – oocyte complex and germinal vesicle were obtained from eighteen 6-8 weeks-old female NMRI mice 46-48 hours after administration of an injection of 5 IU PMSG (Pregnant Mares' Serum Gonadotrophin). Oocytes were culture in TCM199 (Tissue culture medium-199) supplemented with dosages of 0, 10, 20, 50 and 100 ng/ml of HGF. After 24 hours, metaphase II oocytes were co-incubated with sperms for 4-6 hours in T6 medium. Following isolation of two pronucleus embryos, cleavage of embryos was assessed in the same medium till blastocyst stage. The number of oocytes and embryos was recorded under an invert microscope and the rate of oocyte maturation, fertilization and embryos cleavage until blastocyst stage compared using of student χ^2 test.

Results: In all compared groups, oocytes growth and embryos development rate in the 20 ng/ml of HGF treatment group was significantly higher ($p<0.05$) than the control group ($p<0.05$).

Conclusion: 20 ng/ml of HGF improved the nuclear maturation and embryo development up to blastocyst stage during culture condition. [ZJRMS, 13(2): 26-30]

Keywords: Hepatocyte growth factor, IVM, IVF, embryonic development

1. **Associate Professor of Anatomy, Cellular and Molecular Research Center, Guilan University of Medical Sciences and Health Services, Rasht, Iran.**
2. **Associate Professor of Biology, School of Science, Kharazmi (Tarbiat moallem) University of Tehran, Iran.**
3. **MSc of Biology, School of Science, Kharazmi (Tarbiat moallem) University of Tehran, Iran.**

Archive of SID

Please cite this article as: Bahadori MH, Azarnia M, Ghasemian F. The effect of hepatocyte growth factor on mouse oocyte in vitro maturation and subsequent fertilization and embryo development. Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS)2011; 13(2): 26-30.

www.SID.ir