

Effect of Fibroblastic Growth Factor on Resumption of Meiosis, In Vitro Maturation and Embryo Development of Immature Mouse Oocytes

Azarnia M., Ph.D., Ghasemian F., M.Sc., Bahadori M.H., Ph.D. *, Mohammad Ghasemi F., Ph.D., Ahmadi Jalali Moghaddam M., B.Sc.

** P.O.Box: 3477, Anatomy Department, Gilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran*

Abstract

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the effect of fibroblastic growth factor on resumption of meiosis, in vitro maturation of immature mouse oocytes and resulting embryo development with and without basic fibroblastic growth factor-4 (bFGF-4).

Materials and Methods: cumulus – oocyte complex (COCs) and germinal vesicle (GV) were obtained from female NMRI mice 46-48 hours after administration of an intra-peritoneal injection of 5 IU PMSG. COCs were cultured in TCM199 supplemented with different dosages of bFGF-4. After 24 hours, metaphase II (MII) oocytes were co-incubated with sperms for 4-6 hours in T6 medium. For all groups, the rate of cleaved embryos was assessed in the T6 medium until blastocyst stage.

Results: In all compared groups, the percentage of matured MII oocytes in the 10 ng/ml (%94.4) and 20 ng/ml(%92.5) of bFGF-4 treatment groups, was significantly higher ($P<0.05$) than those of the control group but the percentage of embryos that developed to blastocyst in 20 ng/ml bFGF-4 treatment group was significantly higher than those of the control group ($P<0.05$).

Conclusion: Exogenous bFGF-4 improved the oocyte maturation and embryo development.

Key words: Fibroblast growth factor, IVM, IVF, Embryo Development

تأثیر فاکتور رشد فیروبلاستی بر از سرگیری میوز، بلوغ آزمایشگاهی و تکوین جنین‌های حاصل از تخمک‌های نابالغ موش

مهناز آذرنیا Ph.D.*، فاطمه قاسمیان M.Sc.*، محمدهادی بهادری Ph.D.**، فهیمه قاسمی Ph.D.**
معصومه جلالی احمدی مقدم B.Sc.***

* گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم، تهران، ایران
** گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
*** مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
تاریخ وصول: بهمن ماه ۸۷، تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۸۸

چکیده

هدف: بررسی بیان اثر فاکتور رشد فیروبلاست بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ و تکوین جنین‌ها
مواد و روش‌ها: مجموعه تخمک - کومولوس و وزیکول زاینده از موش‌های ماده نژاد NMRI به دنبال تزریق 5IU PMSG (*i.p.*) به دست آورده شد. تخمک‌ها در محیط TCM-199 (Tissue culture medium-199) تأمین شده با دوزهای مختلف فاکتور رشد فیروبلاست کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت تخمک‌های متافاز II در مجاورت اسپرم‌ها به مدت ۶-۴ ساعت در محیط T6 انکوبه شدند. در همه گروه‌ها، کلیواژ جنین‌ها در همان محیط طی ۵ روز بررسی شد.
یافته‌ها: در همه گروه‌ها، گروه‌های تیمار شده با 20ng/ml FGF (92.5%) و 10ng/ml FGF (94.4%) به طور معنی‌داری میزان تشکیل تخمک‌های متافاز II بالاتری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. اما گروه تیمار شده با 20ng/ml FGF میزان تکوین بالاتری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد ($p < 0.05$).
نتیجه‌گیری: فاکتور رشد فیروبلاست طی شرایط آزمایشگاهی، بلوغ تخمک و تکوین جنین را افزایش می‌دهد.

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

مقدمه

پستانداران امکان پذیراست [۱]. بلوغ آزمایشگاهی تخمک، در هر یک از زنانی که با خطر تحریک‌پذیری بالا تخمدان مواجه هستند یا در پاسخ به تحریک هورمونی شکست می‌خورند و در نهایت در بیماران با سندروم پلی کیستیک تخمدان از اهمیت بالایی برخوردار است [۲]. در بسیاری از پستانداران اهلی مانند خوک و گاو، بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های GV به دست آمده از تخمدان‌ها به طور معمول برای تولید جنین و در نتیجه تولید احشام جدید استفاده

بلوغ آزمایشگاهی تخمک یک روش امیدبخش برای درمان ناباروری است که کاربرد پزشکی آن به واسطه موفقیت پایین با محدودیت مواجه است. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که بلوغ آزمایشگاهی (IVM: In vitro maturation) تخمک‌های وزیکول زاینده (GV: Germinal Vesicle) به مرحله متافاز II (MII: Metaphase II) به طور تکنیکی در گونه‌های بسیار متفاوتی از

آدرس مکاتبه: گیلان، رشت، کیومتر ۱۰ جاده تهران، مجتمع دانشگاهی دانشگاه گیلان،
دانشکده پزشکی، صندوق پستی: ۳۴۷۷ E-mail: Bahadori.mh@gmail.com

مطالعات دیگر نشان می‌دهد که تخمک‌های بالغ شده در آزمایشگاه، نسبت به شرایط کشت با مطلوبیت کمتر، بسیار حساس‌تر از تخمک‌های بالغ شده *in vivo* هستند [۱۵] و محیط کشت می‌تواند تکوین *in vivo* و *in vitro* را تحت تاثیر قرار دهد [۱۶]. فاکتورها و مکانیسم‌های درگیر در این روند هنوز به خوبی تعریف نشده است. صرفه نظر از گنادوتروپین درگیر، شواهد خوبی وجود دارد که فاکتورهای تنظیمی موضعی در این روند کاربرد دارد [۱۷]. فاکتور رشد فیروبلاست (FGF) یک گروه از زنجیره پلی پپتیدهای خاص اتصال یابنده به هپارین است که نقش اساسی در تکوین، رشد سلول، ترمیم بافت و انتقال بر عهده دارد. این‌ها تمایز سلول‌های گرانولوزای تخمدان [۱۸]، بیان رسپتورهای هورمون لوته‌ایز کننده (LH)، توسط سلول‌های گرانولوزا و تکثیر سلول‌های زاینده تخمدان [۱۹]، را تحریک می‌کنند. بنابراین در اینجا تاثیر فاکتور رشد فیروبلاست بر میزان از سرگیری میوز، بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM)، لقاح آزمایشگاهی (IVF) و تکوین جنین بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

همه مواد به جز Fetal calf serum (FCS) (Gibco, UK) و human chronic gonadotropin (hCG) (Organon, Holand) از شرکت SIGMA خریداری شد. حیوانات مطالعه شده توسط انستیتوی رازی کرج (ایران) تهیه شد. موش‌های ماده ۶-۸ هفته‌ای از نژاد NMRI با جابه‌جایی گردن، ۴۶-۴۸ ساعت بعد از تزریق داخل صفاقی ۵ واحد PMSG کشته شدند. تخمدان‌ها برداشته شده و فوری در محیط TCM-199 شامل FCS ۵ درصد از پیش انکوبه شده قرار گرفتند. مجموعه تخمک - کومولوس (COCs) و وزیکول زاینده (GV) به وسیله سوزن انسولین برداشت شدند. تخمک‌های برهنه شده با تکرار پیپت کردن، از COCs به دست آمد و با پیپت‌های دهانه کوچک (حدود ۱۳۰ میکرون) سلول‌های کومولوس اطراف برداشت شد.

می‌شود [۳ و ۴]. در حیوانات آزمایشگاهی مثل موش صحرایی و موش، بلوغ آزمایشگاهی به‌عنوان یک روش جامع، میزان بالایی از موفقیت در تولید جنین‌ها و حیوانات جدید را ثابت کرده است [۵ و ۶]. در مقایسه، بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های GV انسان در روش‌های کمک باروری با موفقیت کمتری همراه است [۷ و ۸]. در فولیکول قبل از تخمک‌گذاری، تخمک‌های نابالغ با رشد کامل به وسیله چندین لایه از سلول‌های گرانولوزا، کومولوس اووفروس احاطه شده‌اند. تخمک و سلول‌های کومولوس از طریق اتصالات شکافدار یک سن سیتوم عملکردی به نام مجموعه تخمک-کومولوس (COC: Cumulus - Oocyte Complex) را تشکیل می‌دهند [۹]. قبل از تخمک‌گذاری، گنادوتروپین‌ها دو حادثه را تحریک می‌کند: بلوغ تخمک و پخش شدن کومولوس. بلوغ تخمک شامل پیشرفت آن از پروفاز میوز I به متافاز میوز II (MII) است. اولین نشانه از سرگیری میوز تشکیل تخمک‌هایی با هسته شکسته شده (GVBD: Germinal Vesicle Break Down) است که تقریباً ۲ ساعت بعد از تحریک اتفاق می‌افتد. تخمک بعد از تقریباً ۱۰ ساعت اولین تقسیم میوز را کامل می‌کند و MII تشکیل می‌شود. علاوه بر این اتفاقات چرخه سلولی، تغییراتی در سیتوپلاسم سلول نیز اتفاق می‌افتد که می‌توان مطمئن شد که لقاح طبیعی اتفاق افتاده است [۱۰]. افزایش پلی اسپرمی به دنبال لقاح آزمایشگاهی و پتانسیل پایین تکوین، مانع از تولید عمده آزمایشگاهی (*in vitro*) جنین‌های قابل زنده با کیفیت بالاتر می‌شود. میزان بالای لقاح پلی اسپرمی و میزان پایین تشکیل پیش هسته نر بعد از لقاح آزمایشگاهی (IVF: In vitro fertilization) ممکن است به دلیل بلوغ ناقص تخمک در شرایط آزمایشگاهی باشد. چندین مطالعه برای غلبه بر این مسایل در راستای بهبود بلوغ تخمک به دنبال تغییرات سیستم بلوغ آزمایشگاهی (IVM) صورت گرفته است [۱۱-۱۳]. به‌طور قابل ملاحظه‌ای، کارهای مداوم پروفوسور ادوارد (Edward) به خوبی توسط دانشمندان همه نقاط جهان شناسایی شده است. ایشان اولین کسی بودند که با موفقیت IVF را در موش در سال ۱۹۶۴ تکوین دادند [۱۴].

بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها

تخمک‌های برهنه شده در مرحله GV جمع‌آوری شدند و سه بار در محیط تازه TCM شامل FCS ۵ درصد که از قبل انکوبه شده است با روغن برای بلوغ آزمایشگاهی شستشو داده شدند. این محیط بلوغ (TCM) به‌عنوان محیط کنترل (بدون وجود فاکتور رشد فیبروبلاست) استفاده می‌شود. مقدار مورد نیاز فاکتور رشد فیبروبلاست برای طراحی آزمایش در دوزهای مختلف از قبل اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد، ۲۴ ساعت قبل به تعادل رسانده شد.

طراحی آزمایش

برای مطالعه اثر فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) بر بلوغ هسته‌ای تخمک‌های برهنه شده، تخمک‌های برهنه شده در مرحله وزیکول زاینده (GV) به مدت ۲۴ ساعت در محیط TCM حاوی FCS ۵ درصد تأمین شده با ۱۰ ng/ml (گروه ۲)، ۲۰ ng/ml (گروه ۳)، ۵۰ ng/ml (گروه ۴) و ۱۰۰ ng/ml فاکتور رشد فیبروبلاست (گروه ۵) و TCM به‌تنهایی (گروه کنترل، گروه ۱) کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت مرحله بلوغ توسط میکروسکوپ اینورت بررسی شد. برای مطالعه اثر FGF بر لقاح و تکوین متعاقب آن بر تخمک‌های موش بالغ شده در شرایط آزمایشگاه، تخمک‌هایی که متحمل GVBD و تشکیل اولین جسم قطبی شده‌اند به‌عنوان اولین نشانه بلوغ میتوزی در نظر گرفته شد.

لقاح آزمایشگاهی و تکوین جنین

اسپرم از موش‌های نر بالغ نژاد NMRI از دم اپیدیدیم آن تهیه شد و سپس به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه و مقدار ۱۰^۶ × اسپرم بر میلی‌لیتر در قطرات ۵۰ μl از محیط T6 شامل BSA ۱۵ mg/ml (bovine serum albumin) و تخمک‌های بالغ شده *in vitro* قرار گرفتند. بعد از ۶-۴ ساعت از مجاورت با اسپرم، زیگوت‌ها از محیط لقاح برداشت شدند و در گروه‌های

۱۰-۵ در قطرات ۵۰ μl از محیط T6 شامل BSA ۴ mg/ml پوشیده شده با روغن مینرال در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد کشت داده شدند.

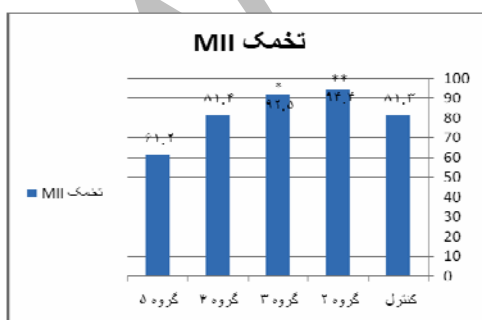
در مواردی که هیچ نشانی از لقاح وجود ندارد و برای رسیدن به مرحله دوسلولی دچار شکست شدند بعد از کشت، بیشتر به‌عنوان تخمک‌های لقاح نیافته در نظر گرفته شدند. جنین‌های طبیعی تا مرحله بلاستوسیست کشت داده شدند.

آنالیز آماری

برای بررسی تأثیر فاکتور رشد فیبروبلاست بر میزان موفقیت بلوغ، لقاح و تکوین جنین در همه گروه‌ها اطلاعات مربوط جمع‌آوری و با استفاده از روش chi-square و با کمک نرم افزار SPSS 13، مقایسه و تجزیه تحلیل شد.

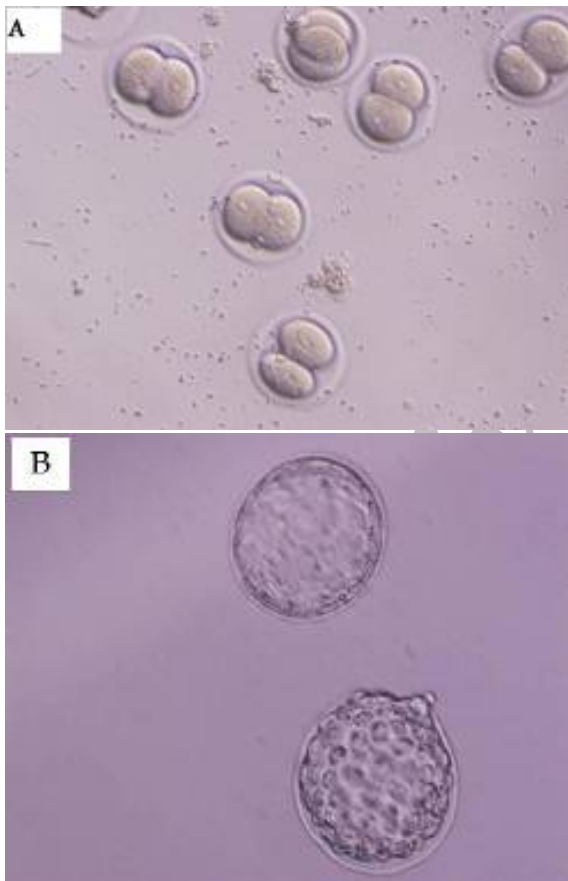
یافته‌ها

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، بهبود بلوغ تخمک‌های COCs و GV (شکل ۲: A,B) به‌متافاز II (شکل ۲c) در گروه کنترل (۱)، گروه‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ به‌ترتیب ۳ و ۸۱ درصد، ۴۴ و ۹۴ درصد، ۵ و ۹۲ درصد، ۴ و ۸۱ درصد و ۳ و ۶۱ درصد است.



شکل ۱: تأثیر فاکتور رشد فیبروبلاست در دوزهای مختلف بر میزان تشکیل متافاز II از تخمک‌های GV و COCs بعد از کشت در محیط TCM. *p=0.0001, **p=0.001

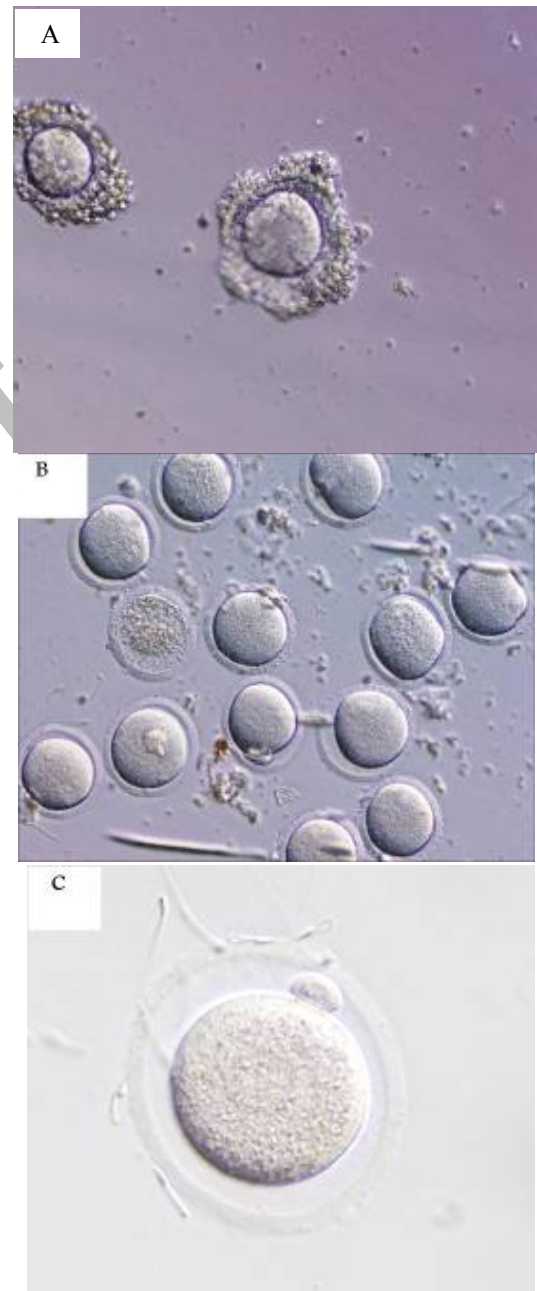
درصد تخمک‌های باقی مانده در مرحله GV در گروه ۵ بالاتر از گروه‌های دیگر است؛ اما میزان تخمک‌هایی که به مرحله متافاز II بلوغ می‌یابد به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) در حضور غلظت‌های ۱۰ ng/ml و ۲۰ ng/ml از فاکتور رشد فیروبلاست (گروه ۲ و ۳) در مقایسه با گروه کنترل (۱) افزایش می‌یابد (شکل ۱). درصد جنین‌هایی که به مرحله دوسلولی (شکل ۳A) تکوین می‌یابند در تخمک‌هایی که در محیط شامل ۲۰ ng/ml کشت داده شده‌اند در مقایسه با گروه کنترل بالاتر است ($p < 0.05$ ، ۷۰/۸٪).



شکل ۳. جنین موش در مرحله دو سلولی (A) و مرحله بلاستوسیست (B)

در این مطالعه میزان تشکیل جنین‌های دو سلولی، میزان لقاح آزمایشگاهی را نشان می‌دهد. در حالی که درصد تخمک‌های رسیده به مرحله دوسلولی در گروه کنترل و گروه‌های ۲، ۴ و ۵ به ترتیب ۵۹، ۵۶/۱، ۳۹/۱ و ۲۹/۲ درصد

در شکل ۱؛ گروه ۱: گروه کنترل بدون فاکتور رشد، گروه آزمون ۲: ۱۰ ng/ml، گروه آزمون ۳ ۲۰ ng/ml، گروه آزمون ۴: ۵۰ ng/ml و گروه آزمون ۵: ۱۰۰ ng/ml فاکتور رشد فیروبلاست. ستاره به کار رفته در بالای ستون‌ها متعلق به گروهی است که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد.

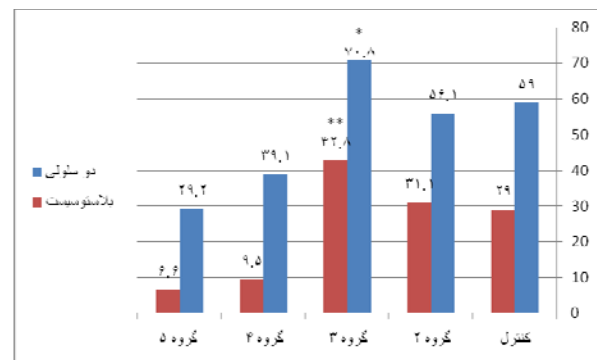


شکل ۲. تخمک موش در مرحله مجموعه تخمک. کومولوس (A)، وزیکول زاینده (B) و متافاز II (C)

غلظت 100 و 50 ng/ml نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد. یافته‌ها نشان می‌دهد که تأمین محیط بلوغ با FGF، میزان تشکیل تخمک‌های متافاز II و در نتیجه بلوغ هسته‌ای را بهبود می‌بخشد. بلوغ تخمک اغلب به دو فرایند سیتوپلاسمی و هسته‌ای تقسیم می‌شود. بلوغ هسته‌ای اصطلاحی است که به از سرگیری میوز و پیشرفت به سمت متافاز II اطلاق می‌شود. بلوغ سیتوپلاسمی به حوادث دیگر بلوغ اشاره می‌کند که به‌طور غیر مستقیم به پیشرفت میوزی که تخمک را برای لقاح و تکوین قیل از لانه‌گزینی آماده می‌کند، مربوط می‌شود [۲۰]. فرایند بلوغ میتوزی و اکتساب پتانسیل تکوین، توانایی تخمک‌هایی را که متحمل لقاح، کلیواژ و تکوین جنین موفق می‌شود را تعیین می‌کند. این‌ها مراحل مهمی هستند که به تنوعی از فاکتورها وابسته است و منجر به آمادگی بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی می‌شود [۲۱]. بلوغ میوزی تخمک یک فرایند پیچیده است که شامل تشکیل GVBD، متراکم شده کروموزوم، تشکیل صفحه متافازی، تکمیل میوز I و آزاد شدن اولین جسم قطبی (Polar body: PB) و توقف در متافاز II است [۲۲].

فاکتور رشد فیروبلاست ابتدا از هیپوفیز گاو در سال ۱۹۷۰ ایزوله شد [۲۳]. این یک مولکول است که در همه جا حضور دارد و در بیولوژی تخمدان توجه ویژه‌ای به آن می‌شود و به‌عنوان عامل میتوزی قوی برای سلول‌های گرانولوزای گونه‌های متنوعی در کشت شناسایی شده است [۲۴-۲۷]. مطالعات ایمنوهیستوشیمی، لوکالیزه شدن سلولی پروتئین فاکتور رشد فیروبلاست را گزارش داده‌اند روی هم رفته وجود فاکتور رشد فیروبلاست در تخمک‌ها و سلول‌های گرانولوزا در بسیاری از مراحل فولیکولی نشان داده شده است، اما رنگ‌آمیزی ایمنو در مراحل خاصی که مبهم است را گزارش داده‌اند [۲۸-۳۲]. لوکالیزه شدن bFGF mRNA درون بافت تخمدان موش صحرائی توسط گاتریج (Guthridge) و همکارانش در سال ۱۹۹۲ مطالعه شده است و متوجه شده‌اند

است و همچنین درصد جنین‌هایی که به مرحله بلاستوسیت (شکل ۳B) رسیده‌اند در گروه ۳ با غلظت 20 ng/ml از فاکتور رشد فیروبلاست به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد (شکل ۴).



شکل ۴: اثر فاکتور رشد فیروبلاست در دوزهای مختلف بر میزان تشکیل دوسلولی و بلاستوسیت از تخمک‌های GV و COCs بعد از کشت در محیط T6. $p=0.01$, $**p=0.005$

در شکل ۴؛ گروه ۱: گروه کنترل بدون فاکتور رشد، گروه ۲: 10 ng/ml، گروه ۳ 20 ng/ml، گروه ۴: 50 ng/ml و گروه ۵: 100 ng/ml فاکتور رشد فیروبلاست. ستاره به کار رفته در بالای ستون‌ها متعلق به گروهی است که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که حضور فاکتور رشد فیروبلاست (10 و 20 ng/ml) در محیط بلوغ، توانایی بلوغ تخمک‌های موش و تشکیل متافاز II را بالا می‌برد. در حالی که فاکتور رشد فیروبلاست در غلظت‌های بالا (50 و 100 ng/ml) آثار منفی بر نقش‌های مذکور دارد. درصد رشد تخمک‌ها به مرحله متافاز II به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) در غلظت 10 ng/ml و 20 ng/ml افزایش می‌یابد (به ترتیب $94/4$ و $92/57$ درصد در مقابل گروه کنترل ($81/3$ درصد)). این درصد در حضور

تقسیمات کلیواژ در دوز متوسط FGF محدود می‌شود؛ بنابراین به نظر می‌رسد که جنین به شرایط کشت استفاده شده برای تکوین بسیار حساس است. بلوک تکوینی *in vitro* جنین از تخمک‌های بالغ شده در محیط کشت، بلوک دوسلولی *in vitro* نامیده می‌شود و در اکثر نژادهای موش ظاهر می‌شود [۳۶]. تکوین تخمک‌های بالغ شده در شرایط آزمایشگاهی و محیط کشت، نشان می‌دهد که تحت تاثیر محیط کشت استفاده شده برای بلوغ قرار می‌گیرند [۱۶] و محیط کشت برای بهبود تکوین جنین‌ها از بلوک‌ها نژادهای موش برای حمایت تکوین تخمک‌های بالغ شده *in vitro* تنظیم شده است. از این رو ۸/۸ درصد جنین‌ها بعد از لقاح، در غلظت ۲۰ ng/ml فاکتور رشد فیبروبلاست تا مرحله بلاستوسیست پیش رفته‌اند.

چندین مطالعه اثر هورمون‌ها و فاکتورهای رشد را بر بلوغ آزمایشگاهی (IVM) تخمک‌ها مطرح می‌کند. اثر مثبت فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها در خوک [۳۷] و موش [۲۰] گزارش شده است، اما مطالعات محدودی بر فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) صورت گرفته است [۳۸] که نشان دهد تکوین جنین/تخمک به مرحله بلاستوسیست توسط FGF آگزوزن در یک مرحله خاص تنظیم می‌شود [۳۹].

در مقایسه با EGF، گزارش‌های کمتری از تاثیر FGF بر بلوغ آزمایشگاهی و IVF در دست است. میوز تخمک در موش توسط EGF دوباره آغاز می‌شود [۴۰]. هر چند بیسر (Bieser) و همکارانش [۴۱] گزارش داده‌اند که یک پروتئولیز خارج سلولی به‌خوبی در طول بلوغ آزمایشگاهی سلول‌های COCs اتفاق می‌افتد که برای عمل آن فاکتور رشد تعدیل‌کننده شبیه FGF ضروری است. از این رو مطالعات ما نشان می‌دهد که فاکتور رشد فیبروبلاست آگزوزن طی شرایط آزمایشگاهی بلوغ آزمایشگاهی (IVM)، لقاح تخمک‌ها و تکوین جنین را بهبود می‌بخشد.

که سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های تکای فولیکول‌های انترال بزرگ و پرانترال کوچکتر، mRNA bFGF را تولید می‌کنند. اضافه کردن FGF در طول بلوغ COCs موش، آزاد شدن جسم قطبی و آمادگی تخمک‌ها برای رسیدن به مرحله متافاز II را افزایش می‌دهد. همچنین ژن FGF در فعالیت سیتوپلاسمی و میانجی‌گری مسیر سیگنالی سلول کاربرد دارد. فاکتور رشد فیبروبلاست یک گروه از زنجیره پلی‌پپتیدهای منفرد اتصال یابنده به هپارین هستند و با سطح سلول به‌واسطه سولفات هپارین میان‌کنش می‌دهد که نشان دهنده ضرورت حضور FGF برای انتقال سیگنال است [۳۳ و ۳۴] که نقش اساسی در فرایند تکثیر و تمایز تخمک برعهده دارد. فاکتور رشد فیبروبلاست تمایز سلول‌های گرانولوزا تخمدان [۱۸]، بیان رسپتور هورمون لوتهینه‌کننده (LH) توسط سلول‌های گرانولوزا و تکثیر سلول‌های زاینده تخمدان [۱۹] را تحریک می‌کند.

اثر FGF بر توانایی تکوین یافتن جنین از تخمک‌های بالغ شده *in vitro* تا کلیواژ به مرحله دو سلولی توسط غلظت‌های متفاوتی میانجی‌گری می‌شود. اگر چه فاکتور رشد فیبروبلاست می‌تواند میزان بلوغ و لقاح را بهبود ببخشد، اما تنها FGF در غلظت ۲۰ ng/ml ظرفیت تکوین تخمک‌های بالغ شده *in vitro* را بهبود می‌بخشد. تغییرات در محیط کشت برای تکوین تخمک‌های بالغ شده در شرایط آزمایشگاهی مفید به نظر می‌رسد. واضح است که تخمک‌های موش در شرایط آزمایشگاهی پتانسیل لازم برای حساسیت به بسیاری از موارد را دارند [۱۵]. به نظر می‌رسد که هورمون‌ها و فاکتورهای رشد که در محیط کشت حضور دارند یا آن‌هایی که از تخمک‌ها ترشح می‌شوند، نقش اساسی در اکتساب توانایی تکوین دارند [۳۵].

با وجود یافته‌هایی درباره این که جنین‌های مشتق شده از تخمک‌های بالغ شده *in vitro* قادر به تکوین در مراحل مشخصی هستند، تکوین *in vitro* ضعیف تلقی می‌شود و تنها

تکوین به طور معنی داری افزایش می یابد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این تحقیق از همکاری مسئولین دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان از جمله آقای دکتر حیدرزاده بابت انجام آنالیز آماری و همچنین آقای فرشاد جباری کارشناس آزمایشگاه جنین شناسی قدردانی می نمایند

نتایج نشان می دهد که میزان بلوغ تخمک، لقاح و پتانسیل تکوین جنین تا مرحله بلاستوسیست در حضور غلظت خاصی از فاکتور رشد فیبروبلاست افزایش می یابد. با توجه به اینکه در طول کشت، جنین دچار دژنره شدن و بلوک می شود، لازم است که یک شرایط کشت مناسب فراهم شود که به شرایط *in vivo* نزدیک باشد. در این مطالعه مشاهده شد که فاکتور رشد فیبروبلاست در دوزهای بالا اثر منفی بر موارد مذکور دارد درحالی که در غلظت ۲۰ ng/ml از FGF، بلوغ و

References

1. **Heikinheimo O, Gibbons WE.** The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Mol Hum Reprod* 1998; 48: 745–56.
2. **Cooper A, Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW.** Differential effects of cryopreservation on nuclear or cytoplasmic maturation in vitro in immature mouse oocytes from stimulated ovaries. *Hum Reprod* 1998; 13: 971-8.
3. **Chanson A, Nocera D, Senn A, De Grandi P, Germond M.** Development of a well-defined medium for the in vitro maturation of immature bovine cumulus-oocyte complexes. *Assist Reprod Genet* 2001; 182:97–105.
4. **Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, et al.** Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured in vitro. *Biol Reprod* 1999; 602:336–40.
5. **Zhang X, Rutledge J, Armstrong DT.** Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured in vitro in a serum-free medium. *Mol Reprod Dev* 1991; 283: 292–6.
6. **Anderiesz C, Trounson AO.** The effect of testosterone on the maturation and developmental capacity of murine oocytes in vitro. *Hum Reprod* 1995; 109: 2377–81.
7. **Trounson A, Anderiesz C, Jones GM, Kausche A, Lolatgis N, Wood C.** Oocyte maturation. *Hum Reprod* 1998; 13: 52–62.
8. **Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, et al.** Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Hum Reprod* 2000; 155: 1140–8.
9. **Gilula, N, Epstein M, Beers W.** Cell-to-cell communication and ovulation: a study of the cumulus cell-oocyte complex. *J. Cell Biol* 1978; 78: 58–75.
10. **Perreault SD, Barbee RR, Slott VL.** Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988 ; 125: 181–6.
11. **Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG.** Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* 1993; 49: 89-94.
12. **Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y.** Effect of porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Res* 1988; 21: 289-95.
13. **Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K, Kikuchi K.** Up data of in vitro production of porcine embryos.

- Front Biosci 2006; 11: 2565-73.
14. **Edwards RG**, An introduction to Bourn Hall. The biomedical background of Bourn Hall Clinic. In: Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction; ed. Brinsden PR. Taylor & Francis Group; London 2005; 26: 1-8.
 15. **Jinno M, Sandow BA, Hodgen GD**. Enhancement of the developmental potential of mouse oocytes matured in vitro by gonadotropins and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). *J. In Vitro Fert Embryo Transf* 1989; 6: 36–40.
 16. **Van De Sandt JJM, Schroeder AC, Eppig JJ**. Culture media for mouse oocyte maturation affect subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 164–71.
 17. **Quennell JH, Stanton JAL, Hurst PR**. Basic fibroblast growth factor expression in isolated small human ovarian follicles. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 623-8.
 18. **Adashi EY, Resnick CE, Croft CS, May JV, Gospodarowicz D**. Basic fibroblast growth factor as a regulator of ovarian granulosa cell differentiation: a novel non-mitogenic role. *Mol Cell Endocrinol* 1988; 55: 7-14.
 19. **Gospodarowicz D, Plouet J, Fujii DK**. Ovarian germinal epithelial cells respond to basic fibroblast growth factor and express its gene: implications for early folliculogenesis. *Endocrinology* 1989; 125: 1266-76.
 20. **De La Fuente R, J.O.Brien M, Eppig JJ**. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Hum Reprod* 1999; 14: 3060-8.
 21. **Trounson A, Anderiesz C, Jones G**. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001; 121: 51-75.
 22. **Modina S, Luciano AM, Vassena R, Baraldi-Seasi L, Lauria A, Gandolfi F**. Oocyte developmental competence after in vitro maturation depends on the persistence of cumulus-oocyte communications which are linked to the intracellular concentration of Camp. *Ital J Anat Embryol* 2001; 106: 241-8.
 23. **Gospodarowicz D**. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem* 1975; 250: 2515–2520.
 24. **Gospodarowicz D, Bialecki H**. The effects of the epidermal and fibroblast growth factors on the replicative lifespan of cultured bovine granulosa cells. *Endocrinology* 1978; 103: 854–65.
 25. **Gospodarowicz D, Bialecki H**. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine, and human origin. *Endocrinology* 1979; 104: 757–64.
 26. **Lavranos TC, Rodgers HF, Bertoncetto I, Rodgers RJ**. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. *Exp Cell Res* 1994; 211: 245–51.
 27. **Roberts RD, Ellis RC**. Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells in vitro. *Biol Reprod* 1999; 61: 1387–92.
 28. **Grothe C, Unsicker K**. Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine adrenal gland, ovary, and pituitary. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 1877–83.
 29. **Wordinger RJ, Brun-Zinkernagel AM, Chang IF**. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) within growing and atretic mouse ovarian follicles. *Growth Factors* 9 1993; 279–289.
 30. **van Wezel IL, Umaphathysivam K, Tilley WD, Rodgers RJ**. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 115: 133–40.
 31. **Yamamoto S, Konishi I, Nanbu K, Komatsu T, Mandai M, Kuroda H, et al**. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary. *Gynecol Endocrinol* 1997; 11: 223–30.

32. **Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R.** Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *Endocrinol* 2000; 167: 371-82.
33. **Amaya E, Musci TJ, Kirschner MW.** Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in xenopus embryos. *Cell* 1991;66:257-70.
34. **Pandey A, Gupta N, Gupta SC.** Improvement of *in vitro* oocyte maturation with lectin supplementation and expression analysis of Cx43, GDF-9, FGF-4 and fibronectin mRNA transcripts in buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Assist Reprod Genet* 2009; 26: 365-71.
35. **Gupta PSP, Nandi S, Ravindranatha BM, Sarma PV.** In vitro maturation of buffalo oocytes with epidermal growth factor and fibroblast growth factor. *Ind J Anim Sci* 2002; 72: 23-4.
36. **Muggleton-Harris A, Whittingham DG, Wilson I.** Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse. *Nature* 1982; 299: 460-2.
37. **Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN.** Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyte development after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 395-401.
38. **Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H.** Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *Reprod Fertil* 1994 ;100:439-46.
39. **Beker ARCI, Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM.** Effect of growth hormone releasing hormone (GHRH) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on in vitro bovine oocyte maturation. *Theriogenology* 2000; 53: 1771-82.
40. **Vorob, eva OA, Nikitin AI.** The effect of hormones and growth factors on regulation of meiosis in oocytes of mice during culture. *Tsitologia* 1991 ;33:42-9.
41. **Bieser B, Stojkovic M, Wolf E, Meyer H, Einspanier R.** Growth factors and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 1998; 59: 801-6.