

## اثر فشار هیدرواستاتیک بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های موش

موریم مؤمنی M.Sc.\*، زهرا رشیدی M.Sc.\*، مه‌ری آزادبخت Ph.D.\*، علی امینی Ph.D.\*

\* گروه ریست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه رازی کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۸۹ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۹۰

### چکیده

**هدف:** بررسی اثر فشار هیدرواستاتیک بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های موش

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه فولیکول‌های آنترال سالم با قطر تقریبی ۵۰۰ میکرومتر از تخمدان موش‌های ماده بالغ نژاد NMRI با رده سنی 6-8 هفته به روش مکانیکی جدا و به صورت تصادفی به دو گروه آزمایش و کنترل تقسیم شدند. در گروه آزمایش فولیکول‌های به محفظه اعمال فشار منتقل شدند و در معرض ۲۰ میلی‌متر جیوه فشار هیدرواستاتیک به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند. در گروه کنترل فولیکول‌ها در محفظه دیگری بدون آنکه به آن‌ها فشار اعمال شود، در انکوباتور قرار داده شدند. فولیکول‌ها به طور جداگانه در قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM- $\alpha$  همراه با ۵ درصد سرم جنینی گاو، ۱۰۰ میلی‌واحد در میلی‌لیتر هورمون تحریک رشد فولیکولی نوترکیب، ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد نوترکیب و ۷/۵ واحد بین‌المللی هورمون گنادوتروپین انسانی جفت به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت توده سلولی کومولوس-تخمک (COCs) از درون فولیکول‌ها جدا و بلوغ تخمک‌ها از نظر درصد تخمک‌های مراحل ژرمینال و زیکول (GV)، شکستن غشای هسته (GVBD) و متافاز II (MII) تا ۴۸ ساعت بررسی شد. همچنین میزان زنده ماندن تخمک و سلول‌های کومولوس با استفاده از رنگ آمیزی حیاتی هسته پروپیدیوم یدید و بیس بنز آمید) بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که فشار هیدرواستاتیک بلوغ آزمایشگاهی تخمک را بهبود بخشید. به طوری که ۲۴ ساعت پس از کشت، افزایش معنی‌داری در میزان تشکیل تخمک‌های GVBD و MII در گروه آزمایش نسبت به کنترل مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). ۴۸ ساعت پس از کشت نیز میزان تشکیل تخمک‌های MII در گروه آزمایش نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ( $p < 0.05$ ). افزایش معنی‌دار در میزان مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). فشار هیدرواستاتیک بر میزان بقای تخمک بی‌تأثیر بود.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد فشار هیدرواستاتیک می‌تواند عامل القای مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس باشد. فشار هیدرواستاتیک ممکن است با القای مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس و دسترسی بهتر اووسیت به فاکتورها و هورمون‌ها سبب بهبود بلوغ آزمایشگاهی آن شود.

**کلید واژگان:** فشار هیدرواستاتیک، بلوغ آزمایشگاهی، تخمک، موش

### مقدمه

شایستگی لازم برای لقاح و تکوین جنین را به دست می‌آورد [۱]. در حقیقت بلوغ آزمایشگاهی تخمک روش کمک

بلوغ تخمک به عنوان ادامه تقسیم میوز و از سرگیری تغییرات سیتوپلاسمی فرآیندی است که حین آن تخمک

آدرس مکاتبه: کرمانشاه، صندوق پستی ۶۷۳۴۶-۶۷۱۴۹، دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی  
Email: azadbakht@m@razi.ac.ir

تحت تأثیر فشار هیدرواستاتیک مطالعه شده است. مشخص شده که فشار هیدرواستاتیک بالا شکل سلول یوکاریوت را تغییر می‌دهد و پروتئین‌های اسکلت سلولی مانند میکروتوبول‌ها، اکتین و فیبرهای میوزین را دپلمریزه می‌کند [۱۰]. در مخمر ساکارومایسس فشار هیدرواستاتیک سبب کاهش نسبت رشد و کاهش بقای سلول‌ها می‌شود. آنالیز فراساختار این مخمر نشان داد که غشای هسته، میکروتوبول‌ها و میکروفیلانت‌ها نسبت به فشار هیدرواستاتیک حساس هستند. به طوری که پس از اعمال فشار فیبرهای اکتین ناپدید می‌شوند [۱۱]. اثر فشار بر سیکل سلولی در سلول‌های مختلف بررسی و نشان داده شده است که تحت تأثیر فشار هیدرواستاتیک سیکل سلولی به طور برگشت‌پذیری در میوز I متوقف می‌شود. احتمالاً فشار هیدرواستاتیک این عمل را از طریق ایجاد ناپایداری در ساختار پروتئین‌ها یا مهار سنتز پروتئین انجام می‌دهد [۱۲ و ۱۳]. در مطالعات آزمایشگاهی تغییرات فشار بر اندام‌های تولید مثلی نر (اپیدیم و بیضه) قبل و پس از وازکتومی [۱۴] و اندام‌های تولید مثلی ماده (اویداکت، رحم و گردن رحم) قبل و پس از جفت‌گیری و پس از تحریک تخمک‌گذاری بررسی و نشان داده شده است که فشار اویداکت، رحم و گردن رحم متناسب با تغییرات آن‌ها برای جا به‌جایی تخم تغییر می‌یابد [۱۵]. محققان در مطالعه‌ای که با هدف اندازه‌گیری فشار داخل فولیکولی پس از تحریک تخمک‌گذاری انجام شد، نشان دادند که با پیشرفت مراحل تخمک‌گذاری فشار مایع فولیکولی افزایش می‌یابد [۱۶]. فشار مایع داخل فولیکولی در فولیکول‌های بالغ گاو [۱۷] هامستر [۱۸] و خرگوش [۱۹] اندازه‌گیری شده و یافته‌ها نشان داده‌اند که میزان فشار مایع فولیکولی طی فرایند تخمک‌گذاری بین ۲۰-۱۵ میلی‌متر جیوه افزایش می‌یابد. از آنجا که پیش از این نشان داده شده است که فشار هیدرواستاتیک می‌تواند راه جدیدی برای بهبود تکوین تخمک‌های بالغ شده خوک پس از انجماد شیشه‌ای باشد [۲۰]

باروری است که می‌توان از آن برای بلوغ تخمک‌های نابالغ استفاده کرده و سپس تخمک‌های بالغ شده را برای لقاح به‌کار برد [۲]. موفقیت در لقاح آزمایشگاهی، نیازمند تخمک‌هایی است که قبل از لقاح بالغ شده و به مرحله متافاز II (MII) رسیده باشند. این در حالی است که درصدی از تخمک‌هایی که در لقاح آزمایشگاهی به کار می‌روند بالغ نبوده و در مرحله ژرمینال و زیکول قرار دارند [۳]. با استفاده از روش بلوغ آزمایشگاهی تخمک می‌توان این تخمک‌ها را در آزمایشگاه بالغ کرده و از آن‌ها برای انجام لقاح آزمایشگاهی استفاده کرد. بلوغ آزمایشگاهی تخمک به نوبه خود با مشکلات زیادی روبرو است. شاید بتوان گفت مهمترین مشکل در بلوغ آزمایشگاهی تخمک، پایین بودن کیفیت تخمک‌های بالغ شده در آزمایشگاه است که تأثیر زیادی بر میزان موفقیت لقاح آزمایشگاهی دارد [۴]. بنابراین باید با اجرای روش‌های جدید کیفیت تخمک‌های بالغ شده در آزمایشگاه را بهبود بخشید تا از آن طریق بتوان میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی را افزایش داد.

سلول‌ها چه به‌صورت منفرد و چه در بافت تحت تأثیر نیروهای مکانیکی مانند فشار هیدرواستاتیک، فشردگی، لرزش، خمش و کشش هستند که باید خود را با این نیروها سازگار کنند. اگر چنین نیروهایی زیادتر از حد معمول شود به طوری که در حد پاسخ طبیعی نباشد، می‌تواند شکل سلول و عملکرد آن را تحت تأثیر قرار دهد و سبب بروز آسیب‌های برگشت‌ناپذیر یا مرگ در سلول‌ها شود [۵]. فشار هیدرواستاتیک نیرویی است که از طرف یک مایع در حال سکون بر جسم وارد می‌شود [۶] و به‌عنوان ابزار مفیدی برای بررسی تغییرات ساختارهای سلولی و پاسخ سلول به عوامل استرس‌زا مطرح است [۷]. مطالعات آزمایشگاهی درباره اثر فشار هیدرواستاتیک بر مورفولوژی سلول‌های آندوتلیال [۸] و لنفوبلاست‌های انسانی [۹] انجام شده است. در شرایط آزمایشگاهی تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های جانوری،

### جداسازی و انتخاب فولیکول‌های تخمدان

جداسازی و کشت فولیکول براساس روش‌های متداول با اندکی تغییرات انجام شد. [۲۳]. فولیکول‌های تخمدان با استفاده از سرنگ ۱ میلی‌لیتری متصل به سر سرنگ ۲۷ گیج به صورت مکانیکی از بافت استرومایی تخمدان جدا شدند و چند بار در محیط تشریح تخمدان شستشو داده شدند. سپس فولیکول‌های آنترال سالم با کیفیت و قطر تقریبی ۵۰۰ میکرومتر انتخاب شدند. این فولیکول‌ها، فولیکول‌هایی با قطر تقریبی ۵۰۰ میکرومتر بودند که در آن‌ها سلول‌های گرانولوزا تکثیر یافته و به سلول‌های گرانولوزای کومولوس و سلول‌های گرانولوزای دیواره‌ای متمایز شده‌اند. لایه تکا و آتروم نیز تشکیل شده به طوری که درون فولیکول کاملاً شفاف به نظر می‌رسد. فولیکول‌ها پس از جداسازی و انتخاب برای انجام آزمایش در گروه‌های کنترل (بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک) و آزمایش (در معرض فشار هیدرواستاتیک) تقسیم‌بندی شدند و به محیط بلوغ فولیکول منتقل شدند. محیط بلوغ فولیکول شامل محیط کشت  $\alpha$ -MEM همراه با ۵ درصد سرم (FBS: Fetal Bovine Serum)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین، ۱۰۰ میلی‌واحد در میلی‌لیتر هورمون تحریک کننده فولیکول (Gonal-F)، ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (EGF; Epidermal Growth Factor) و ۷/۵ واحد در میلی‌لیتر هورمون نوترکیب گنادوتروپین جفتی انسانی (HCG; Human Chorionic Gonadotropine) است. کشت فولیکول‌ها در قطره‌های محیط بلوغ تخمک انجام شد. به این ترتیب که روز قبل از تشریح موش، قطره‌های ۲۰ میکرولیتری از محیط بلوغ فولیکول در ظروف کشت ۶۰mm قطره‌گذاری شده و سطح آن‌ها توسط ۵ میلی‌لیتر روغن معدنی پوشیده و به مدت ۸-۱۰ ساعت در انکوباتور با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از جداسازی فولیکول‌ها از تخمدان در هر قطره یک فولیکول قرار داده شد.

و همچنین پیش از این وقوع مرگ سلولی در سلول‌های گرانولوزا و کومولوس [۲۱] و افزایش فشار در درون مایع فولیکولی در هنگام تخمک‌گذاری نشان داده شده است [۱۶]، شاید بتوان از فشار هیدرواستاتیک برای القای مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس استفاده کرد تا بدین وسیله بلوغ بهتری داشته باشد.

در حال حاضر تحقیقات زیادی در زمینه اثر فشار هیدرواستاتیک از دیدگاه آسیب‌شناسی در دست بررسی است که در آن‌ها اثر افزایش فشار هیدرواستاتیک بر سلول‌های مختلف مورد مطالعه قرار می‌گیرد. با این وجود مطالعات در زمینه آثار فشار هیدرواستاتیک بر سلول‌های جنسی در ابتدای کار قرار دارد و هنوز پرسش‌های زیادی در مورد آثار فشار هیدرواستاتیک در ایجاد تغییرات در توانایی‌های حیاتی سلول‌های جنسی به‌ویژه تخمک وجود دارد که به تحقیقات و مطالعات بیشتری نیاز دارد.

### مواد و روش‌ها

#### حیوان آزمایشگاهی

در این مطالعه از موش‌های کوچک آزمایشگاهی بالغ نژاد NMRI خریداری شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی با رده سنی ۶-۸ هفته استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و به آب و غذا دسترسی کافی داشتند. غذای آن‌ها از شرکت گل دانه کرمانشاه تهیه شد. موش‌ها با روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و با ایجاد شکاف طولی در سطح شکم تخمدان‌ها جدا و پس از برداشتن بافت همبند و چربی اطراف آن در محیط تشریح تخمدان قرار داده شد. محیط تشریح تخمدان شامل: محیط کشت  $\alpha$ - Minimal Essential Medium ( $\alpha$ -MEM; GIBCO) همراه با ۱۰ درصد سرم (FBS; GIBCO) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین بود [۲۲].

سپس ظروف کشت حاوی تخمک‌ها در انکوباتور قرار داده شد و بلوغ تخمک‌ها تا ۴۸ ساعت پس از انجام آزمایش نیز مورد بررسی قرار گرفت.

## بررسی میزان زنده ماندن سلول‌های

### کومولوس-تخمک

شمارش سلولی کومولوس و بررسی میزان زنده ماندن این سلول‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی حیاتی هسته (بیس بنز آمید و پروپیدیوم یدید) بررسی شد [۲۵]. اساس این آزمون در نفوذپذیری سلول‌های آسیب‌دیده یا مرده که غشا آن‌ها دچار پارگی شده نسبت به رنگ پروپیدیوم یدید است. در این روش توده سلول‌های کومولوس و تخمک در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت پس از انجام آزمایش در قطره‌های حاوی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ پروپیدیوم یدید به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس هر یک از توده‌های سلولی کومولوس و تخمک سه بار به مدت ۱۵ دقیقه در محلول بافر فسفات شستشو داده شدند. پس از آن سلول‌های کومولوس به منظور تعیین تعداد سلول‌های مرده با میکروسکوپ فلورسنس (Olympus IX-71; Japan) بررسی شدند. سلول‌های مرده با رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید به رنگ قرمز دیده شد. سپس سلول‌های کومولوس-تخمک از در پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از سه بار شستشو در محلول بافر فسفات به محلول ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ بیس بنز آمید منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه در آن قرار داده شدند. پس از سه بار شستشو در محلول بافر فسفات سلول‌های کومولوس-تخمک در یک قطره گلیسرین بین لام و لامل قرار داده شدند و با میکروسکوپ فلورسنس مشاهده و شمارش سلولی بر اساس شمارش هسته‌های رنگ‌آمیزی شده انجام شد. هسته سلول‌ها با رنگ‌آمیزی بیس بنز آمید به رنگ آبی دیده شد.

## سیستم اعمال فشار هیدرواستاتیک

سیستم اعمال فشار هیدرواستاتیک مورد استفاده در این تحقیق یک مدل تأیید شده در بین سیستم‌های متعدد اعمال فشار هیدرواستاتیک بر سلول‌ها است که پیش از این توسط آگار و همکاران (Agar et al) مورد استفاده قرار گرفته است [۲۴]. این سیستم از یک محفظه از جنس Perspex تشکیل شده که از طریق یک دریچه ورودی هوا به یک پمپ دهنده فشار متصل است. پمپ دهنده فشار می‌تواند فشاری معادل صفر تا ۲۰۰ میلی‌متر جیوه را بر محتویات داخل محفظه اعمال کند. برای برقراری تعادل دمایی محفظه اعمال فشار هیدرواستاتیک در انکوباتور قرار داده شد و ظروف کشت حاوی فولیکول‌های گروه آزمایش (فولیکول‌هایی که باید تحت اثر فشار هیدرواستاتیک قرار گیرند) در داخل محفظه قرار گرفتند و از هوای داخل انکوباتور توسط پمپ دهنده فشار هیدرواستاتیک به میزان ۲۰ میلی‌متر جیوه به مدت ۳۰ دقیقه به داخل محفظه، پمپ شد. برای یکسان‌سازی شرایط ظروف کشت حاوی فولیکول‌های گروه کنترل در محفظه مشابه دیگری بدون اعمال فشار در انکوباتور قرار داده شد. پس از اعمال فشار، ظروف کشت خارج و به انکوباتور دیگری با شرایط عادی منتقل شد.

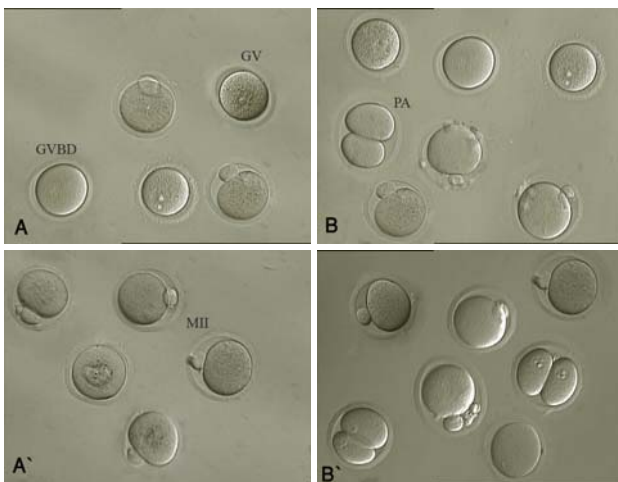
## بلوغ تخمک‌های حاصل از فولیکول‌های رشد

### یافته در محیط کشت

۲۴ ساعت پس از انجام آزمایش فولیکول‌های تخمدان در دو گروه آزمایش و کنترل، به صورت مکانیکی و با استفاده از سرنگ ۱ میلی‌لیتری متصل به سر سرنگ ۲۷ گیج شکافته شده و تخمک‌های آن‌ها خارج شدند و تخمک‌ها از نظر بلوغ یعنی مرحله ژرمینال وزیکول (GV; Germinal Vesicle)، شکستن غشای هسته (GVBD: Germinal Vesicle Breakdown) و متافاز (MII) II به وسیله میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شدند.

تخمک‌ها نشان داد که اعمال فشار هیدروستاتیک پس از ۲۴ ساعت سبب افزایش میزان تشکیل تخمک‌های GVBD در گروه آزمایش (۳۴/۷ درصد) در مقایسه با گروه کنترل (۲۵/۵ درصد) می‌شود ( $P < ۰/۰۵$ ). هم‌چنین میزان تخمک‌های MII در گروه آزمایش (۲۷٪) در مقایسه با گروه کنترل (۱۹/۵٪) افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < ۰/۰۵$ ).

۴۸ ساعت پس از اعمال فشار هیدرواستاتیک میزان تخمک‌های مرحله GVBD در گروه آزمایش (۷/۳۵٪) در مقایسه با گروه کنترل (۱۳/۹٪) کاهش معنی‌داری را نشان داد. میزان تخمک‌های MII در گروه آزمایش (۵۱/۳٪) در مقایسه با گروه کنترل (۳۲/۸٪) افزایش معنی‌داری داشت ( $P < ۰/۰۵$ ) (شکل ۱ و جدول ۱).



شکل ۱. اثر فشار هیدرواستاتیک بر بلوغ تخمک‌های به دست آمده از فولیکول‌های تخمدان موش  
 A و A': بلوغ تخمک به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع آزمایش در گروه کنترل  
 B و B': بلوغ تخمک به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع آزمایش در گروه آزمایش  
 GV: تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول، GVBD: تخمک مرحله‌ی شکستن غشای هسته، MII: تخمک متافاز II، PA: جنین دو سلولی حاصل از بکرزایی (بزرگنمایی:  $\times 200$ )

برای ارزیابی میزان زنده ماندن سلول‌ها تعداد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با پروپیدیوم دیدید (سلول‌های مرده) از تعداد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با بیس بنزآمید (تعداد کل سلول‌ها) کم شد تا تعداد سلول‌های زنده محاسبه شود. سپس درصد بقای سلول‌ها از تقسیم تعداد سلول‌های زنده بر تعداد کل سلول‌ها به دست آمد.

### طرح آزمایش

فولیکول‌های تخمدان انتخاب و به صورت تصادفی در دو گروه کنترل و آزمایش تقسیم شدند. ظروف کشت حاوی فولیکول‌های گروه آزمایش در داخل محفظه فشار قرار داده شد و در معرض فشار هیدرواستاتیک قرار گرفت. در گروه کنترل، ظروف کشت حاوی فولیکول‌ها در محفظه دیگری بدون اینکه به آن‌ها فشار اعمال شود در انکوباتور قرار گرفت. سپس فولیکول‌های هر دو گروه از نظر بلوغ آزمایشگاهی تخمک، میزان بقای تخمک و میزان مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس بررسی شد. برای بررسی بلوغ آزمایشگاهی تخمک هر آزمایش هفت بار و برای بررسی میزان بقای تخمک و میزان مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس هر آزمایش پنج بار تکرار شد.

### بررسی آماری

داده‌های مربوط به بلوغ تخمک، میزان زنده ماندن تخمک و میزان زنده ماندن سلول‌های کومولوس در دو گروه کنترل و آزمایش به صورت میانگین و انحراف از خطای میانگین محاسبه و با آزمون آماری t-test و نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۵ بررسی و  $p < ۰/۰۵$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

**اثر فشار هیدرواستاتیک بر میزان بلوغ تخمک‌ها**  
 نتایج آماری به دست آمده از ارزیابی میزان بلوغ

آزمایش به ترتیب ۸۷ و ۸۴ درصد بود که کاهش معنی داری را بین گروه کنترل و گروه آزمایش نشان داد ( $p < 0.05$ ) (شکل ۱ و جدول ۲).

**جدول ۲.** اثر فشار هیدرواستاتیک بر میزان زنده ماندن سلول‌های کومولوس-تخمک به دست آمده از فولیکول‌های تخمدان موش

تعداد		تعداد		تعداد		تعداد	
گروه‌ها	تعداد	تعداد سلول‌ها	سلول‌های تخمک‌های زنده	گروه‌ها	تعداد	تعداد سلول‌ها	سلول‌های تخمک‌های زنده
کنترل	۲۵	$50.67 \pm 25.7a$	$482/2 \pm 23/3$	آزمایش	۲۵	$517/3 \pm 24/6a$	$459/4 \pm 21$
آزمایش	۲۵	$50.67 \pm 25.7a$	$482/2 \pm 23/3$	کنترل	۲۵	$50.67 \pm 25.7a$	$482/2 \pm 23/3$

۲۴ ساعت

تعداد سلول‌های کومولوس زنده / تعداد تخمک‌های زنده

۲۵	$471/6 \pm 66/5$
(۱۰۰) a	(۸۷) a
۲۵	$438/6 \pm 33/7$
(۱۰۰) a	(۸۴) b

کنترل: بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک، آزمایش: در معرض فشار هیدرواستاتیک  
مقادیر داخل پرانتز به صورت درصد بیان شده است.  
a/b مقادیر با نمادهای مختلف در هر ستون دارای اختلاف معنی داری است ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ).

## بحث

بلوغ آزمایشگاهی تخمک روش مناسبی برای کاهش عوارض جانبی ناشی از تحریک هورمونی در برنامه لقاح آزمایشگاهی است. صرف نظر از پیشرفت‌هایی که در زمینه بلوغ آزمایشگاهی تخمک به دست آمده، هنوز چالش‌هایی برای بهبود آن وجود دارد. در مطالعه حاضر اثر فشار هیدرواستاتیک در بهبود بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های به دست آمده از تخمدان موش بررسی شد. میزان بلوغ

**جدول ۱.** اثر فشار هیدرواستاتیک بر بلوغ تخمک‌های به دست آمده از فولیکول‌های تخمدان موش

۲۴ ساعت					
گروه‌ها	تعداد	GV	GVBD	MII	Deg
کنترل	۸۷	$25(28/8)a$	$22(25/5)a$	$17(19/5)a$	$33(26/2)a$
آزمایش	۹۱	$19(20/1)a$	$31(34/7)b$	$25(27)b$	$16(18/2)a$

۴۸ ساعت					
گروه‌ها	تعداد	GV	GVBD	MII	Deg
کنترل	۱۳۲	$13(15/8)a$	$12(13/9)a$	$29(32/8)a$	$33(37/5)a$
آزمایش	۸۸	$8(8/2)a$	$7(7/3)b$	$47(51/3)b$	$29(33/2)a$

کنترل: بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک، آزمایش: در معرض فشار هیدرواستاتیک

GV: تخمک در مرحله ژرمینال و زیگول، GVBD: تخمک در مرحله شکستن غشای هسته، MII: تخمک در مرحله متافاز II، Deg: تخمک تخریب شده مقادیر داخل پرانتز به صورت درصد بیان شده است.  
a/b مقادیر با نمادهای مختلف در هر ستون دارای اختلاف معنی داری هستند ( $t$ -test,  $p < 0.05$ )

## اثر فشار هیدرواستاتیک بر میزان تخمک‌گذاری

### در محیط کشت

۲۴ ساعت پس از کشت، فولیکول‌ها از نظر میزان تخمک‌گذاری در محیط کشت بررسی شدند. نتایج نشان داد که میزان تخمک‌گذاری در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل (به ترتیب ۲/۷ و ۰ درصد) افزایش معنی داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ).

## اثر فشار هیدرواستاتیک بر میزان زنده ماندن

### سلول‌های کومولوس-تخمک

بر اساس نتایج به دست آمده میزان زنده ماندن تخمک بین گروه‌های کنترل و آزمایش اختلاف معنی داری نداشت. میزان بقای سلول‌های کومولوس در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت در گروه کنترل به ترتیب ۹۵ و ۸۷ درصد و در گروه

دارای نوسان است اما در گردن رحم تغییرات فشار چندان زیاد نیست. پس از جفت‌گیری تغییرات فشار در اویداکت و رحم کاهش یافته و به تدریج کم می‌شود اما در گردن رحم به صورت جزئی فشار افزایش می‌یابد. هم‌چنین میزان فشار پس از تحریک تخمک‌گذاری در رحم و گردن رحم تغییر چندانی نمی‌کند اما میزان آن در اویداکت نسبت به قبل از جفت‌گیری کاهش می‌یابد [۳۲]. در فرآیند آزاد شدن تخمک کاهش نیروی کششی دیواره فولیکول، افزایش فشار مایع فولیکولی که ناشی از تجمع مایع فولیکولی و انتقال مایع از سیستم رگی است، رخ می‌دهد و فشار مایع فولیکولی داخل فولیکول طی تخمک‌گذاری به اندازه ۲۰ - ۱۵ میلی‌متر جیوه تغییر می‌کند که ممکن است همراه با تغییرات بیوشیمیایی در فولیکول سبب افزایش انقباض، افزایش فشار داخل فولیکول، انبساط تخمدان، افزایش نفوذپذیری رگ‌ها، افزایش فشار بافتی و فشار هیدروستاتیک مویرگ‌های لایه تکای اطراف فولیکول و افزایش فشار مایع داخل فولیکول شود [۱۶].

در مطالعات پیشین نقش سلول‌های کومولوس برای افزایش میزان بلوغ تخمک بررسی شده است. تحقیقات نشان داده است که طی فرآیند تخمک‌گذاری سلول‌های کومولوس از هم تفکیک شده و تخمک به داخل مایع فولیکولی آزاد می‌شود [۲۱]. فواید سلول‌های کومولوس برای تخمک مشخص شده است حتی در انسان نیز حذف سلول‌های کومولوس ممکن است به تخمک آسیب برساند. هم‌چنین سلول‌های کومولوس ترکیبات مفید و مغذی را برای بلوغ تخمک در اختیار آن قرار می‌دهند و به طور معنی‌داری بلوغ تخمک را در محیط کشت آزمایشگاهی افزایش می‌دهند [۳۳]. به عبارت دیگر می‌توان گفت که سلول‌های کومولوس و تخمک از طریق اتصالات سلولی در فولیکول پیش از تخمک‌گذاری ارتباط تنگاتنگی با هم دارند که این ارتباط سبب می‌شود فاکتورهای تنظیمی و پاراکرینی راحت‌تر در

آزمایشگاهی تخمک و میزان زنده ماندن تخمک و سلول‌های کومولوس در دو گروه بدون اعمال فشار هیدروستاتیک و در معرض فشار هیدروستاتیک مورد مطالعه قرار گرفت. یافته‌های این آزمایش نشان داد که فولیکول‌ها در محیط بلوغ آزمایشگاهی بالغ شدند و میزان بلوغ آن‌ها در اثر اعمال فشار هیدروستاتیک بهبود یافت. بهبود بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها با افزایش وقوع مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس همراه بود.

تا کنون تحقیقات زیادی برای بهبود شرایط بلوغ آزمایشگاهی تخمک انجام شده است. بدین منظور از انواع هورمون‌ها (۲۶)، فاکتورهای رشد (۲۷)، سیتوکین‌ها (۲۸) و سایر ترکیبات مانند ملاتونین (۲۹) استفاده شده است.

فشار هیدروستاتیک به‌عنوان یکی از عوامل اصلی محیط اطراف سلول‌ها نقش بسیار مهمی در عملکرد و حفظ دینامیک سلول بر عهده دارد. آگار و همکارانش مطالعاتی را در مورد آثار فشار هیدروستاتیک بر سلول‌های عصبی انجام دادند. در تحقیقات ایشان فشار اعمال شده ۱۰۰ میلی‌متر جیوه به مدت ۲ ساعت بود و به این نتیجه رسیدند که افزایش فشار هیدروستاتیک سبب القا آپوپتوز شدید در رده‌های سلولی مختلف عصبی می‌شود [۲۴ و ۳۰].

در زمینه اثر فشار بر سیستم تولید مثلی و تخمدان تحقیقات اندکی به‌صورت آزمایشگاهی انجام شده است و بررسی اثر فشار به اندازه گیری فشار داخل لومن اندام‌های تولید مثلی و فشار مایع داخل فولیکولی محدود شده است [۳۲ و ۳۳]. تحقیقات نشان داده شده است که در سیستم تولید مثلی ماده تغییرات فشار اویداکت، رحم و گردن رحم هم‌زمان با تغییرات حرکت آن‌ها برای جا به‌جایی تخم روی می‌دهد. به‌طوری که پیش از جفت‌گیری فشار داخل اویداکت ۳۸ میلی‌متر جیوه، رحم ۲۰ میلی‌متر جیوه و گردن رحم ۹ میلی‌متر جیوه است. هم‌چنین نشان داده شده است که فشار داخل مجرای اویداکت و رحم قبل از جفت‌گیری

آزمایش ارزیابی میزان زنده ماندن تخمک و سلول‌های کومولوس، درصد بقای تخمک در هر دو گروه ۱۰۰ درصد بود که این مسئله نشان دهنده بقای طبیعی تخمک‌ها است. میزان بقای سلول‌های کومولوس در گروه در معرض فشار هیدروستاتیک کاهش یافته بود که می‌توان آن را به تغییر در ساختار سلول و در نهایت وقوع مرگ سلولی در آن‌ها نسبت داد.

مطالعات نشان داده است که تغییر در محیط یونی، PH و تغییرات مکانیکی می‌تواند سبب فعال شدن تخمک و از سرگیری میوز در آن شود [۴۲]. در فعال شدن تخمک علاوه بر کلسیم خارج سلولی، فشار هیدروستاتیک به‌عنوان تحریک مکانیکی از طریق کانال‌های حساس مکانیکی مؤثر است [۴۳]. از طرفی در پستانداران در اثر فشار هیدروستاتیک کانال‌های سدیمی وابسته به کانال‌های کلسیمی باز می‌شود [۴۴]. بنابراین با توجه به اثر فشار هیدروستاتیک در القای مرگ سلولی در سلول‌ها از یک سو و فعال شدن تخمک در برخی گونه‌ها وابسته به میزان فشار هیدروستاتیک و مدت زمان اعمال آن از سوی دیگر می‌توان از فشار هیدروستاتیک به‌عنوان عاملی برای القای مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس استفاده نمود و از آن طریق از نتایج ناشی از مرگ سلول‌های برای بهبود شرایط بلوغ تخمک بهره برد.

نتایج این مطالعه نشان داد که فشار هیدروستاتیک سبب بهبود بلوغ آزمایشگاهی تخمک می‌شود. فشار هیدروستاتیک اثر نامطلوبی بر میزان زنده ماندن تخمک نداشت ولی میزان زنده ماندن سلول‌های کومولوس را کاهش داد. با توجه به این که مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس در مراحل تخمک‌گذاری مشاهده شده است، می‌توان گفت که فشار هیدروستاتیک احتمالاً از طریق ایجاد مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس سبب دسترسی آسان‌تر تخمک به فاکتورها و هورمون‌ها شده و از این طریق میزان بلوغ تخمک بهبود می‌یابد.

اختیار تخمک قرار گیرد. از بین رفتن این اتصالات می‌تواند تکثیر سلول‌های کومولوس را کاهش داده و آپوپتوز را در آن‌ها القا کند. سیگنال‌هایی که توسط سلول‌های کومولوس تولید می‌شود، حتی با از دست دادن اتصالات باز سلول‌های کومولوس بر بلوغ تخمک اثر دارد. جدا شدن فیزیکی سلول‌های کومولوس از تخمک سبب قطع انتقال cAMP به تخمک می‌شود و بلوغ هسته و سیتوپلاسم در آن رخ می‌دهد [۳۴]. فاکتورهای مختلفی از سلول‌های فولیکولی به روش پاراکرینی بر بلوغ تخمک اثر دارد. سلول‌های تکا، فاکتور شبیه انسولینی (Insl-3) تولید می‌کنند که آدنیلات سیکلاز را غیر فعال و میزان cAMP را کاهش می‌دهد و منجر به از سرگیری میوز و شکستن غشای هسته ژرینال و زیکول می‌شود [۳۵]. سلول‌های گرانولوزای کومولوس و دیواره‌ای فاکتور نروتروپیک مشتق شده از مغز (BDMF) را ترشح می‌کنند که به رسپتور خاص خود در سطح تخمک متصل شده و در بلوغ آن نقش دارد [۳۵]. هم‌چنین سلول‌های گرانولوزای دیواره‌ای لیگاند‌های شبیه فاکتور رشد اپیدرمی (Egf-L) را ترشح می‌کنند که به عنوان القا کننده برای از سرگیری میوز عمل می‌کند [۳۶]. تحقیقات نشان داده است که طی فرایند تخمک‌گذاری سلول‌های کومولوس از هم تفکیک شده و تخمک به داخل مایع فولیکولی آزاد شود [۳۷ و ۳۸]. فعالیت آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ و ۹ در مراحل انتهایی تخمک‌گذاری می‌تواند دلیلی بر تخریب ماتریکس خارج سلولی و جدایی و سست شدن سلول‌های فولیکولی باشد [۳۹]. سلول‌های کومولوس نقش مهمی را در بلوغ و لقاح تخمک دارند و اثر القای آپوپتوز در سلول‌های کومولوس بر پتانسیل تکوین تخمک نامشخص است [۴۰]. از طرفی وجود مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس نشان می‌دهد که مرگ سلولی فاکتور عمل‌کننده در تخمک‌گذاری است تا جایی که پیش‌هاد شده است ایجاد تغییرات ملایم آپوپتوزی در فولیکول‌های قبل از تخمک‌گذاری، می‌تواند بر بلوغ تخمک موثر باشد [۴۱]. در



## References

1. **Fulka JJ, First NL, Moor RM.** Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* 1998; 4 (1): 41–9.
2. **Durga Rao G, Tan SL, Med M.** In Vitro Maturation of Oocytes. *Reproduction* 2006; 23(3): 242-7.
3. **Hwu YM, Lee RK, Chen CP, Su JT, Chen Y W, Lin SP.** Development of hatching blastocysts from immature human oocytes following in-vitro maturation and fertilization using a co-culture system. *Hum Reprod* 1998; 13(7): 1916-21.
4. **Loneragan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP.** Oocyte and Embryo Quality: Effect of Origin, Culture Conditions and Gene Expression Patterns. *Reprod Dom Anim* 2003; 38(4): 259–67.
5. **Masson P.** Action of hydrostatic pressure on proteins: emergence of high pressure biotechnology, potential pharmaceutical and medical applications. *Ann. Pharm. Fr.* 1999; 57: 49–55.
6. **Zonia L, Munnik T.** Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function. *Trends Plant. Sci.* 2007; 12(3): 90-97.
7. **Ronald G, Wilson J, Judy E, Zimmerman S, Zimmerman A.** Hydrostatic pressure induced changes in the cytoarchitecture of PC-12 cells. *Cell Biol Int* 2001; 7:649–65.
8. **Ives C L, Eskrin SG, McIntire LV.** Mechanical effects on endothelial cell morphology: in vitro assessment. *In vitro Cell Dev Biol* 1986; 22: 500-7.
9. **Takano KJ, Takano T, Yamanochi Y, Satou T.** Pressure induce apoptosis in human lymphoblast. *Exp Cell Res* 1997; 235: 155-60.
10. **Crenshaw HC, Allen JA, Skeen V, Harris A, Salmon ED.** Hydrostatic pressure has different effects on the assembly of tubulin, actin, myosin II, vinculin, talin, vimentin, and cytokeratin in mammalian tissue cells. *Exp Cell Res* 1996; 227: 285–97.
11. **Kawarai T, Arai S, Furukawa S, Ogihara H, Yamasaki M.** High-hydrostatic-pressure treatment impairs actin cables and budding in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 2006; 101: 515–8.
12. **Rao PN.** Mitotic synchrony in mammalian cells treated with nitrous oxide at high pressure. *Science* 1968; 160: 774–6.
13. **George VT, Brooks G, Humphrey TC.** Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast. *Mol Biol Cell* 2007; 18(10):4168-79.
14. **Johnson AL, Howards SS.** Intratubular Hydrostatic Pressure in Testis and Epididymis Before and After Long-Term Vasectomy in the Guinea Pig. *Biol Reprod* 1976; 14: 371-6.
15. **Suzuki H, Tsutsumi Y.** Intraluminal Pressure Changes in the Oviduct, Uterus, and Cervix of the Mated Rabbit. *Biol Reprod* 1981; 24: 723-33.
16. **Matousek M, Carati C, Gannon B, Brannström M.** Novel method for intrafollicular pressure measurements in the rat ovary: increased intrafollicular pressure after hCG stimulation. *Reproduction* 2001; 121: 307–14.
17. **Bronson RA, Bryant G, Balk MW, Emanuele N.** Intrafollicular pressure within preovulatory follicles of the pig. *Fertil Steril* 1979; 31: 205–13.
18. **Talbot P.** Intrafollicular pressure promotes partial evacuation of the antrum during hamster ovulation in vitro. *J Exp Zool* 1983; 226: 129–35.
19. **Espey LL and Lipner H.** Measurements of intrafollicular pressures in the rabbit ovary. *J Physiology* 1963; 205: 1067–72.
20. **Du Y, Pribenszky CS, Molnar M, Zhang X, Yang H, Kuwayama M, et al.** High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro

- developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction* 2008; 135: 13-17.
21. **Murdoch WJ, Gottsch. ML.** Proteolytic Mechanisms in the Ovulatory Folliculo - Luteal Transformation. *Connective Tissue Res* 2003; 44: 50-7.
  22. **Demeestere I, Delbaere A, Gervy C, Van den Bergh M, Devreker F, Englert Y.** Effect of preantral follicle isolation technique on in vitro growth, oocyte maturation and embryo development in mice. *Hum Reprod* 2002; 17(8): 2152 - 9.
  23. **Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC.** In vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 1996; 11: 2656-66.
  24. **Agar A, Yip SS, Hill MA, Coroneo MT.** Pressure related apoptosis in neuronal cell lines. *J Neurosci Res* 2000; 60: 495-593.
  25. **Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO.** Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocyst. *J Reprod Biomed* 2001; 3: 25-9.
  26. **Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC.** Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Hum Reprod* 1997; 12: 759-68.
  27. **Mao J, Smith MF, Rucker EB, Wu GM, McCauley TC, Cantley TC, et al.** Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. *Anim. Sci.* 2004; 82:1967-75.
  28. **Haidari K, Salehnia M, Rezazadeh Valoujerdi M.** The Effects of Different Concentrations of Leukemia Inhibitory Factor on the Development of Isolated Preantral Follicles from Fresh and Vitrified Mouse Ovaries. *Iran. Biomed. J.* 2006; 10 (4): 185-90.
  29. **Adriaens I, Jacquet P, Cortvrindt R, Janssen K, Smitz J.** Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology* 2006; 228: 333-43.
  30. **Agar A, Li Sh, Agarwal N, Coroneo MT, Hill MA.** Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure. *Brain Res* 2006; 10: 191-200.
  31. **Johnson AL, Howards SS.** Intratubular Hydrostatic Pressure in Testis and Epididymis Before and After Long-Term Vasectomy in the Guinea Pig. *Biol Reprod* 1976; 14: 371-6.
  32. **Suzuki H, Tsutsumi Y.** Intraluminal Pressure Changes in the Oviduct, Uterus, and Cervix of the Mated Rabbit. *Biol Reprod* 1981; 24: 723-33.
  33. **Albertini, DF, Combelles, CM, Benecchi E, Carabatsos MJ.** Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001; 121: 647-53.
  34. **Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, Sollewijn Gelpke MD, Hsueh AJ.** Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9206-11.
  35. **Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H, et al.** Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:7323-8.
  36. **Procha'zka R, Kalab P., Nagyova E.** Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biol Reprod* 2003; 68:797-803.
  37. **Luciano AM, Modina S, Gandolfi F, Lauria A, Armstrong DT.** Effect of cell-to-cell contact on in vitro deoxyribonucleic acid synthesis and

- apoptosis responses of bovine granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor. *Biol Reprod* 2000; 63: 1580-5.
38. **Zeuner A, Muller K, Reguszynski K, Jewgenow K.** Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology* 2003; 59: 1421-33.
39. **Young KA, Hennebold JD, Stouffer RL.** Dynamic expression of mRNAs and proteins for matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the primate corpus luteum during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 833-40.
40. **Zeuner A, Muller K, Reguszynski K, Jewgenow K.** Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology* 2003; 59:1421-33.
41. **Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers MM, Dieleman SJ.** Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocyte. *Theriogenology* 2000; 53: 11-20.
42. **Horner L, Wolfner M F.** Mechanical stimulation by osmotic and hydrostatic pressure activates *Drosophila* oocytes in vitro - in a calcium dependent manner. *Dev Biol* 2008; 316(1): 100-9.
43. **Ghazi A, Berrier C, Ajouz B, Besnard M.** Mechanosensitive ion channels and their mode of activation. *Biochimie* 1998; 80:357-62.
44. **Krivokharchenko A, Popova E, Zaitseva I, Vil'ianovich L, Ganten D, Bader M.** Development of parthenogenetic rat embryos. *Biol. Reprod* 2003; 68: 829-36.