Archive of SID

Original Article

Evaluating the potential of autologous and allogeneic mice serums in comparison with bovine serum and albumin on oocyte maturation and fertilization in NMRI mice

Shahsavand-Inanloo O[1*], Mohseni-Kouchesfahani H[1], Parivar K[2], Amini E[1], Hadi M[3]

1- Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. Iran.
2- Department of Animal Biology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.
3- Advanced Pharmaceutical Technology Department, Tofigh Daru Research and Engineering Company, I.R. Iran.

Received: 2020/03/2 | Accepted: 2020/10/5

Abstract:

Background: Sera are a multifaceted mixture of growth factors, proteins, and etc. which can influence oocyte maturation and fertilization. The aim of this survey is assessing the effect of different sera on in vitro maturation and fertilization in NMRI mice.

Materials and Methods: In this experimental study, maturation of oocytes was evaluated in α-MEM medium treated with 0 to 20 allogenic and autologous mice serums, Fetal Bovine Serum (FBS) and Bovine Serum Albumin (BSA) after 14-18h incubation period. Then MII oocytes were fertilized with capacitated sperms that percentages of 0 to 20 and investigated fertilization ratio.

Results: In vitro maturation and in vitro fertilization level elevated significantly by adding serum to the culture medium (P<0.05). The most prominent maturation rate was observed in denuded oocytes (DOs) treated with FBS 10% (80%) and cumulus oocyte complex (COCs) treated with BSA 5% (98%) (P<0.001). In addition, the highest fertilization rate was observed in DOs treated with BSA 5% and COCs treated with allogenic serum 15% (77%, 75%), respectively (P<0.001).

Conclusion: The results of this study revealed that although BSA and FBS had better results than allogeneic and autologous sera, therefore, IVF findings in oocyte containing cumulus indicated high capacity of allogenic serum in this process. So, application of allogenic serum can be an appropriate replacement versus animal serum to reduce the challenges of infertility treatment modalities.

Keywords*:* Oocyte maturation, *In vitro* fertilization, Albumin, Autologous, Allogeneic, Mice

***Corresponding Author**
Email: Kouchesfehani@yahoo.com
Tel: 0098 218 607 2709
Fax: 0098 218 607 2709

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2020; Vol. 24, No 5, Pages 481-490

Please cite this article as: Shahsavand-Inanloo O, Mohseni-Kouchesfahani H, Parivar K, Amini E, Hadi M. Evaluating potential of autologous and allogeneic mice serums in comparison with bovine serum and albumin on oocyte maturation and fertilization in NMRI mice. ***Feyz*** 2020; 24(5): 481-90.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

ارزیابی پتانسیل سرم‌های اتولوگ و آلوژنیک موشی در مقایسه با سرم‌های جنین گاوی و آلبومین گاوی بر بلوغ تخمک و لقاح آزمایشگاهی در موش نژاد NMRI

امید شاهسوند اینانلو [۱]، هما محسنی کوچصفهانی [۱*]، کاظم پریور [۲]، الهه امینی [۱]، مهدی هادی [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: سرم‌ها ترکیب پیچیده‌ای از فاکتورهای رشد، پروتئین‌ها و... هستند که ممکن است بر بلوغ تخمک و لقاح تأثیر بگذارند. هدف از این مطالعه، بررسی اثر سرم‌های مختلف بر بلوغ تخمک و لقاح آزمایشگاهی موش نژاد NMRI است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش آزمایشگاهی، بلوغ اووسیت‌های موش در محیط α-MEM با درصدهای ۰ تا ۲۰ از سرم‌های آلوژنیک و اتولوگ موشی، جنین گاوی (FBS) و آلبومین سرم گاوی (BSA)، پس از ۱۴ تا ۱۸ ساعت انکوباسیون، بررسی گردید. سپس اووسیت‌هایی که به مرحله MII رسیدند، با اسپرم ظرفیت‌یافته دارای درصدهای ۰ تا ۲۰ از سرم‌های مختلف لقاح داده شدند و میزان لقاح ارزیابی گردید.

نتایج: میزان بلوغ آزمایشگاهی و لقاح، با افزودن سرم به محیط کشت در همه گروه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). در اووسیت‌های فاقد سلول‌های کومولوسی (Dos) در FBS ۱۰ درصد (۸۰ درصد) و اووسیت‌های دارای سلول‌های کومولوسی (COCs) در BSA ۵ درصد (۹۸ درصد) بیشترین میزان بلوغ مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$). همچنین اووسیت‌های DOs در BSA ۵ درصد و اووسیت‌های COCs در گروه سرم آلوژنیک ۱۵ درصد (به‌ترتیب ۷۵ و ۷۷ درصد)، بیشترین میزان لقاح را داشتند ($P<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: اگرچه BSA و FBS در مقایسه با سرم‌های آلوژنیک و اتولوگ موشی در فرآیند بلوغ تخمک نتایج بهتری داشتند، اما نتایج لقاح در تخمک‌های دارای کومولوس، بیانگر ظرفیت بالای سرم آلوژنیک در این فرآیند است. بنابراین، استفاده از سرم آلوژنیک می‌تواند جایگزین مناسب سرم‌های حیوانی، جهت انجام لقاح آزمایشگاهی باشد تا بخشی از چالش‌های درمان ناباروری کاهش یابد.

واژگان کلیدی: بلوغ تخمک، لقاح آزمایشگاهی، آلبومین، اتولوگ، آلوژنیک، موش

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۵، آذر - دی ۱۳۹۹، صفحات ۴۹۰-۴۸۱

مقدمه

درمان ناباروری، یک موضوع بحث‌برانگیز در حوزه مراقبت‌های بهداشتی است که در مورد ثمربخش بودن این درمان، آسیب دیدن ژنوم مادری، چندقلوزایی و هزینه‌های متعاقب آن شبهاتی وجود دارد [۱]. امروزه مطالعات در زمینه علل ناباروری؛ به‌خصوص به‌خاطر پیشرفت روش‌های جدید، اهمیت زیادی پیدا کرده است و بیولوژی تولیدمثل در حال تکوین و توسعه است. بلوغ تخمک، رویدادی فیزیولوژیک است که برای لقاح موفق و تکوین جنین ضروری است. بلوغ اووسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی (In Vitro Maturation: IVM)، یک تکنولوژی بالقوه ارزشمند برای درمان ناباروری بالینی و روش‌های کمک‌باروری در حیوانات است [۲].

۱. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. گروه تکنولوژی دارویی پیشرفته، شرکت تحقیقاتی و مهندسی توفیق دارو، ایران

* نشانی نویسنده مسؤول:

تهران، خیابان مفتح، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری

تلفن: ۰۲۱۸۶۰۷۲۷۰۹ دورنویس: ۰۲۱۸۶۰۷۲۷۰۹

پست الکترونیک: Kouchesfehani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۷/۱۴

استفاده از این تکنیک، به‌عنوان یک ابزار تحقیقاتی ارزشمند، برای درک فاکتورهایی که به‌طور قابل‌توجهی بر شایستگی تکوینی اووسیت تأثیر می‌گذارند، مورد توجه قرار دارد. در حقیقت مطالعات زیادی در مورد تنظیم شایستگی اووسیت در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است. به‌طور کلی تخمک‌ها در اغلب پستانداران در دوره جنینی وارد مراحل اوّلیه میوز می‌شوند و در مرحله دیپلوتن پروفاز ۱ (مرحله وزیکول ژرمینال) متوقف می‌شوند تا زمانی‌که به تخمک‌گذاری و یا تحلیل رفتن منجر گردند. قبل از شروع مجدد میوز، تخمک، دیپلوئید، اما 4C (دارای ۴ رشته DNA هاپلوئید) است. شروع تقسیم میوز و پیشرفت آن در سن بلوغ، باعث توقف میوز در مرحله متافاز II، جدا شدن اوّلین جسم قطبی و ایجاد DNA مکمل 1n2C می‌شود. نفوذ اسپرم (1n1C)، منجر به جدا شدن دومین جسم قطبی، ایجاد حالت 1n1C در تخمک و تولید جنین دیپلوئید (2n2C) می‌شود که این فرآیند، پس از اوّلین تقسیم میتوزی که به‌دنبال لقاح انجام شده است، رخ می‌دهد [۳]. همچنین به‌نظر می‌رسد که ماکرومولکول‌ها همیشه بخش مهمی از محیط کشت سلولی را به خود اختصاص می‌دهند. مطالعات نشان داده است که اگر به‌جای سرم ترکیباتی نظیر کازئین، عصاره جنین و یا سایر پروتئین‌ها به محیط کشت اضافه گردد، باعث افزایش سرعت رشد سلولی می‌شود. با این‌حال برخی از سلول‌ها در محیط‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

کشت سلولی که فاقد سرم و یا مکمل‌های پروتئینی هستند نیز تکثیر می‌یابند [۵،۴]. در این شرایط اگرچه محیطی که سلول در آن قرار داده شده است، حاوی ماکرومولکول‌ها نیست، اما محیط به‌زودی حاوی ماکرومولکول‌هایی می‌گردد که از سلول‌های زنده یا مرده ترشح می‌شوند. نقش فاکتورهای ماکرومولکولی یا فاکتورهای دیگری که به محیط کشت اضافه می‌شوند و یا فاکتورهایی که سلول‌ها تولید می‌کنند، هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است. به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد که این فاکتورها برای تکثیر و رشد سلول‌ها لازم است [۶]. در حقیقت نقش سرم در محیط کشت سلولی، ممکن است به‌عنوان حامل برای برخی از اجزای دارای وزن مولکولی کم باشد. سرم شامل اجزای پیچیده‌ای، از جمله فاکتورهای رشد، اسیدهای آمینه و ترکیبات دیگر است. سرم از اجزای مختلف با وزن مولکولی متفاوت تشکیل شده است که ممکن است بر بلوغ تخمک تأثیر بگذارند. اگرچه هنوز مشخص نشده است که کدام جزء سرم بر بلوغ اووسیت تأثیر می‌گذارد، اما نشان داده شده است که برخی از اجزای آن دارای عملکرد مهاری بر تکوین جنین هستند [۷]. بنابراین هنوز به‌طور دقیق مشخص نیست که کدام مولکول سرم، نقش مهمی را در محیط IVM طی بلوغ آزمایشگاهی اووسیت برعهده دارد. علاوه بر این گزارش شده است که Bovine BSA) (Serum Albomin فاقد اسید چرب، ممکن است مکمل مطلوبی در محیط IVM به‌دلیل میزان بالای رونوشت ژن‌های کدکننده فاکتور رشد، همراه با میزان پایین رونوشت پروتئین شوک حرارتی Hsp-70 در مقایسه با BSA باشد [۴،۸]. در حقیقت در محیط IVM طراحی‌شده حاوی گنادوتروپین‌ها (FSH و LH)، می‌توان سرم را با پلی وینیل پیرولیدون جایگزین کرد و هنگامی‌که در محیط IVM، به‌عنوان جایگزین سرم از PVP ۳ درصد سرم، استفاده شد، نشان داده شد که باعث کاهش قطعه‌قطعه شدن DNA اووسیت می‌شود [۱۰،۹]. بنابراین هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر سرم‌های مختلف جنین گاوی، آلبومین گاوی و سرم اتولوگ و آلوژنیک موشی با دوزهای مختلف بر روی بلوغ تخمک و لقاح آزمایشگاهی موش NMRI می‌باشد.

مواد و روش‌ها

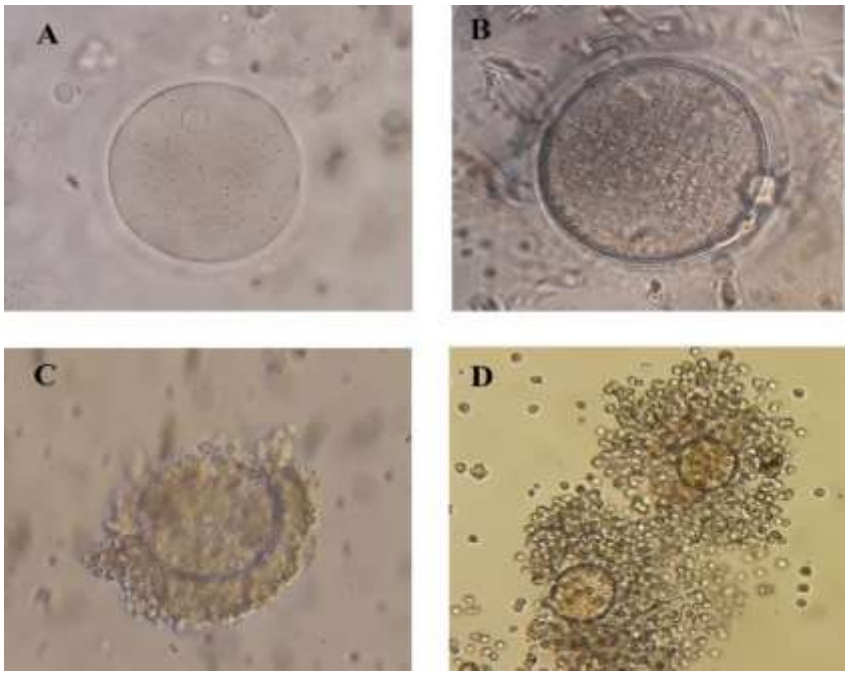
در این آزمایش که از نوع تجربی است، از موش‌های ماده ۸-۶ هفته‌ای نژاد NMRI استفاده شد. علت انتخاب این حیوان، وجود شباهت‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی و تولیدمثلی آن با انسان، سادگی و سرعت تکثیر و سهولت در نگهداری و پرورش بود. محل نگهداری حیوانات در حیوان‌خانه‌ای واقع در دانشگاه خوارزمی تهران با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. در تمام طول دوره تحقیق، براساس موازین کمیته اخلاق دانشگاه (کد اخلاق ۹۶/۱۴۵۸۰)، آب و غذای کافی در دسترس حیوانات قرار داده شد و موش‌های نر به‌طور جداگانه در قفس نگهداری شدند. در این تحقیق ۴۸-۴۴ ساعت پس از تزریق درون‌صفاقی ۷/۵ واحد PMSG، موش‌ها به‌وسیله داروی بیهوشی کتامین و زایلازین (۰/۱ml/۲۰g =kg/ ۱۲/۵mg xylazine و kg/ ۸۷/۵mg ketamine) بیهوش شدند و پس از خون‌گیری از قلب موش (جهت تهیه سرم آلوژنیک و اتولوگ)، تخمدان‌ها به محیط تشریح حاوی محیط کشت α-MEM انتقال داده شدند. سپس با کمک یک سوزن انسولین، تخمدان به عمق ظرف بریده و نزدیک محل متورم‌شده ثابت نگه داشته شد. در مرحله بعد، با کمک یک سوزن انسولین دیگر تخمدان تکه‌تکه شد. با انجام این عمل، توده سلول‌های کومولوس حاوی تخمک و نیز تخمک‌های فاقد سلول‌های کومولوسی از تخمدان خارج شدند [۱۱]. جهت جداسازی سرم اتوژنیک و آلوژنیک، به‌وسیله سرنگ از بطن چپ قلب موش خون‌گیری صورت گرفت. خون به یک میکروتیوپ منتقل شد و مایع رویی سانتریفیوژ جدا شد و به‌وسیله فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون فیلتر گردید. در مورد سرم آلوژنیک، بخش رویی به بن‌ماری و در دمای ۵۶°C به مدت ۱ ساعت انتقال یافت تا اجزای کمپلمان آن غیرفعال گردد. تخمک‌های COCs و DOs جمع‌آوری گردیدند و پس از شستشو به محیط کشت α-MEM از پیش انکوبه‌شده که با روغن معدنی پوشیده شده بود، انتقال داده شدند. این محیط (فاقد سرم) به‌عنوان گروه کنترل و محیط‌های تیمارشده با FBS، BSA و آلوژنیک و اتولوگ موشی (با غلظت‌های ۰،۵،۱۰،۱۵،۲۰ درصد) به‌عنوان گروه تجربی در نظر گرفته شدند. تخمک‌های کشت‌شده پس از ۱۴ تا ۱۸ ساعت انکوباسیون با کمک میکروسکوپ معکوس مورد مطالعه قرار گرفتند و تغییرات مورفولوژی در هسته، با آزاد شدن اوّلین جسم قطبی (متافاز II) که به‌عنوان معیاری برای بلوغ هسته‌ای تخمک‌های نابالغ محسوب می‌شود، مورد توجه قرار گرفت. همچنین این تخمک‌ها برای لقاح آزمایشگاهی استفاده شدند و پس از این‌که اسپرم‌های استخراج‌شده از دم اپیدیدیم موش نر بالغ ۸ تا ۱۰ هفته‌ای به مدت ۱ ساعت در محیط کشت EmbryoCul جهت ظرفیت‌یابی انکوبه شدند، با تعداد ۱×۱۰^{۶} در مجاورت اووسیت‌های بالغ در محیط کشت EmbryoCul جهت IVF قرار گرفتند. پس از ۴ تا ۶ ساعت انکوباسیون، تخمک‌های لقاح‌یافته از محیط کشت خارج شدند و در محیط کشت تیمارشده با FBS، BSA و آلوژنیک و اتولوگ موشی (با غلظت‌های ۲۰-۰ درصد) قرار گرفتند. در این آزمایش، میزان بلوغ اووسیت‌ها، براساس تشکیل جسم قطبی اوّل و یا گسترش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

سلول‌های کومولوسی ارزیابی شد. همچنین میزان لقاح با تشکیل جسم قطبی دوم مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل شماره ۱- مقایسه بلوغ در DO و COCs؛ A) اووسیت فاقد سلول‌های کومولوسی نابالغ که هسته و یا به‌اصطلاح GV آن قابل مشاهده می‌باشد [۴۰۰×]، B) اووسیت فاقد سلول‌های کومولوسی بالغ که جسم قطبی اوّل آن در سمت راست تصویر قابل مشاهده است [۴۰۰×]، C) اووسیت دارای سلول‌های کومولوسی متراکم و نابالغ که هسته در وسط اووسیت به سختی قابل مشاهده می‌باشد [۴۰۰×]، D) اووسیت دارای سلول‌های کومولوسی گسترش‌یافته و بالغ که جسم قطبی اوّل آن قابل مشاهده نیست [۱۰۰×]).

سپس نتایج حاصل از تأثیر سرم‌های مختلف و گروه کنترل در میزان بلوغ و لقاح آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۴ و روش ANOVA one-way و آزمون توکی تحلیل شدند و سطح $P<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی در نظر گرفته شد.

نتایج

اووسیت‌های فاقد سلول‌های کومولوسی (Denuded oocytes) و اووسیت‌های دارای سلول‌های کومولوسی (Complex oocyte cumulus cells)، از تخمدان موش‌هایی که حدود ۴۸-۴۴ ساعت از تزریق PMSG آن‌ها گذشته بود، جمع‌آوری و به‌طور تصادفی در میان گروه‌ها و زیرگروها تقسیم شدند و به مدت ۱۸-۱۴ ساعت در محیط IVM که شامل ۴ درصد متفاوت از FBS، BSA، آلوژنیک و اتولوگ موشی بود، انکوبه گردیدند. سپس درصد آزادسازی جسم قطبی اوّل در آن‌ها بررسی گردید. قابل ذکر است که بلوغ در COCs براساس میزان گسترش سلول‌های کومولوسی و در DOs براساس آزاد شدن جسم قطبی اوّل (Polar Body) بررسی شد (شکل شماره ۱). یافته‌های این پژوهش نشان داد که درصد بلوغ تخمک و لقاح آزمایشگاهی در همه گروه‌های تحت تیمار با سرم‌های مختلف به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل (فاقد سرم) بیشتر بود. ارزیابی میزان بلوغ COCs نشان داد که در گروه کنترل، میزان بلوغ آزمایشگاهی نسبت به سایر گروه‌ها دارای کمترین مقدار است (۲۷ درصد). به‌علاوه میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه تیمار با FBS (به ترتیب از ۵ تا ۲۰ درصد) از چپ به راست ۶۵،۹۲،۸۷،۸۰ درصد و در گروه تیماری BSA نیز به ترتیب ۹۸،۷۷،۷۴،۷۲ درصد مشاهده شد؛ این در حالی است که میزان بلوغ در گروه‌های تیماری آلوژنیک و اتولوگ موشی به ترتیب از چپ به راست ۷۹،۶۹،۶۶،۴۱ درصد و ۴۲،۴۷،۴۸،۵۵ درصد بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که بیشترین میزان بلوغ تخمک در تخمک‌های دارای سلول‌های کومولوس با به‌کارگیری سرم FBS به میزان ۱۰ درصد و BSA به میزان ۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل قابل مشاهده است ($P<۰/۰۰۱$) (جدول شماره ۱). بلوغ DOs در این مطالعه نشان داد که میزان بلوغ در گروه کنترل (فاقد سرم) نسبت به سایر گروه‌ها دارای کمترین میزان است (۲۱ درصد). به‌علاوه میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه تیماری FBS از ۵ تا ۲۰ درصد از چپ به راست ۴۶،۸۰،۷۰،۶۹ درصد و

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

در گروه تیماری BSA نیز ۷۶،۶۵،۶۰،۵۰ درصد مشاهده شد؛ همچنین این میزان در گروه‌های تیماری آلوژنیک و اتولوگ موشی به‌ترتیب ۴۱،۴۶،۵۳،۵۵ درصد و ۳۱،۳۷،۳۹،۴۰ درصد می‌باشد. بنابراین همان‌طور که در جدول قابل مشاهده است، FBS (۱۰ درصد) و پس از آن BSA (۵ درصد) با معنی‌داری ($P<۰/۰۰۱$) بیشترین میزان بلوغ آزمایشگاهی را در تخمک‌های فاقد کومولوس در مقایسه با گروه کنترل به خود اختصاص داده‌اند) (جدول شماره ۱). میزان لقاح آزمایشگاهی COCs در این مطالعه نشان داد که در گروه کنترل (۳۰ درصد) نسبت به سایر گروه‌ها، لقاح دارای کمترین میزان است که نشان‌دهنده مفید بودن حضور سرم در محیط کشت IVF است. در نتیجه میزان لقاح آزمایشگاهی در گروه تیماری FBS از ۰ تا ۲۰ درصد از چپ به راست ۴۷،۷۲،۶۳،۶۳ درصد و در گروه تیماری BSA به ترتیب ۵۶،۵۰،۴۳،۳۸ درصد مشاهده شد؛ در گروه‌های تیماری آلوژنیک و اتولوگ موشی نیز میزان لقاح به ترتیب ۵۲،۵۴،۷۵،۶۷ درصد و ۳۷،۴۳،۵۰،۵۰ درصد مشاهده شد. همان‌طور که داده‌ها نشان می‌دهد، بیشترین میزان لقاح آزمایشگاهی در گروه تیمار با سرم آلوژنیک ۱۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود ($P<۰/۰۰۱$) (جدول شماره ۲). لقاح آزمایشگاهی DOs نیز نشان داد که لقاح در گروه کنترل (۲۷ درصد) نسبت به سایر گروه‌ها کمترین میزان را نشان می‌دهد. به‌علاوه میزان لقاح آزمایشگاهی در گروه تیماری FBS (از ۰ تا ۲۰ درصد) از چپ به راست ۴۹،۵۵،۵۹،۷۵ درصد و در گروه تیماری BSA نیز به ترتیب ۷۷،۶۰،۵۹،۴۱ درصد دیده شد؛ این در حالی است که در گروه‌های تیماری آلوژنیک و اتولوگ موشی، به‌ترتیب میزان لقاح ۴۲،۵۷،۶۳،۷۰ درصد و ۵۰،۵۷،۶۴،۵۸ درصد مشاهده شد. داده‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در تخمک‌های فاقد کومولوس نشان می‌دهد که میزان لقاح در تمامی گروه‌ها نسبت به کنترل با اختلاف ($P<۰/۰۵$) معنی‌دار است؛ اما بیشترین اختلاف معنی‌دار در گروه تیمار با BSA ۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود ($P<۰/۰۰۱$) (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱- مقایسه درصد بلوغ تخمک در موش سوری گروه‌های تیمارشده با سرم‌های FBS, BSA و آلوژنیک و اتولوگ موشی با دوزهای مختلف (۵ تا ۲۰ درصد) و مقایسه با گروه کنترل (فاقد سرم)

گروه آزمایش	درصد سرم	DOs	COCs	MII (درصد)		معنی‌داری	
FBS	۵	۱۴۲	۱۲۷	(۴۶)	(٪۶۵)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
	۱۰	۱۵۵	۱۳۲	(۸۰)	(۹۲)	$P\leq۰/۰۰۱$	$P\leq۰/۰۰۱$
	۱۵	۱۴۷	۱۳۱	(۷۰)	(٪۸۷)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
	۲۰	۱۴۵	۱۴۰	(۶۹)	(٪۸۰)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
BSA	۵	۱۵۸	۱۳۴	(۷۶)	(٪۹۸)	$P\leq۰/۰۰۱$	$P\leq۰/۰۰۱$
	۱۰	۱۴۷	۱۲۶	(۶۵)	(٪۷۷)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
	۱۵	۱۴۷	۱۳۱	(۶۰)	(٪۷۴)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
	۲۰	۱۴۹	۱۳۴	(۵۰)	(٪۷۲)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
Allogenic	۵	۱۴۴	۱۴۲	(۴۱)	(٪۷۹)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
	۱۰	۱۴۵	۱۳۴	(٪۴۶)	(٪۶۹)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
	۱۵	۱۵۲	۱۴۱	(۵۳)	(٪۶۶)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
	۲۰	۱۴۰	۱۳۷	(۵۵)	(٪۴۱)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
Autologous	۵	۱۵۲	۱۳۲	(۳۱)	(٪۴۲)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
	۱۰	۱۳۹	۱۳۰	(۳۷)	(٪۴۷)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
	۱۵	۱۴۸	۱۳۳	(۳۹)	(٪۴۸)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
	۲۰	۱۴۵	۱۳۸	(۴۰)	(٪۵۵)	$P\leq۰/۰۵$	$P\leq۰/۰۵$
فاقد سرم (گروه کنترل)	۰	۱۴۰	۱۳۷	(۲۱)	(٪۲۷)		

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

جدول شماره ۲- مقایسه درصد لقاح آزمایشگاهی در موش سوری گروه‌های تیمارشده با سرم‌های FBS, BSA و آلوژنیک و اتولوگ موشی با دوزهای مختلف (۵ تا ۲۰ درصد) و مقایسه با گروه کنترل (فاقد سرم)

گروه آزمایش	درصد سرم	DOs	COCs	جسم قطبی دوم (درصد)		معنی‌داری	
FBS	۵	۱۴۲	۱۲۷	(۴۹)	(۴۷)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
	۱۰	۱۵۵	۱۳۲	(۵۵)	(۶۳)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
	۱۵	۱۴۷	۱۳۱	(۵۹)	(۶۳)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
	۲۰	۱۴۵	۱۴۰	(۷۵)	(۶۳)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
BSA	۵	۱۵۸	۱۳۴	(۷۷)	(۵۶)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
	۱۰	۱۴۷	۱۲۶	(۶۰)	(۵۰)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
	۱۵	۱۴۷	۱۳۱	(۵۹)	(۴۳)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
	۲۰	۱۴۹	۱۳۴	(۴۱)	(۳۸)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
Allogenic	۵	۱۴۴	۱۴۲	(۴۲)	(۵۲)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
	۱۰	۱۴۵	۱۳۴	(۵۷)	(۵۴)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
	۱۵	۱۵۲	۱۴۱	(۶۳)	(۷۵)	$P\leq$۰/۰۰۱	$P\leq$۰/۰۵
	۲۰	۱۴۰	۱۳۷	(۷۰)	(۶۷)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
Autologous	۵	۱۵۲	۱۳۲	(۵۰)	(۳۷)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
	۱۰	۱۳۹	۱۳۰	(۵۷)	(۴۳)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
	۱۵	۱۴۸	۱۳۳	(۶۴)	(۵۰)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
	۲۰	۱۴۵	۱۳۸	(۵۸)	(۵۰)	$P\leq$۰/۰۵	$P\leq$۰/۰۵
فاقد سرم (گروه کنترل)	۰	۱۴۰	۱۳۷	(۲۷)	(۳۰)		

بحث

مطالعات محدودی در مورد اثر انواع سرم‌های مختلف افزوده‌شده به محیط کشت در مراحل گوناگون بلوغ تخمک، لقاح آزمایشگاهی و تکامل بعدی تخمک وجود دارد. در اکثر مطالعات IVM اووسیت‌های حیوانی، محیط پایه با انواع مختلف سرم، کامل می‌شود. معمولاً سرم به‌عنوان مکمل برای محیط کشت سلولی به‌کار می‌رود و حاوی تعدادی از فاکتورهای رشد است که نقش مهمی در تنظیم بلوغ اووسیت دارند؛ به‌علاوه اثر مفید سرم ممکن است به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی این ماده باشد. کارکرد اصلی سرم، فراهم کردن فاکتورهای هورمونی است که باعث تحریک رشد و تکثیر سلول‌ها می‌گردد؛ مطالعات نشان داده است که سرم باعث افزایش عملکرد تمایزی، افزایش پروتئین‌های انتقال‌دهنده هورمون‌ها، انتقال عناصر معدنی، لیپیدها، فاکتورهای ضمیمه‌کننده و منتشرکننده و عوامل تثبیت‌کننده می‌شود [۱۳،۱۲]. در مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد که افزودن FBS و BSA در مقایسه با سرم‌های آلوژنیک و اتولوگ اثرات بهتری بر بلوغ تخمک دارد؛ زیرا FBS و BSA حاوی هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، ویتامین‌ها، پپتیدها، پروتئین‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدان است که به بهبود فرآیندهای فولیکولی کمک می‌کند. FBS می‌تواند به‌عنوان محرک تکثیر سلولی و با دارا بودن اجزایی مانند هورمون‌ها، ویتامین‌ها، پروتئین‌های انتقال‌دهنده، ضمیمه‌کننده، منتشرکننده و فاکتورهای رشد به محیط کشت اضافه شود [۱۲]. این مطالعه نشان داد که به‌طور کلی، بلوغ و لقاح COCs در مقایسه با DOc از نتایج بهتری برخوردار هستند. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های کومولوسی نقش مهمی در بلوغ اووسیت، از جمله حفظ توقف میوز، القای از سرگیری میوز و بلوغ سیتوپلاسمی ایفا می‌کنند. این عملکردها به اتصالات شکاف‌دار و توانایی‌های متابولیکی خاص آن‌ها مربوط می‌شود. همچنین ارتباط فیزیکی بین اووسیت و سلول‌های کومولوسی برای انتقال مواد مغذی و فاکتورهای ضروری در رشد اووسیت لازم است. مطالعات نشان داده‌اند که فاکتورهای مترشحه از سلول‌های کومولوسی، مانع از سخت شدن زونا پلوسیدا می‌گردند. علاوه بر این حتی سلول‌های کومولوسی جداشده، با تولید فاکتورهای پاراکراین باعث از سرگیری میوز در اووسیت‌های فاقد سلول‌های کومولوسی می‌شوند [۱۴]. ترشح گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفاته و هیالورونیک اسید توسط سلول‌های کومولوسی، باعث شکل‌گیری ماتریکس موکوسی بین و اطراف سلول‌های کومولوسی می‌شود که تسریع‌کننده واکنش آکروزومی اسپرماتوزوآ است [۱۵]. اثرات سلول‌های کومولوسی بر بلوغ و لقاح آزمایشگاهی اووسیت در گونه‌های مختلف گزارش شده است [۱۷،۱۶]. Nishi و همکارانش بر روی اووسیت‌های GV موش مطالعه انجام دادند و گزارش کردند که میزان بلوغ و لقاح آزمایشگاهی در اووسیت‌های فاقد سلول‌های کومولوسی به‌ترتیب از راست به چپ ۶۴/۴ و ۵۱/۷ درصد است که به‌طور معنی‌داری کمتر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

از اووسیت‌های دارای سلول‌های کومولوسی (به ترتیب از راست به چپ ۷۶/۴ و ۷۰/۵) است [۱۸]. از سوی دیگر Aono و همکارانش با مطالعه بر روی اووسیت‌های GV موشی گزارش کردند که بلوغ و میزان تسهیم (میزان لقاح) اووسیت‌های دارای سلول‌های کومولوسی به ترتیب ۹۰/۲ و ۹۴/۱ بود [۱۹]. تأثیر مثبت سلول‌های کومولوسی بر بلوغ اووسیت‌های انسان توسط Santiquet و همکارانش [۳]، در خرگوش و گاو توسط Del Collado و همکارانش و نیز Tao و همکارانش [۲۱،۲۰] و در موش توسط Choi و همکارانش [۲۲] گزارش شده است. Honari Chatroudi و همکاران در ۲۰۱۹ اثرات فاکتور تمایزی رشد ۹ یا GDF9 و محیط غنی‌شده سلول‌های کومولوسی را بر روی نسبت شکل‌گیری جنین و بقاء بلاستوسیست‌های انسانی ارزیابی کردند و دریافتند که غنی‌سازی محیط کشت بلوغ اووسیت با GDF9 و سلول‌های کومولوسی، افزایش‌دهنده میزان لقاح و بقای بلاستوسیست در جنین‌هاست [۱۷]. نتایج این گزارشات، مطالعه حاضر را تأیید کردند و نشان دادند که میزان بلوغ و لقاح اووسیت‌های دارای سلول‌های کومولوسی، بیشتر از اووسیت‌های فاقد سلول‌های کومولوسی است. تاکنون مطالعات اندکی بر روی تأثیر سرم‌های مختلف بر بلوغ اووسیت در موش سوری صورت گرفته است. گزارش‌های مختلف، بیانگر نتایج متفاوت و یا متناقض از اثر سرم‌های مورد استفاده در محیط کشت تخمک می‌باشد [۲۳،۴]. در گزارش تاجیک و همکاران، بررسی تأثیر محیط‌های کشت مختلف بر روی بلوغ تخمک‌های بز نشان داد که بلوغ تخمک‌ها در محیط‌های حاوی سرم جنین گاوی، سرم میش فحل (ESS) و سرم بز فحل (GSS)، اختلاف معنی‌داری نداشت؛ اما در مقایسه با محیط کشت بدون سرم، میزان بلوغ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که در مقایسه با پژوهش حاضر، بیانگر تأثیر مثبت سرم‌های مختلف بر فرآیند بلوغ تخمک است [۲۴]. در مقابل، کرمی شبانکاره و همکاران نیز در مورد تأثیر محیط‌های کشت بلوغ اووسیت تحقیق کردند و نشان دادند که سرم یائسگی انسانی و سرم دوره استروس گوسفند و بز در مقایسه با سرم مایع فولیکولی گاوی، میزان بلوغ تخمک، لقاح آزمایشگاهی و تکوین جنینی بالاتری داشتند [۲۵]. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان بلوغ تخمک در گروه کنترل (فاقد سرم) در مقایسه با گروه‌های حاوی سرم، از نظر آماری به‌طور معنی‌داری کمتر بوده است که مؤید تحقیقات سایر محققان مبنی بر تأثیر مثبت سرم در فرآیند کشت و بلوغ اووسیت می‌باشد. در بررسی اثر سرم‌های مختلف بر IVM، بیشترین توان تشکیل متافاز II در DOs در گروه تیماری با غلظت ۱۰ درصد از FBS (۸۰ درصد) مشاهده گردید؛ در حالی‌که در بین سایر درصدهای FBS توان تشکیل متافاز II کمتر بود و افزایش غلظت FBS به میزان ۲۰ درصد، بر بلوغ تخمک اثرات منفی داشت و باعث کاهش توان تشکیل متافاز II گردید. Sena-Netto و همکاران در ۲۰۱۹ گزارش کردند که جایگزینی FBS با BSA در طی بلوغ اووسیت و کشت جنین، کیفیت بلاستوسیست را افزایش نمی‌دهد [۲۶]. یکی از علل تأثیر مثبت FBS بر بلوغ تخمک؛ ساختار خاص جفت، ممانعت از عبور ایمنوگلوبولین‌ها از خون مادر به جنین، عدم حضور فاکتورهای فعال‌کننده کمپلمان و میزان بالای فیتوئین است که با دارا بودن عملکرد آنتی‌پروتئازی، مانع از سخت شدن زوناپلوسیدا می‌شود. همچنین از بین غلظت‌های مختلف، FBS ده درصد بهترین نتیجه را در تکوین اووسیت نشان می‌دهد. در بررسی اثر BSA بر IVM، بیشترین توان تشکیل متافاز II در COCs در گروه تیماری با غلظت ۵ درصد از BSA (۹۸ درصد) مشاهده گردید که معنی‌داری قابل‌توجهی نسبت به گروه کنترل ($P<۰/۰۰۱$) داشت؛ در حالی‌که با افزایش غلظت سرم این توان کاهش یافت. این یافته‌ها بیانگر تأثیر منفی افزایش غلظت BSA بر بلوغ تخمک است. همچنین مطالعات نشان داده است که BSA حاوی میزان کمی لیپید در مقایسه با FBS است که با تغییر در دینامیک میتوکندری و کاهش لیپید باعث کمتر شدن بلوغ اووسیت و تکوین آن می‌شود [۲۷]. در مورد سرم‌های اتولوگ و آلوژنیک باید گفت که سرم آلوژنیک موشی با غلظت ۵ درصد بیشترین توان تشکیل متافاز II را به میزان ۷۹ درصد، در COCs و با غلظت ۲۰ درصد بیشترین توان تشکیل متافاز II را به میزان ۵۵ درصد در DOs نشان داد. به‌علاوه در گروه‌های تحت تیمار با سرم اتولوگ موشی، این سرم در غلظت ۲۰ درصد بیشترین توان تشکیل متافاز II را به میزان ۵۵ درصد در COC و ۴۰ درصد در DOs نشان داد. این نتایج بیانگر تأثیر مثبت سرم‌های یک گونه بر فرآیند بلوغ تخمک همان گونه است که خطر آلودگی با سرم‌های گونه‌های مختلف را کاهش می‌دهد. از طرفی نتایج این پژوهش نشان داد، گروه‌های BSA و FBS در زمینه تخمک‌های فاقد کومولوس و سرم آلوژنیک نسبت به تخمک‌های دارای سلول‌های کومولوسی بیشترین نقش را در پیشبرد فرآیند لقاح آزمایشگاهی برعهده داشتند. در بررسی اثر سرم‌های مختلف بر فرآیند IVF، غلظت ۱۵ درصد سرم آلوژنیک در COCs بیشترین میزان تشکیل جسم قطبی دوم (۷۴ درصد) و غلظت ۱۵ و ۲۰ درصد سرم اتولوگ کمترین میزان تشکیل جسم قطبی دوم را به خود اختصاص دادند. علاوه بر این در بررسی فرآیند IVF در سلول‌های فاقد کومولوس مشاهده شد که بیشترین میزان تشکیل جسم قطبی دوم در غلظت ۵ درصد از BSA (۷۷ درصد) و کمترین میزان تشکیل جسم قطبی دوم در غلظت ۱۵ درصد از سرم اتولوگ (۶۴ درصد) می‌باشد. این یعنی در گروه‌های فاقد

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

سلول‌های کومولوس و دارای سلول‌های کومولوس به‌ترتیب BSA ۵ درصد و سرم آلوژنیک ۱۵ درصد، بیشترین تأثیر و گروه تحت تیمار با سرم اتولوگ ۱۵ درصد کمترین تأثیر را در پیشبرد فرآیند لقاح آزمایشگاهی داشته‌اند. Sreenivas و همکارانش در سال ۲۰۱۳ با بررسی اثر FBS (۱۰ درصد)، BSA (۵mg/ml) و پپتون گندم (۰/۱۸ mg/ml) بر بلوغ، لقاح و تکوین اووسیت‌های گوسفند نشان دادند که میزان بلوغ و لقاح آزمایشگاهی در FBS (به‌ترتیب از راست به چپ؛ ۸۹/۳۲ درصد و ۷۵ درصد) در مقایسه با BSA (به‌ترتیب از راست به چپ؛ ۸۰/۱۰ درصد و ۵۲/۸۷ درصد) و پپتون گندم (به‌ترتیب از راست به چپ؛ ۵۴/۲۷ درصد و ۴۴/۴۴ درصد) بیشتر بود. در حالی‌که در تشکیل دو سلولی و چهار سلولی، میزان BSA (به‌ترتیب از راست به چپ ۷۴/۲۲ درصد و ۶۰/۹۳ درصد) در مقایسه با FBS (۷۳/۵۸ درصد و ۵۸/۷۷ درصد) و پپتون گندم (۷۲/۸۹ درصد و ۵۷/۰۱ درصد) بیشتر است [۲۸]. Puri و همکارانش در سال ۲۰۱۵ با بررسی اثر سرم استروس بوفالو و سرم جنین گاوی (EBS و FBS)، بر بلوغ اووسیت‌های بوفالو *(Bubalus bubalis)* بیان کردند که سرم FBS در مقایسه با EBS (سرم آلوژنیک) میزان بلوغ آزمایشگاهی بیشتری (۸۳/۸۰ درصد) در مقایسه با (۷۷/۴۵ درصد) EBS نشان می‌دهد [۲۹]. Abdel-Wahab و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثر سرم گاو تازه متولدشده ۱۰ درصد را در مقایسه با سرم گوساله جنینی بر روی بلوغ اووسیت و میزان تکوین مورولا و بلاستولا مطالعه کردند و دریافتند که سرم گاو تازه متولدشده قادر است ماکرومولکول‌های مؤثرتری را در مقایسه با سرم گوساله جنینی به محیط کشت وارد نماید و باعث بهبود شرایط کشت و بلوغ آزمایشگاهی اووسیت شود [۳۰]. محققان در سال ۲۰۱۹ در پژوهشی، از BSA و PVA به‌عنوان جایگزین FCS برای بلوغ تخمک شتر در شرایط آزمایشگاهی استفاده کردند و نشان دادند که BSA به‌تنهایی یا در ترکیب با FCS در مقایسه با ترکیب FCS و PVA باعث کاهش بلوغ هسته‌ای می‌شود و میزان ناهنجاری کروموزومی بیشتری نیز نشان می‌دهد. نتایج مطالعه این محققان نشان داد که ترکیبات مکمل در محیط کشت IVM نقش بسزایی در فرآیند بلوغ تخمک دارند [۳۱].

محققان در رابطه با سرم اتولوگ نشان دادند که ترکیبات مختلفی، همچون ویتامین A، فاکتور رشد شبه انسولین، آلفا دو ماکروگلوبولین و ایمنوگلوبولین در این سرم وجود دارد که آن را گزینه مناسبی برای مکمل کشت اووسیت معرفی می‌کند [۳۲]. از طرفی، Arpornmaeklong و همکاران گزارش کردند که ترکیبات سرم آلوژنیک می‌تواند در زمینه سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، به‌عنوان جایگزین مناسبی برای FBS در نظر گرفته شود. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که سرم آلوژنیک در مقایسه با سرم‌های اتولوگ، سرم‌های جنینی گاوی و آلبومین سرم گاوی اثر مهمی در بلوغ تخمک و لقاح آزمایشگاهی موش دارد که با نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر مبنی بر کارایی سرم آلوژنیک همسوست [۳۳]. با این وجود مواد مؤثر سرم‌ها هنوز به‌طور دقیق شناخته نشده است و نقش عملکردی سرم آلوژنیک در حمایت از بلوغ و باروری اووسیت نیاز به ارزیابی مولکولی دارد.

نتیجه‌گیری

از مجموع یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از سرم آلوژنیک موش در مرحله استروس به‌علت کوتاه‌بودن طول دوره استروس، دسترسی آسان، مقرون به‌صرفه بودن و این نکته که در هر سیکل جنسی چندین تخمک آزاد می‌کند و احتمالاً حاوی مقدار قابل‌توجهی از هورمون‌ها، پروتئین‌ها و عوامل رشد می‌باشد، برای کشت آزمایشگاهی، بلوغ تخمک و لقاح آزمایشگاهی مناسب به‌نظر می‌رسد. با توجه به مشکلات استفاده از سرم‌های حیوانی در موارد بالینی، داده‌های به‌دست‌آمده بیانگر پتانسیل سرم آلوژنیک در فرآیند لقاح آزمایشگاهی است. از این‌رو، پیشنهاد می‌شود سایر محققان پس از انجام آنالیز ترکیبات سرم آلوژنیک انسانی، اثر این سرم را در فرآیند بلوغ تخمک و لقاح آزمایشگاهی انسانی مورد ارزیابی قرار دهند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از ریاست محترم دانشکده علوم زیستی و پرسنل آزمایشگاه مرکزی دانشگاه خوارزمی که در انجام این پروژه یاریگر ما بودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

[1] Borght VM, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. ***Clin Biochem*** 2018; 62(1): 2-10.

[2] Yang ZY, Chian RC. Development of in vitro maturation techniques for clinical applications. ***Fertil Steril*** 2017; 108(4): 577-84.

[3] Santiquet NW, Greene AF, Becker J, Barfield JP, Schoolcraft WB, Krisher RL. A pre-in vitro maturation medium containing cumulus oocyte complex ligand-receptor signaling molecules maintains meiotic arrest, supports the cumulus oocyte complex and improves oocyte developmental competence. ***Mol Hum Reprod*** 2017; 23(9): 594-606.

[4] Brązert M, Kranc W, Nawrocki MJ, Sujka-Kordowska P, Konwerska A, Jankowski M, et al.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

New markers for regulation of transcription and macromolecule metabolic process in porcine oocytes during in vitro maturation. ***Mol Med Rep*** 2020; 21(3): 1537-51.
[5] Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. ***Reprod Med Biol*** 2017; 16(2): 99–117.
[6] Rezaei M, Zarkesh-Esfahani SH, Gharagozloo M. The effect of different media composition and temperatures on the production of recombinant human growth hormone by CHO cells. ***Res Pharma Sci*** 2013; 8(3): 211–17.
[7] Piletz JE, Drivon J, Eisenga J, Buck W, Yen S, McLin M, et al. Human Cells Grown With or Without Substitutes for Fetal Bovine Serum. ***Cell Med*** 2018; 1-11.
[8] Karmaker S, Apu A, Hoque SA, Khandoker M. Effect of supplementation of BSA on in vitro maturation and fertilization of Black Bengal goat oocytes. ***FAA*** 2020; 5(2): 216-23.
[9] Sreenivas D, Kaladhar DS, Samy AP, Kumar RS. Understanding mechanism of in vitro maturation, fertilization and culture of sheep embryoes through in silico analysis. ***Bioinformation*** 2012; 8(21): 1030-34.
[10] Räty M, Ketoja E, Pitkänen T, Ahola V, Kananen K, Peippo J. In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. ***Cryobiology*** 2011; 63(3): 245-55.
[11] Tavana S, Eimani H, Azarnia M, Shahverdi A, Eftekhari-Yazdi P. Effects of Saffron (Crocus sativus L.) Aqueous Extract on In vitro Maturation, Fertilization and Embryo Development of Mouse Oocytes. ***Cell J*** 2012; 13(4): 259-64.
[12] Shirasawa H, Terada Y. In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation and research material. ***Reprod Med Biol*** 2017;16(3): 258-67.
[13] Mardomi A, Nouri M, Farzadi L, Zarghami N, Mehdizadeh A, Yousefi M, et al. Human charcoal-stripped serum supplementation enhances both the stearoyl-coenzyme a desaturase 1 activity of cumulus cells and the in vitro maturation of oocytes. ***Hum Fertil*** 2019; 22(3): 212-18.
[14] Tahajjodi SS, Farashahi Yazd E, Agha-Rahimi A, Aflatoonian R, Khalili MA, Mohammadi M, Aflatoonian B. Biological and physiological characteristics of human cumulus cells in adherent culture condition. ***Int J Reprod Biomed*** 2020; 18(1): 1-10.
[15] Deneke Y, Singh Yadav P, Deb R, Nanda T. Comparative studies of the effects of BSA versus FCS as a supplement in TCM-199 on the in vitro maturation rate of Buffalo oocytes collected from slaughterhouse ovaries. ***Buffalo Bull*** 2013; 32(1): 21-5.
[16] Dhali A, Javvaji PK, Kolte AP, Francis JR, Roy SC, Sejian V. Temporal expression of cumulus cell marker genes during in vitro maturation and oocyte developmental competence. ***J Assist Reprod Genet.*** 2017; 34(11): 1493–500.
[17] Honari Chatroudi M, Khalili MA, Ashourzadeh S, Anbari F, Shahedi A, Safari S. Growth differentiation factor 9 and cumulus cell supplementation in in vitro maturation culture media enhances the viability of human blastocysts. ***Clin Exp Reprod Med*** 2019; 46(4): 166–72.
[18] Nishi Y, Takeshita T, Sato K, Araki T. Change of the Mitochondrial Distribution in Mouse OoplasmDuring In Vitro Maturation. ***J Nippon Med Sch*** 2003; 70(5): 408-15.
[19] Aono N, Naganuma T, Abe Y, Hara K, Sasada H, Sato E, et al. Successful production of blastocysts following ultrarapid vitrification with step-wise equilibriation of germinal vesicle-stage mouse oocytes. ***J Reprod Dev*** 2003; 49(6): 501-06.
[20] Del Collado M, da Silveira JC, Oliveira MLF, Alves BMSM, Simas RC, Godoy AT, et al. In vitro maturation impacts cumulus-oocyte complex metabolism and stress in cattle. ***Reproduction*** 2017; 154(6): 881-93.
[21] Tao Y, Cao C, Zhang M, Fang F, Liu Y, Zhang Y, et al. Effects of cumulus cells on rabbit oocyte in vitro maturation. ***J Anim Physiol An N*** 2008; 92(4): 438-47.
[22] Choi JK, He X. In vitro maturation of cumulus-oocyte complexes for efficient isolation of oocytes from outbred deer mice. ***PLoS One*** 2013; 8(2): e56158.
[23] Eppig JJ, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Nicholson A, Zhang W, King BA. Effect of in vitro maturation of mouse oocytes on the health and lifespan of adult offspring. ***Hum Reprod*** 2009; 24(4): 922-28.
[24] Tajik P, Esfandabadi NS. In vitro maturation of caprine oocytes in different culture media. ***Small Ruminant Res*** 2003; 47(2): 155-58.
[25] Karami Shabankareh H, Sarsaifi K, Mehrannia T. In vitro maturation of ovine oocytes using different maturation media: effect of human menopausal serum. ***J Assist Reprod Genet*** 2011; 28(6): 531-37.
[26] Sena-Netto SB, Sprı´cigo JFW, Leme LO, Guimara˜es ALS, Caixeta FMC, Dode MAN, et al. The Replacement of Fetal Bovine Serum with Bovine Serum Albumin During Oocyte Maturation and Embryo Culture Does Not Improve Blastocyst Quality After Slow Freezing Cryopreservation. ***Biopreserv Biobank*** 2020; 18(3): 171-79.
[27] Del Collado M, SaraivaC NZ, Lopes FL, Gaspar RC, Padilha LC, Costa RR, et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. ***Reprod Fertil Dev*** 2015; 1-12.
[28] Sreenivas D, Kaladhar DSVGK, Sastry YarlaN, Thomas VM, PalniSamy A. Effect of protein

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:57 +0330 on Wednesday January 13th 2021

supplementation on in vitro maturation of sheep oocytes and in vitro culture of preimplantation with α-tocopherol supplementation in CR1aa medium on sheep embryos to the blastocyst stage. ***J Allergy Ther*** 2013; 4: 2-8.

[29] Puri G, Chaudhary SS, Singh VK, Sharma AK. Effects of fetal bovine serum and estrus buffalo serum on maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes in vitro. ***Vet World*** 2015; 8(2): 143-46.

[30] Abdel-Wahab A, Abdel Aziz RL, Helmy NA, Ibrahim SS. The impact of using newborn bovine serum as fetal calf serum substitute in the in vitro bovine embryos production system. ***Porto Biomed J*** 2018; 3(2): e3.

[31] Moulavi F, Hosseini SM. Effect of macromolecule supplement on nuclear and cytoplasmic maturation, cryosurvival and in vitro embryo development of dromedary camel oocytes. ***Theriogenology*** 2019; 132: 62-71.

[32] Anitua E, Muruzabal F, Tayebba A, Riestra A, Perez VL, Merayo-Lloves J, Orive G. Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: preclinical and clinical studies. ***Acta Ophtalmol*** 2015; 93(8): 605-14.

[33] Arpornmaeklong P, Sutthitrairong C, Jantaramanant P, Pripatnanont P. Allogenic human serum, a clinical grade serum supplement for promoting human periodontal ligament stem cell expansion. ***J Tissue Eng Regen Med*** 2018; 12(1): 142-52.

www.SID.ir