مطالعه تاثیرگذاری هورمون محرک فولیکولی (FSH) در حضور سرم های مختلف حیوانی روی رشد فولیکولی در محیط In vitro

***فاطمه برزگری فیروزآبادی:** مربی، کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه علمی زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران (*مؤلف مسؤول)
f.barzegary@gmail.com
آمنه جاوید: محقق، مرکز پژوهشی بالینی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران libraforever_2006@yahoo.com
دکتر سعید رضایی زارچی: استادیار بیوفیزیک، گروه علمی زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. srezaaei@ibb.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: چندین فاکتور اندوکرینی و موضعی فعال در طول فرایند پیچیده رشد فولیکول تخمدانی و بلوغ اووسیت شرکت می‌کنند. انواع سیستم‌های کشت فولیکولی In vitro که در مراحل مختلفی در رشد به سر می برند به ما اجازه می‌هد این فاکتور ها را شناسایی و مکانیسم فعالیت آنها را درک کنیم. به علت اهمیت فاکتورهای محیطی روی رشد فولیکولی در محیط In vitro این مطالعه روی اثرات بعضی فاکتورهای پاراکرین و اندوکرین روی رشد فولیکول های پره آنترال موش و تمایز آن ها در طول دوره کشت در محیط In vitro تمرکز دارد.

روش کار: نوع مطالعه نیمه تجربی بود. اولین مرحله مهم در این آزمایش انتخاب یک نوع سرم مناسب بود که سرم سلول های گوساله جنینی(FCS: Fetal calf serum) سرم سلول های خوک نابالغ(PGS: Prepubertal gilt serum)، سرم سلول های گوساله جنینی تست شده روی سلول‌های بنیادی (ESFCS: Embryonic stem cell tested fetal calf serum) و سرم بخش پایینی غدد جنسی موش (hpgMS: Hypogonadal mouse serum) مورد تست و آزمایش قرار گرفت. بعد از این که شرایط کشتی مناسب انتخاب شد اثرات غلظت های مختلف گنادوتروپین محرک فولیکولی (FSH: Follicle stimulating hormone) روی رشد، زیست پذیری فولیکول ها و بلوغ اووسیت های ارزیابی شد. مقادیر خاصی از FSH (غلظت‌های ۵ ، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۰۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و۲۲۰IU/I) از FSH به محیط های کشت (حاوی ۳۰-۲۵ فولیکول) در طی آزمایشات جداگانه‌ای اضافه شد. آنالیز های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و برنامه ANOVA یک‌طرفه انجام گرفت.

یافته‌ها: بعد از آزمایشات، سرم سلول های گوساله جنینی(FCS) برای ارزیابی اثرات FSH روی فولیکول ها انتخاب شد. در طول مطالعه حاضر غلظت FSH ۱۰۰ mIU/ml بیشترین اثرات معنی دار را روی رشد فولیکول ها و اووسیت نشان داد به طوری که میزان زیست پذیری فولیکولی به ٪۹۱ در مقایسه با شرایط بدون ٪۲۸ FSH رسید. بلوغ اووسیت (٪۶۱) و میزان گسیختگی وزیکول ژرمینال (٪۸۱) نیز افزایش نشان دادند($p \leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: این آزمایشات نشان می دهد که ترکیب FSH و FCS قبل از تشکیل فضای آنتروم دارای اثرات مثبتی روی زیست پذیری و نیرومندی اووسیت دارد.

کلیدواژه‌ها: هورمون محرک فولیکولی، سرم های حیوانی، فولیکول‌های پره آنترال، رت.

مقدمه

بلوغ اووسیت در محیط In vitro به عنوان تکنیکی موثر برای کاهش قیمت و تقلیل اثرات جانبی تحریکات گنادوتروپین ها در لقاح In vitro شناخته شده است. متابولیسم و پیشرفت تفکیکی فولیکول‌های تخمدانی توسط بسیاری از محققین مورد مطالعه قرار گرفته است که بر روی جوندگان خصوصا رت(۵-۱) هم چنین دیگر پستانداران مانند گاوها(۶)، خوک(۷) و حتی انسان(۸) بوده است. میزان باروری اووسیت آزمایشگاهی نسبت به اووسیتی که در محیط In vivo تحریک شده بسیار کمتر و کندتر است که نشان می دهد هنوز در این زمینه کارهای زیادی برای پژوهش وجود دارد(۹). دست یابی به روش‌های نوین در افزایش درصد اووسیت های بالغ و لقاح یافته انسان و حیوانات در In vitro می تواند در درمان بعضی از مشکلات ناباروری برای انسان، همچنین در تکثیر بسیاری از حیوانات اهلی و غیره اهلی (که نسل آنها در معرض انقراض است) مورد استفاده قرار گیرد(۱۰و۱۱). تحقیق و پژوهش در این زمینه از بیولوژی انسانی بسیار سخت و مشکل است. امروزه استفاده از مدل جوندگان پیشرفته ترین و عالی ترین سیستم را

برای مطالعه در زمینه پیشرفت فولیکولی در محیط In vitro فراهم کرده است(۱۲-۱۴).

فولیکول های مرحله ابتدایی (اشکالی که در تخمدان وجود دارد) یک منبع غنی برای تهیه اووسیت است(۱۰و۱۵). اما توانایی رساندن فولیکول های ابتدائی یا پره آنترال با اووسیت نابالغ به مرحله بلوغ در محیط In vitroیک شرط لازم و ضروری است. پیشرفت در زمینه محیط کشت فولیکولی نه تنها روی مطالعات فیزیولوژی تخمدانی موثر است بلکه تجربه های کلینیکی را هم تحت تاثیر قرار می دهد. نتیجه کشت فولیکولی In vitro بهینه، باید اووسیت های بالغ با قابلیت لقاح و ایجاد زاده های زیست پذیر باشد. هر چند محیط کشت های In vitro به میزان زیادی اصلاح شده اما به سختی قادر هستیم که محیط های با طول عمر بالا داشته باشیم(۱۰).

اووژنز (تولید تخمک) فرآیند پیچیده ای است که به وسیله فاکتور های مختلف اتوکرین و پاراکرین تنظیم می‌شود. در طول هر سیکل و دوره جنسی، افزایش غلظتFSH باعث رشد فولیکول های آنترال می شود(۱۳). مطالعاتی که بر روی حیوانات بدون مخ انجام شده است نشان می دهد که گنادوتروپین های FSH و LH هم چنین گیرنده‌هایشان برای حفظ تولید مثل جانور ماده ضروری است(۱۵). در فقدان FSH تنها ۱۷٪ از فولیکول ها زنده می مانند. در موش‌های خانگی و رت ها (موش های صحرایی) فاکتورهایی مثلFSH واکنش های فیزیولوژیکی را تحریک می کنند. این واکنش ها درصد زیست پذیری فولیکول ها را افزایش می دهند(۱۴). درک روابط و واکنش های درونی بین اجزاء فولیکول و مواد بیوشیمیایی محیط کشت بسیار مهم است. اثبات شده که اثرات متقابلی بین احتیاجات اکسیژنی سیستم با ترکیبات فاکتور های رشد، هورمونی و منابع پروتئینی محیط وجود دارد. استفاده از محیط کشت های مصنوعی شرایط را برای دست یابی به اطلاعات بیشتر فراهم می کند. زمانی که هدف تقلید شرایط فیزیولوژیکی نرمال و کشت فولیکول ها به عنوان اجسام چند لایه باشد، تهیه مواد غذایی لازم و فاکتورهای طبیعی برای لایه های داخلی فولیکول خیلی حیاتی و ضروری است(۱۰). مواد غذایی، فاکتور های رشد و اکسیژن باید از طریق یک لایه فولیکولی بدون رگ انتشار یابد. آزمایشات نشان می‌دهد در چنین شرایطی درصد فولیکول‌ها و اووسیت‌های زیست پذیر کاهش می یابد احتمالا به این علت که در شرایط کشت In vitro، جبران شبکه رگی پیشرفته ای که به طور طبیعی در دیواره سلول های تکا وجود دارد امکان ناپذیر است. با تعدیل مناسب ترکیبات محیط کشت از جمله انواع سلول ها (وجود سلول های تکا یا فقدان آن) نسبت و غلظت گنادوتروپین ها، فاکتور های رشد (انسولین، IGFI، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)) منابع پروتئین (آلبومین، مکمل های ترکیبی سرم) می توان به یک محیط کشت مناسب دست یافت. هم چنین حفظ فاکتور هایی مثل PH و درجه حرارت که تحت کنترل شدیدی هستند برای دست یابی به نتیجه و محصولات ایده آل مهم و ضروری است. درک روابط و واکنش های درونی بین اجزاء فولیکول و مواد بیوشیمیایی محیط کشت بسیار مهم است. اثبات شده که اثرات متقابلی بین احتیاجات اکسیژنی سیستم با ترکیبات فاکتورهای رشد، هورمونی و منابع پروتئینی محیط وجود دارد(۱۶و۱۷).

با توجه به این که فاکتورهای موجود در محیط کشت In vitro دارای اهمیت فوق العاده ای بر روی رشد و بلوغ فولیکول هستند و انتخاب مناسب آنها به افزایش طول مدت کشت In vitro کمک شایانی می کند. مطالعه حاضر قصد دارد تا به اهمیت بیولوژیکی FSH و تاثیر انواع سرم ها روی رشد فولیکولی فولیکول های پره آنترال موش های نابالغ و بلوغ اووسیت محصور در آن در محیط In vitro بپردازد. به علاوه اثرات ترکیبی این فاکتورها نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی کیفیت فولیکول های کشت داده شده تاکید روی تفاوت‌های ساختاری فولیکول در حضور و عدم حضور این فاکتورها قرار گرفت و اثرات هر یک به تنهایی و ترکیبی روی قطر فولیکولی، میزان زیست پذیری و درصد بلوغ اووسیت و گسیختگی وزیکول ژرمینال(GVBD Germinal vesicle breakdown) بررسی شد. این مطالعه با امید ساخت و گسترش محیط مناسب کشت با استفاده از گونه موش خانگی انجام شد که مدل مناسبی برای ارزیابی اثرات ترکیبات مختلف روی توسعه و رشد فولیکولی در محیط In vitro است. مطالعه حاضر قصد دارد تا به اهمیت بیولوژیکی FSH و تاثیر انواع سرم ها روی رشد فولیکولی فولیکول های پره آنترال موش های نابالغ و بلوغ اووسیت محصور در آن درمحیط In vitro بپردازد. آزمایشات زیادی برای بهبود بخشیدن به بلوغ In vitro لازم است انجام شود که امید

می رود مطالعه حاضر کمکی در جهت هموارتر کردن مسیر باشد. این پژوهش در بهار ۱۳۸۸ در پارک علم و فناوری یزد انجام شد.

روش کار

روش مطالعه در این بررسی از نوع نیمه تجربی بوده است FSH .در محیط کشت بدون مکمل آماده و در ۱۰۰ml الکل در دمای $20\ ^{o}C$ نگهداری شد تا برای تهیه غلظت های نهایی ۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۰۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و۲۲۰IU/I از FSH استفاده شود. سرم سلول های گوساله جنینی(FCS) ، سرم سلول های خوک نابالغ (PGS)، سرم سلول های گوساله جنینی تست شده روی سلول های بنیادی (سرمی که از سلول های بنیادی جنین گوساله گرفته شده است (ESFCS) و سرم بخش پایینی غدد جنسی موش (hpgMS) با غلظت ٪۵ برای ارزیابی اثرات منابع پروتئینی استفاده شد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشات کاملا خالص و بدون آلودگی بوده و از شرکت سیگما(Sigma)، USA خریداری شدند.

سی عدد موش های سوری ماده از دانشگاه علوم پزشکی یزد تهیه و داخل لانه حیوانات تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند(۶). روش انتخاب موش ها به صورت تصادفی بود نمونه های ۶ تا ۸ هفته ای برای جدا کردن فولیکول های حاوی تخمک استفاده شد(۲). موش ها به روش جابجایی گردن، همان طور که Yding در سال ۱۹۹۹ شرح داد کشته شدند(۱۸). برای تهیه فولیکول‌های پره آنترال، تخمدان ها جدا و در داخل پتریدیش های کاملا استریل قرار داده شدند. پتریدیش‌ها در دمای اتاق با محیط کشت پایه Tcm۱۹۹ همراه با مکمل‌های پیروات سدیم(mm2)، گلوتامین(mm2)، پنی سیلین (۱۷۵µg/ml) و استرپتومایسین (۵۰g/ml) پر شده بودند(۱۹). در ابتدا بافت های پیوندی موجود در محیط کشت جدا شد. تخمدان ها به ذرات ریز قطعه قطعه و کورتکس تخمدانی با استفاده از اسکاپل برداشته شد. تعداد ۳۰ عدد فولیکول‌های پره انترال (۵± ۱۰۰ mµ) با یک یا دو لایه از سلول‌های گرانولوزای اطراف اووسیت به همراه لایه پایه ای دست نخورده که حاوی سلول‌های تکا می‌باشد از برش های غشایی زیر میکروسکوپ جدا شدند. فولیکول های جدا شده در ۵ میلی لیتر محیط کشتTCM۱۹۹ به همراه مکمل هایش داخل انکوباتور با درجه حرارت $37^{o}C$، رطوبت ٪۹۲ و میزان CO_2 برابر ٪۵ کشت داده شدند. فولیکول‌های به دست آمده از تخمدان ها دارای شرایط مشابه بوده و به طور تصادفی بین گروه های آزمایشی توزیع شدند.

مقایسه سرم های مختلف برای رشد بهینه فولیکولی

چهار نوع سرم مختلف برای تعیین منبع پروتئینی مناسب برای رشد بهینه فولیکولی با یکدیگر مقایسه شدند. سرم سلول های گوساله جنینی(FCS)، سرم سلول های خوک نابالغ(PGS)، سرم سلول های گوساله جنینی تست شده روی سلول های بنیادی (ESFCS) و سرم بخش پایینی غدد جنسی موش (hpgMS) در غلظت ٪۵ به محیط کشت ها اضافه شدند. قطر فولیکولی و درصد زیست پذیری بعد از ۶ روز کشت تعیین شد.

اطلاعات حاضر از رشد فولیکول ها تنها در مورد آنهایی است که در تمام دوره کشت ۶ روزه سالم مانده بودند. در روز دوم دوره، تمام فولیکول های سالم به محیط کشت تازه منتقل شدند. فولیکول‌هایی که ساختار غشایی آن‌ها آسیب ببیند قادر نیستند بقیه مراحل را طی کنند در نتیجه فولیکول هایی که در این مدت ۲ روزه، آسیب دیده بودند از مسیر آزمایش خارج شدند (حدود ۲ درصد). یک بار در روز، محیط کشت فولیکول ها تعویض می شد. برای کم کردن خطا در نتایج، آزمایش ها دوبار تکرار شدند و در هر بار تکرار گروه های ۳۰ تایی فولیکول مورد بررسی قرار گرفت (از نظر آماری این تعداد قابل قبول می باشد) که در مجموع برای هر گروه آزمایشی تعداد ۶۰ فولیکول تخصیص داده شد در انتهای آزمایش‌ها برای هر گروه از نتایج، مقدار میانگین محاسبه گردید. هر سری از آزمایش های ذکر شده در بالا به تنهایی و دوباره با اضافه کردن غلظت mIU/ml ۱۰۰ از FSH به محیط تکرار شد. گروه کنترل نیز حاوی۳۰ فولیکول بود که در محیطTcm۱۹۹ کشت داده شد و در طول دوره آزمایش ها هیچ ماده ای به محیط کشت آن اضافه نشد.

آنالیز های آماری

روزانه حداقل و حداکثر طول (قطر) فولیکول ها توسط میکروسکوپ انعکاسی اندازه گیری شد. در اندازه‌گیری قطر فولیکول از سلول‌های تکا و اینترستیشیال اطراف

جدول ۱- اثرات انواع مختلف سرم ها روی قطر فولیکولی و درصد زیست پذیری آن.

گروه های آزمایشی	زیست پذیری فولیکولی (٪)	قطر فولیکولی (µm)
کنترل	۲۸ ± ۲	۱۱۱ ± ۵
hpgMS	۳۱ ± ۲	۱۱۴ ± ۵
ESFCS	۳۳ ± ۲	۱۱۷ ± ۵
FCS	۴۱* ± ۲	۱۲۵* ± ۵
PGS	۳۱ ± ۲	۱۱۲ ± ۵

Values are Mean±SEM

* Significant increase; p< ۰/۰۵

غشاء پایه صرف نظر شد و قطر متوسط هر فولیکول با میانگین گیری مقادیر حداقل و حداکثر به دست آمد. در پایان انکوباسیون، تغییرات مورفولوژیکی اووسیت و تشکیل جسم قطبی توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت به این صورت که در انتهای دوره کشت شش روزه، فولیکول ها با دقت به وسیله دو سوزن نازک باز شدند و کمپلکس کومولوس اوفوروس (COCs) از نظر مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفت. کمپلکس های کومولوس اوفوروس با لایه سلول های متراکم و پیوسته به عنوان کمپلکس های سالم در نظر گرفته شدند و تنها فولیکول هایی که دارای غشاء پایه سالم بودند برای آنالیزهای بعدی باقی ماندند. اثرات مواد مختلف روی بلوغ اووسیت، گسیختگی وزیکول ژرمینال، تغییر قطر فولیکول ها و میزان ماندگاری آنها بوسیله ANOVA یک طرفه(آنالیز واریانس یک طرفه) بررسی شد. درصد های به دست آمده در تست ANOVA برای تعیین اختلافات معنی دار بین میانگین های گروه ها مقایسه شدندHoc tests Post .برای مقایسه های چند گانه با درجه اطمینان٪۹۵ استفاده گردید. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. p<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد به این معنی که تفاوت بیشتر از ٪۵ بین گروه کنترل و گروه های تیمار به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

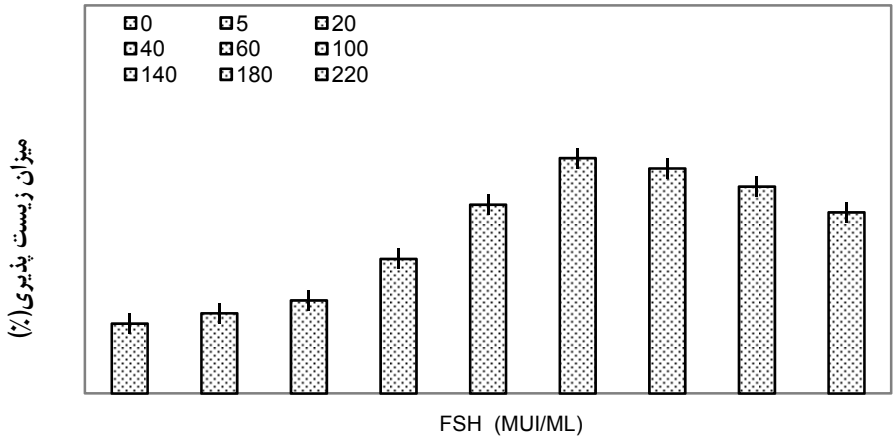
یافته ها

مقایسه اثرات سرم های مختلف روی میزان زیست پذیری و قطر فولیکولی

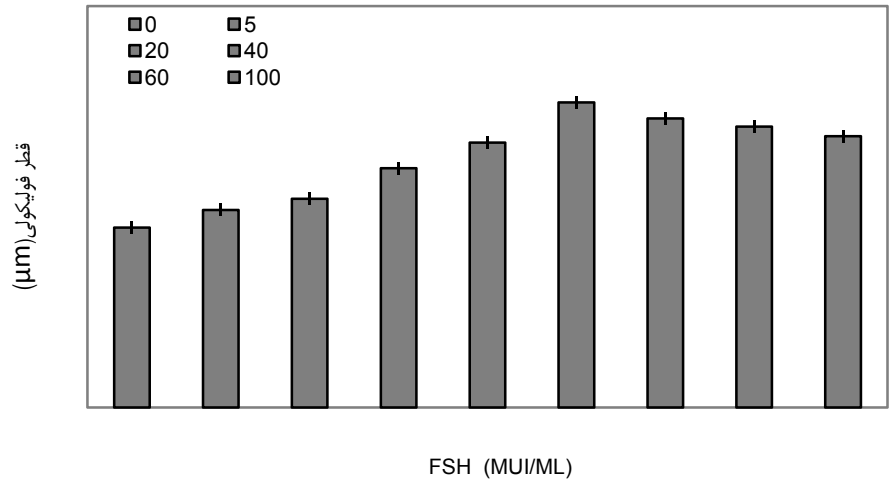
اثرات ترکیبی و مقایسه ای سرم های مختلف شامل سرم سلول های گوساله جنینی(FCS)، سرم سلول‌های خوک نابالغ(PGS)، سرم سلول های گوساله جنینی تست شده روی سلول های بنیادی (ESFCS) و سرم بخش پایینی غدد جنسی موش (hpgMS) بر روی قطر فولیکولی و درصد زیست پذیری فولیکولی بررسی شد. غلظت سرم در طول تمام آزمایشات در حد ثابت ٪۵ در نظر گرفته شد. تمام فولیکول‌هایی مورد استفاده در این مطالعه به صورت دستی جدا شد. همان طور که در جدول ۱ نشان داده شده است قطر فولیکول‌های اولیه بعد از یک دوره ۶ روزه کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه های مختلف سرم ها دارای اثرات قابل توجهی روی درصد بقاء و قطر فولیکولی در مقایسه با گروه کنترل بودند (p<۰/۰۵) اثرات نمونه های سرمی زمانی به حداکثر خود رسید که فولیکول ها در حضور سرم سلول های گوساله جنینی (FCS) در مقایسه با سایر انواع سرم ها کشت داده شدند. میزان زیست پذیری فولیکولی در محیط حاوی سرم۴۱٪ FCS در مقایسه با گروه گنترل (٪۲۸) و سایر انواع سرم ها بود (p<۰/۰۵) همان طوری که در جدول ۱ نشان داده شده است قطر فولیکولی نیز در حضور سرم FCS به 125 µm در مقایسه با کنترل رسید (۱۱۱ µm) (p<۰/۰۱).

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

تغییرات مورفولوژیکی فولیکولهای پره آنترال موش‌های نابالغ در طول یک دوره کشت ۶ روزه در حضور غلظت‌های ۵، ۲۰، ۴۰،۶۰، ۱۰۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و۲۲۰ IU/I ازFSH در شکل‌های ۱ ، ۲ و ۳ نشان داده شده است. فولیکولهای پره آنترال تیمار شده با غلظت های ۵، ۲۰، ۴۰،۶۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و۲۲۰ IU/I از FSH هیچ تغییرات معنی‌داری در قطر و میزان ماندگاری در مقایسه با گروه کنترل نشان ندادند(p≥۰/۰۶) در مقابل افزایش معنی‌داری در قطر (۱۹۰µm) و قدرت زیست پذیری (٪۹۱) فولیکول‌ها در غلظت FSH ۱۰۰mIU/ml در



شکل ۱- اثرات غلظت های مختلف FSH روی میزان زیست پذیری فولیکولی (٪). غلظت ۱۰۰mIU/ml از FSH مناسب ترین دوز شناخته شد.

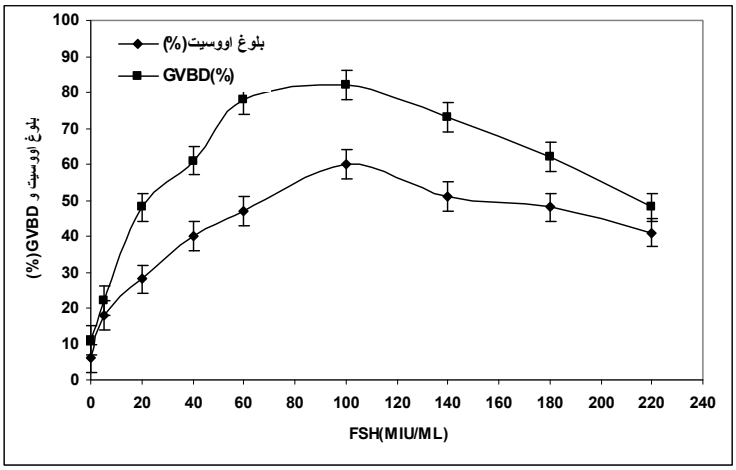


شکل ۲- اثرات غلظت های مختلف FSH روی قطر فولیکولی (µm). غلظت ۱۰۰mIU/ml از FSH مناسب ترین دوز شناخته شد.

دوره ۶ روزه کشت به دست آمد که با گروه کنترل و دیگر گروه‌های آزمایشی مقایسه شده است (p<۰/۰۰۰۱).

اثرات FSH روی قابلیت توسعه و رشد فولیکول هایی که به صورت in vitro در محیط کشت های حاوی سرم رشد یافته‌اند.

اثراتmIU/ml ۱۰۰ ا ز FSH و ۵٪ از FCS در طول آزمایشات بررسی شد. محیط کشت حاوی ترکیب FSH و سرم یک افزایش قابل توجهی در قطر فولیکولی ایجاد کردند که در جدول ۲ و شکل ۴ مشاهده می شود. محیط کشت های حاوی FSH به تنهایی و ترکیب FSH و سرم FCS را به ترتیب اندازه قطر فولیکولی به ۱۹۰و ۱۹۷µmدر مقایسه با ۱۱۰ µm در گروه کنترل رساندند (p<۰/۰۵) میزان زیست پذیری فولیکولی در محیط حاوی ترکیب FSH و سرم FCS به ۹۶٪ در مقایسه با گروه کنترل رسید (۲۸٪) (p<۰/۰۰۰۱) آزمایشات مشابهی برای ارزیابی بلوغ اووسیت و میزان گسیختگی وزیکول ژرمینال در طول دوره ۶ روزه کشت انجام گرفت. در محیط کشت حاوی FSH و سرم FCS بلوغ اووسیت (MII) به میزان ۶۷٪ افزایش یافت در حالی که میزان گسیختگی وزیکول ژرمینال ۹۱٪ اندازه گیری شد که این میزان برای گروه کنترل برابر ۳٪ در بلوغ اووسیت و ۱۰٪ در میزانGVBD است (p<۰/۰۰۰۱) نتایج به دست آمده در طول آزمایشات در جدول ۲ خلاصه شده است.



شکل ۳- اثرات غلظت های مختلف FSH روی بلوغ اووسیت و GVBD. غلظت ۱۰۰mIU/ml از FSH مناسب ترین دوز شناخته شد.

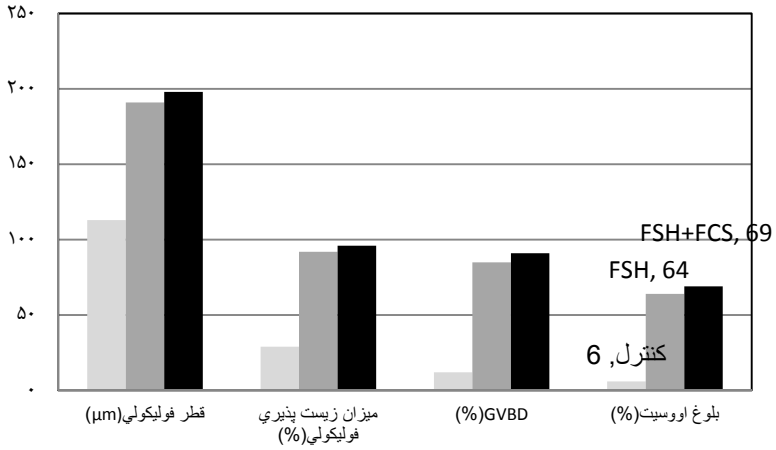
جدول ۲- اثرات غلظت ۱۰۰mIU/ml FSH روی رشد فولیکول های پره آنترال و بلوغ اووسیت محصور در آن در حضور ٪۵ از سرم FCS در طول دوره ۶ روزه کشت

گروه های آزمایشی	کنترل	FSH (۱۰۰ mIU/ml)	۱۰۰ mIU/ml FSH+ ۵% FCS
قطر فولیکولی (µm)	۱۱۰[a]±۳	۱۹۰**±۳	۱۹۷**± ۳
میزان زیست پذیری فولیکول (٪)	۲۸[b]±۲	۹۱*±۲	۹۶*±۲
GVBD (٪)	۱۰[b]±۴	۸۱*±۴	۹۱*±۴
بلوغ اووسیت (٪)	۳[b]±۳	۶۱*±۳	۶۷*±۳

Values are mean±SEM, **p < ۰/۰۵ vs. "a", *p < ۰/۰۰۰۱ vs. "b"

بحث و نتیجه‌گیری

آزمایشات ما به وضوح، نقش کلیدی FSH در افزایش رشد و تمایز فولیکول‌های پره آنترال ابتدائی در محیط In vitro را نشان می‌دهد. این مشاهدات مشابه گزارشاتCortvrindt (۱۴) ، Hirao(۷) و Mao (۲۹) است. FSH برای ساخت استروئید در پاسخ به آنزیم‌های تحریک کننده تمایز سلول های گرانولوزا و هم‌چنین تشکیل حفره انتروم فولیکولی لازم و ضروری است. FSH هم‌چنین تنظیم کننده پیوستگی بین اووسیت و سلول‌های گرانولوزای(GCs) اطراف آن است (۲۰و۲۱و۲۲). به علاوه وجود گنادوتروپین ها تحریک کننده بیان بازدارنده های پروتئین های آپوپتوزیزی



شکل ۶- اثرات مقایسه ای و ترکیبی FSH و ٪۵ سرم سلول های گوساله جنینی (FCS) روی قطر فولیکولی(µm). قطر فولیکولی و درصد زیست پذیری فولیکولی در محیط کشت حاوی سرم FCS از سایر گروه ها بیشتر بود.

(IAP) می باشند این باز دارنده ها توسط سلول های گرانولوزا در محیط های in vivo و In vitro تشکیل می شوند (۱۶و۲۳). سرانجام FSH با چندین فاکتور رشد از جمله activin A، اینهیبین، فاکتور رشد شبه انسولینی۱ (IGF-1) واکنش می دهد و بدین وسیله رشد فولیکولی را تحریک می کند. این تنظیم های داخل تخمدانی واسطه اثرات گنادوتروپین‌ها در واکنش‌های سلولی است. گنادوتروپین ها واکنش های سلولی را به وسیله مکانیسم های اتوکرین و پاراکرین تنظیم می‌کنند. از دیدگاه بیوشیمیایی با شروع تمایز لایه های سلولی گرانولوزا و سلول های داخلی و خارجی تکا، رسپتورهای FSH بر روی سلول های گرانولوزای فولیکول های پره آنترال ظاهر می‌شوند. در نتیجه فولیکول ها به گنادوتروپین ها وابسته می گردند(۹و۱۴و۲۲).

در مطالعه ای در سال۱۹۹۷ اظهار شد FSH دارای نقش بسیار مهم و حیاتی در رشد فولیکول های ابتدایی محیط In vitro است (۱۴). در موش خانگی، حذف FSH از محیط کشت بقای سلول های گرانولوزا را به خطر می‌اندازد و موجب مرگ سلول های فولیکولی می شود. در مطالعات دیگری نیز پیشنهاد شده که در شرایط فقدان FSH، انتشار و نفوذ چندین فاکتور مهم فیزیکی و شیمیایی از خلال غشاء پایه می تواند مختل شود(۲۳و۲۴). در محیط کشت فاقدFSH ، به وفور خروج اووسیت از ساختمان فولیکولیش رخ داده است(۱۴) که این امر ممکن است به علت اختلال در اتصالات شکافدار (Gap Junction)یا کاهش تعداد اتصالات شکافدار باشد(۲۴و۲۵). با افزودن FSH به محیط کشت، رشد فولیکول های پره آنترال، درصد بقاء فولیکول ها و تشکیل حفره آنتروم فولیکولی موش های خانگی و صحرایی افزایش می یابد. در انسان، FSHتولید استروژن و تشکیل حفره آنتروم در محیط In vitro را افزایش می دهد(۲۶و۲۷و۲۸). با جمع بندی این اطلاعات، نقش حیاتی FSH در رشد فولیکولی و اووسیت محصور در آن تایید و اثبات می شود. حضور FSHنقش بسیار کلیدی و مهم در مهار آترزی فولیکولی داراست. در روند آترزی، آپوپتوزیز سلولی یک رکن پایه محسوب می شود که با حضور FSH در محیط کشت فولیکول های آنترال و پره آنترال موش های خانگی مهار می گردد(۱۴). همان طور که منحنی وابسته به دوز برای اثرات FSH در طول کشت فولیکولی پره آنترال نشان می دهد با افزایش غلظت FSH تا حداکثر ۱۰۰IU /ml، یک افزایش در سرعت رشد متوسط فولیکولی مشاهده می شود. با کشت فولیکول ها در حضور غلظتFSH ۱۰۰۰ mIU /ml نسبت تخمک گذاری فولیکولی به طور قابل ملاحظه ای در مقایسه با غلظت ۱۰۰ mIU /ml کاهش می یابد. زمانی که فولیکول ها به مقدار زیاد در معرض FSH باشند طی تنظیمات سلولی، رسپتور ها کاهش می یابد که این امر منجر به پاسخ فولیکولی پایین تر از سطح مطلوب می شود(۲). آزمایش های ما نشان می دهد که فولیکول های پره آنترال به افزایش سطح FSH عکس العمل نشان می دهند و با کشت فولیکول های پره آنترال می توان اثرات تنظیمی FSH بر روی آنها را بررسی و مطالعه کرد. نتایج بیان می‌کند که FSH به میزان زیادی بلوغ اووسیت و GVBD را افزایش می‌دهد. این مشاهدات هم چنین در مطالعه دیگری نیز گزارش شده است(۱۴). در غلظت mIU/mlFSH ۱۰۰ بیشترین درصد زیست پذیری فولیکول ها مشاهده می شود اما در غلظت های بالاتر از آن، میزان بقاء فولیکولی، GVBD و هم چنین بلوغ اووسیت کاهش می یابد این مشاهدات در راستای گزارشات Nayudu در سال ۲۰۰۶ است.

آزمایشات مشابهی روی عمکرد هورمون FSH روی رشد فولیکولی انجام شده است این هورمون برای رشد فولیکول در محیط In vitro لازم است اما کافی نیست و باید فاکتورهای زیادی در محیط کشت حضور داشته باشند که ضمن کمک به عملکرد هورمون FSH با آن ضدیت نداشته باشند. در این راستا ما ترکیب این هورمون را با سرم های مختلف که متفاوت از دوزهای مصرفی درآزمایشات مشابه بود مورد بررسی قرار دادیم. آنالیزهای داده ها نشان می دهد که درصد زیست پذیری فولیکولی هنگامی که فولیکول ها در محیط۱۹۹ TCM به همراه سرم FCS کشت داده شوند به طور قابل توجهی بالاتر از زمانی است که فولیکول ها در محیطTCM۱۹۹ به همراه سرم هایPGS، ESFCS و hpgMS کشت داده شوند. سرم FCS در مقایسه با سایر سرم ها مکمل‌های سرمی بسیار بالاتری را برای توسه و رشد فولیکول‌ها در محیط In vitro فراهم می‌کند(۲۹). فولیکول های موجود در محیط‌های حاوی سایر سرم ها به علت کافی نبودن ترکیبات سرم ها به خصوص از نظر منابع پروتئینی، نتوانستند به طور قابل

توجهی رشد کرده و به بلوغ برسند. زمانی که سرم یکی از ترکیبات محیط کشت باشد، فاکتورهای رشد را فراهم کرده و رشد کیسه ای پره آنترال و درصد زیست پذیری آن را در کشت فولیکولی بالا می برد(۲۴و۳۰). نتایج ما اثبات می کند که سرم سلول های گوساله جنینی (FCS) مکمل های سرمی بسیار بالایی را برای کشت فولیکول های پره آنترال فراهم کرده و تعداد زیادی از فولیکول های می توانند به صورت دست نخورده و سالم جمع آوری شوند.

سرم یک منبع پروتئینی خوب را برای طول دوره کشت In vitroفولیکول های پره آنترال فراهم می کند. هر چند سلول‌های OGc موش در فقدان FSH و سرم تا مرحله پایانی بلوغ اووسیت کشت داده شده اند. به هر حال در محیط کشت هایی که سرم وجود داشت بعد از اینکه FSH به محیط اضافه شد میزان رشد قطر فولیکولی در مقایسه با محیط های بدون FSH یا بدون سرم افزایش نشان داد (۱۴). بنابراین میزان فعالیت FSH روی رشد فولیکولی پره آنترال در محیط In vitro به شرایط محیط کشت خصوصا حضور سرم وابسته است.

در مطالعه انجام شده غلظت ۱۰۰ mIU /mlFSHدارای بیشترین تاثیر روی زیست پذیری فولیکول ها، قطر فولیکولی، بلوغ اووسیت و میزان گسیختگی وزیکول سمینال است که با اضافه کردن سرم سلول های گوساله جنینی به محیط این اثر افزایش می یابد. آزمایشات نشان داد درصد زیست پذیری فولیکولی هنگامی که فولیکول‌ها در محیط۱۹۹ TCM به همراه سرم FCS در حضور FSH کشت داده شوند به طور قابل توجهی بالاتر از زمانی است که محیط کشت ها فقط دارای یکی از این ترکیبات باشد. سرم FCS یک منبع پروتئینی خوب را برای طول دوره کشت In vitro فولیکول‌های پره آنترال فراهم می کند.

این مطالعه با امید ساخت و گسترش محیط مناسب کشت با استفاده از گونه موش خانگی انجام شد که مدل مناسبی برای ارزیابی اثرات ترکیبات مختلف روی توسعه و رشد فولیکولی در محیطIn vitro است. دوره ماندگاری کوتاه اووسیت ها در محیط In vitro یک مسئله مهم است که این تحقیق سعی کرده است تعدادی از مواد موثر در طولانی تر کردن این دوره را بررسی کند ولی این مسیر هنوز احتیاج به پژوهش های زیادی دارد که امیدواریم تحقیقات بعدی در این راستا مشکل گشا باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از مسئولین پارک علم و فناوری یزد که در انجام این تحقیق همکاری های لازم را مبذول فرمودند و هم چنین از دانشگاه پیام نور که اعتبارات مالی این تحقیق را فراهم آورد تقدیر و تشکر می گردد.

منابع

1. Gore-Langton RE, Daniel SA. Follicle-stimulating hormone and estradiol regulate antrum-like reorganization of granulosa cells in rat preantral follicles cultures. Biol. Reprod; 2005. 43(6): 65–72.
2. Eppig JJ, O'Brien M J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. Biol Reprod; 2000. 54(2): 197–207.
3. Nayudu PL, Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. Reprod Fertil; 2003. 95(10): 349–62.
4. Qvist RLF, Blackwell H, Bourne C, Brown JB. Development of mouse ovarian follicles from primary to pre-ovulatory stages in vitro. J Reprod Fertil; 2002. 89(1): 169–80.
5. Johnson LD, Albertini DF, McGinnis LK, Biggers JD. Chromatin organization, meiotic status and meiotic competence acquisition in mouse oocytes from cultured ovarian follicles. Reprod Fertil; 2006. 104(1): 277–84.
6. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. Mol Cel Endocrinol; 2005. 163(5): 53–60.
7. Hirao YT, Nagai M, Kubo T, Miyano M, Miyake K, Kato S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. J Reprod Fertil; 2000. 100(4): 333–9.
8. Roy SK, Treacy BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. Fertil Steril; 2002. 59(12): 783–90.
9. Mitchell LM, Kennedy CR, Hartshorne GM. Effects of varying gonadotrophin dose and timing on antrum formation and ovulation efficiency of mouse follicles in vitro. Hum Reprod; 2005. 17(5): 1181-88.
10. Mahmoudi R, Subhani A, Pasbakhsh P, AboL Hasani F, Amiri I, Salehnia M, et al. The Effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes. Ir J Reprod Med; 2005. 3(2): 74-8.
11. Eppig JJMJ, O'Brien FL, Pendola C, Watanabe S. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: follicle stimulating hormone and insulin. Biol Reprod; 1998. 59(5): 1445–53.
12. Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual

development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. Mol Endocrinol; 2001. 15(1): 72–183.

13. McGee EA. The regulation of apoptosis in preantral ovarian follicles. Biol Signal Recept; 2000. 9(1): 81–86.

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

15. Li S, Maruo T, Ladines-Llave CA, Kondo H, Mochizuki M. Stage limited expression of myc oncoprotein in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. Endocrinol; 1995. 41(3): 83–92.

16. Eppig JJ, Wigglesworth K. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: oxygen concentration. Mol Reprod And Dev; 2000. 42(1): 447–56.

17. Smitz J, Cortvrindt R and Van-Steirteghem A. Normal oxygen atmosphere is essential for the solitary long-term culture of early preantral mouse follicles. Mol Reprod Devel; 2005. 45(3): 466–75.

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

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

20. Albertini DFCM, Combelles E, Benecchi E , Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. Reproduct; 2001. 121(1): 647–53.

21. Wang YP, Rippstein U, Tsang BK. Role and gonadotrophic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein expression during rat ovarian follicular development in vitro. Biol Reprod; 2003. 68(4): 610–19.

22. Nakano R, Akahori T, Katayama K, Tojo S. Binding of LH and FSH to porcine granulosa cells during follicular maturation. Reprod Fertil; 2005. 51(1): 23–27.

23. Chun SYH, Billig JL, Tilly I, Furuta A, Tsafriri Z and Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. Endocrinol; 2001. 135(2): 1845–53.

24. Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC and Welsh TH. Hormonal regulation of the differentiation of cultured rat granulosa cells. Endocr Rev; 2003. 5(2): 76–127.

25. Amsterdam A, Rotmensch S. Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. Endocr Rev; 2000. 8(1): 309–37.

26. Abir RS, Franks MA, Mobberley PA, Moore RA, Margara S, Winston RM. Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. Fertil Steril; 1997. 68(5): 682–88.

27. LaPolt PS, JL Tilly, Aihara T, Nishimori K, Hsueh AJ. Gonadotropin induced up-and down-regulation of ovarian follicle-stimulating hormone(FSH) receptor gene expression in immature rats: effects of pregnant mare's serum gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and recombinant FSH . Endocrinol; 1992. 130(5): 1289–95.

28. Nayudu PL, Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. Reprod Fertil; 2006. 95(4): 349–62.

29. Mao JG, Wu MF, Smith TC, McCauley TC, Cantley RS, Prather BA, et al. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. Biol Reprod; 2002. 67(4): 1197–203.

30. Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, R. Winston ML, Franks S and Hardy K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in vitro growth of human ovarian follicles. J Hum. Reprod; 1999. 14(8): 1555–62.

Original Article

Study of Follicle Stimulating Hormone (FSH) Efficiency on the In vitro Growth of Mice Follicles in Presence of Animal Different Sera

***Fatemeh Barzegari Firouzabadi, MSc** in Animal Physiology, Biology department, Payamenoor University, Tehran, Iran (*Corresponding author). f.barzegary@gmail.com
Ameneh Javed, Researcher, Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran. libraforever_2006@yahoo.com
Saeed Rezaei Zarchi, PhD. Assistant Professor of Biophysics, Biology department, Payamenoor University, Tehran, Iran. srezaaei@ibb.ut.ac.ir

Abstract

Background: Several endocrine and locally acting factors are involved in the complex process of ovarian follicle growth and oocyte maturation. In vitro follicular culture systems, at various developmental stages, allow the identification of these factors and the understanding of their mechanisms of action. Keeping in mind the significance of the influence of environmental factors on the follicle growth, this work focuses on the effect of some endocrine and paracrine factors on the growth and differentiation of preantral follicles during the in vitro follicular culture using the rodent (mouse) model.

Methods: Our study was semi-experimental. First task of the study was to choose an appropriate serum type. Prepubertal gilt serum, embryonic stem cell tested fetal calf serum, hypogonadal mouse serum and fetal calf serum were tested during the present study. Effect of the culture period was also evaluated on the follicle growth. After carefully selecting the optimum growth conditions, the effect of FSH was evaluated on the growth and viability of the follicular and oocyte maturation. Different concentrations of FSH (5, 20, 40, 60, 100, 140, 180 and 220 mIU/l) were added to the culture medium (containing 25-30 follicles each) during separate experiments.

Results: After experiments, fetal calf serum (FCS) was chosen for the evaluation of the effect of FSH. During the present experiment, 100 mIU/ml FSH showed highly significant effect on the follicle and oocyte growth. Follicle survival rate also increased (91%) as compared to that grown without this gonadotropin (28%). Oocyte maturation (61%) and germinal vesicle breakdown rates (81%) also showed an increase ($p \leq 0.05$).

Conclusion: These results have suggested that the exposure to FSH and FCS before the formation of antrum had a positive effect on the follicle survival and oocyte robustness.

Keywords: Follicle stimulating hormone, Animal serums, Preantral follicles, Rat.