

Evaluation of the Follicular Growth during Mouse Ovarian Culture in Medium Supplemented with Different Doses of Growth Differentiation Factor 9B

Mojde Pajokh¹, Mojde Salehnia^{2*}

1- M.Sc., Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: salehnia@modares.ac.ir

Received: 28/Jun/2013, Accepted: 03/Nov/2013

Abstract

Objective: Growth differentiation factor 9B (GDF9B) is an oocyte-derived growth factor. This protein is essential for the development of ovarian follicles and acts mainly by binding to its receptor on the surface of granulosa cells. The effect of GDF9B on the growth of follicles in various developmental stages, particularly primordial and primary follicles, is unknown. Thus the aim of this study is to investigate these effects after mouse whole ovarian culture.

Methods: Female NMRI mice (14 day-old) were sacrificed by cervical dislocation. Subsequently their collected ovaries were cultured in α -MEM basic medium (control group) and medium supplemented with different doses of recombinant GDF9B (10, 20, 40 ng/ml) for seven days in 5% CO₂ and 37°C. At the end of the culture period, serial sections of ovaries were prepared and stained with hematoxylin and eosin. The follicles were counted in the primordial, primary, preantral and antral stages and compared among the different groups.

Results: In GDF9B supplemented groups the percentage of antral follicles significantly increased whereas the percentage of preantral follicle decreased when compared with the control group. However there were no significant differences between the percentage of primordial and primary follicles in all supplemented GDF9B (10, 20, 40 ng/ml) groups and the control.

Conclusion: Overall, this study showed that GDF9B stimulated the growth of preantral follicles to the antral stage. However this factor did not have a remarkable effect on the growth of primordial and primary follicles.

Keywords: Growth differentiation factor 9B (GDF9B), Mouse, Ovarian organ culture

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 3, Autumn 2013, Pages: 43-51

ارزیابی رشد فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی طی کشت تخمدان موش نابالغ در حضور غلظت‌های مختلف عامل رشدی تمایزی 9B

مژده پاژخ^۱، مژده صالح نیا^{۲*}

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

Email: salehnm@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۰۸/۱۳

دریافت مقاله: ۹۲/۰۴/۰۸

چکیده

هدف: عامل رشدی تمایزی 9B عامل رشد پروتئینی مشتق از تخمک است که بیان آن در تکوین فولیکول‌های تخمدان ضروری است. این عامل به واسطه گیرنده خود که بر سطح سلول‌های گرانولوزا قرار دارد اثر خود را اعمال می‌کند. اثر عامل رشدی تمایزی 9B بر رشد فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی به‌ویژه فولیکول‌های بدوی و اولیه نامشخص است. هدف از این مطالعه بررسی اثر عامل رشدی تمایزی 9B بر رشد فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی طی کشت تخمدان موش نابالغ بود. مواد و روش‌ها: از موش‌های ماده نژاد NMRI با گروه سنی ۱۴ روز استفاده شد. حیوانات به طریق جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند. تخمدان‌های به‌دست آمده از حیوانات تحت شرایط انکوباتور مرطوب 5 CO_2 درصد و دمای 37°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز کشت داده شدند. گروه‌های مورد مطالعه شامل تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده در محیط پایه و تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده در محیط پایه غنی شده با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر عامل رشدی تمایزی 9B بود. در پایان دوره کشت، از تخمدان‌های کشت شده برای شمارش فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی برش‌های بافتی تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه، پره آنترال و آنترال شمارش شد. نتایج: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تخمدان‌های کشت شده در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف عامل رشدی تمایزی 9B نسبت به گروه کشت شده در محیط پایه افزایش معنی‌داری در درصد فولیکول‌های آنترال و کاهش معنی‌داری از نظر درصد فولیکول‌های پره آنترال دارند. با این حال میانگین درصد فولیکول‌های بدوی و اولیه در تخمدان‌های کشت شده در محیط پایه و کشت شده در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر عامل رشدی تمایزی 9B از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد. نتیجه‌گیری: در مجموع تحقیق حاضر نشان داد که عامل رشدی تمایزی 9B منجر به تحریک رشد فولیکول‌های پره آنترال به آنترال می‌شود در حالی که بر رشد فولیکول‌های مراحل بدوی و اولیه تأثیر مشخصی ندارد.

کلیدواژگان: عامل رشدی تمایزی 9B، موش، کشت تخمدان

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، صفحات: ۴۳-۵۱

مقدمه

تخمدان با مشکل مواجه می‌شود. برای رفع این مشکل قطعات کوچکی از قشر تخمدان در ابعاد یک میلی‌متر مکعب در کشت استفاده می‌شود. این روش برای مطالعه فعال‌سازی و رشد فولیکول‌های فعال شده در گاو، میمون و انسان به‌کار گرفته

تکوین فولیکول‌های تخمدانی با تشکیل فولیکول‌های بدوی آغاز می‌شود. فرآیند تشکیل فولیکول‌های بدوی و عوامل مؤثر بر آن به‌وسیله کشت تخمدان‌های به‌دست آمده از جنین بررسی می‌شود [۱]. در مطالعه گونه‌های بزرگ‌تر، کشت

تکوین فولیکولی و عامل رشدی تمایزی 9B

می‌شود [۲]. مزیت کشت تخمدان نسبت به فولیکول‌های جدا شده، حفظ ساختمان فولیکول به شکل دست نخورده است. رفتار فولیکول‌ها در تخمدان کامل نسبت به فولیکول‌های جدا شده (Isolated follicles) متفاوت است. ارتباطات متقابل جمعیت‌های فولیکولی و انواع سلول‌ها در کشت تخمدان قابل ارزیابی است. با این حال نفوذ مواد غذایی و گازها اندازه تخمدان‌های قابل کشت را محدود می‌کند. برش تخمدان‌های بزرگ‌تر به قطعات کوچک‌تر می‌تواند این مشکل را برطرف سازد اگرچه ممکن است بافت طی برش دچار صدمه شود یا فولیکول‌های بزرگ‌تر از دست بروند [۳].

عامل رشدی تمایزی 9B (Growth Differentiation Factor 9B) از اعضای خانواده TGF- β (Transforming Growth Factor beta) است و در انسان، جوندگان و گوسفند بیان آن به تخمک محدود می‌شود. در پستانداران GDF9B محصول ژن وابسته به کروموزوم X است و در تخمک بیان می‌شود و به‌عنوان یک عامل پاراکرین (Paracrine) و اتوکرین (Autocrine) تکوین فولیکول‌ها را تحریک می‌نماید و به‌علاوه نقش مهمی در تنظیم میزان تخمک‌گذاری و کیفیت تخمک دارد. اهمیت GDF9B در مراحل اولیه تکوین فولیکول وابسته به گونه است [۴]. عوامل موضعی از جمله AMH (Anti-Müllerian Hormone)، GDF9B و GDF9 نقش تنظیمی عمده‌ای در هر دو مرحله وابسته و غیر وابسته به گنادوتروپین (Gonadotropin) در فولیکول‌ها دارند. سرنوشت نهایی هر فولیکول به تعادل بین عوامل تحریکی و مهارتی که عملکرد گنادوتروپین‌ها را تنظیم می‌کند وابسته است. GDF9B اغلب در تخمک فولیکول‌های در حال رشد یافت می‌شود؛ اگرچه mRNA آن در فولیکول‌های بدوی بعضی گونه‌ها شناسایی شده است. در گاو و انسان آغاز بیان GDF9B در تخمک فولیکول‌های اولیه است [۵]. فولیکول‌های تخمدان پستانداران بزرگ از جمله انسان، گاو و گوسفند در محیط کشت قادر به عبور از مرحله بدوی و آغاز رشد هستند اما در مرحله اولیه دچار توقف می‌شوند. این توقف احتمالاً به علت

مواد و روش‌ها

تهیه بافت تخمدان

در این تحقیق از موش‌های سوری نابالغ نژاد NMRI (National Medical Research Institute) استفاده شد. موش‌های نابالغ ماده با سن ۲ هفته و ۳ هفته در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، دمای ۲۰-۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰-۵۰ درصد نگهداری شدند. موش‌ها طبق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تربیت مدرس به روش قطع نخاع گردنی کشته شدند. با ایجاد شکاف طولی در ناحیه شکم تخمدان‌های آن‌ها از بدن خارج و در قطرات ۳۰۰ میکرولیتری محیط کشت α -MEM

عامل رشدی تمایزی 9B (Growth Differentiation Factor 9B) از اعضای خانواده TGF- β (Transforming Growth Factor beta) است و در انسان، جوندگان و گوسفند بیان آن به تخمک محدود می‌شود. در پستانداران GDF9B محصول ژن وابسته به کروموزوم X است و در تخمک بیان می‌شود و به‌عنوان یک عامل پاراکرین (Paracrine) و اتوکرین (Autocrine) تکوین فولیکول‌ها را تحریک می‌نماید و به‌علاوه نقش مهمی در تنظیم میزان تخمک‌گذاری و کیفیت تخمک دارد. اهمیت GDF9B در مراحل اولیه تکوین فولیکول وابسته به گونه است [۴]. عوامل موضعی از جمله AMH (Anti-Müllerian Hormone)، GDF9B و GDF9 نقش تنظیمی عمده‌ای در هر دو مرحله وابسته و غیر وابسته به گنادوتروپین (Gonadotropin) در فولیکول‌ها دارند. سرنوشت نهایی هر فولیکول به تعادل بین عوامل تحریکی و مهارتی که عملکرد گنادوتروپین‌ها را تنظیم می‌کند وابسته است. GDF9B اغلب در تخمک فولیکول‌های در حال رشد یافت می‌شود؛ اگرچه mRNA آن در فولیکول‌های بدوی بعضی گونه‌ها شناسایی شده است. در گاو و انسان آغاز بیان GDF9B در تخمک فولیکول‌های اولیه است [۵]. فولیکول‌های تخمدان پستانداران بزرگ از جمله انسان، گاو و گوسفند در محیط کشت قادر به عبور از مرحله بدوی و آغاز رشد هستند اما در مرحله اولیه دچار توقف می‌شوند. این توقف احتمالاً به علت

(α -Minimal Essential Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) قرار داده شدند. گروه‌های مورد مطالعه شامل تخمدان‌های ۱۴ روزه کشت شده طبق روش کشت که در قسمت بعدی توضیح داده می‌شود و ۱۴ روزه و ۲۱ روزه کشت نشده به‌عنوان کنترل بود.

کشت تخمدان

گروه‌هایی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند شامل تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده در محیط پایه و تخمدان‌های کشت شده در محیط پایه غنی شده با ۱۰، ۲۰ و ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر rGDF9B (recombinant GDF9B) ITS بود. محیط کشت حاوی α -MEM تکمیل شده با ITS (Insuline-Transferin-Selenium) یک درصد، ۱۰۰ واحد بین‌المللی / میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin)، ۵۰ واحد بین‌المللی / میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin) تا حداکثر ۲ هفته برای استفاده در یخچال نگهداری شد. در هر کاربرد ۱۰۰ واحد بین‌المللی / میلی‌لیتر rFSH (Follicle Stimulating Hormone) و ۵ درصد FBS اضافه شد. سپس گروه‌های شاهد و تیمار شده با rGDF9B در شرایط انکوباتور مرطوب با ۵ درصد CO_2 و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تخمدان‌ها به تعداد ۳ عدد در هر چاهک و سه تکرار در هر گروه (۹ تخمدان در هر گروه) در گروه‌های مذکور تحت شرایط انکوباتور مرطوب با ۵ درصد CO_2 و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز کشت داده شد. یک روز در میان، تخمدان‌ها از نظر وضعیت حیاتی، رشد و بلوغ زیر میکروسکوپ معکوس (Invert Microscope) بررسی و با برداشتن نیمی از محیط کشت (۲۰۰ میکرولیتر)، محیط کشت تازه جایگزین آن شد.

بررسی بافت‌شناسی با میکروسکوپ نوری

تخمدان‌ها در پایان دوره کشت از درون چاهک‌های کشت

برداشته شدند. بعد از مرحله ثبوت به ترتیب آب‌گیری با الکل، شفاف‌سازی با گزیلیل (Xylyl)، آغشتگی با پارافین، قالب‌گیری و سپس برش‌گیری انجام شد. از هر نمونه تخمدان برش‌های سریال تهیه شد. ضخامت برش‌ها ۵ میکرومتر بود. برای جلوگیری از تکرار در شمارش فولیکول‌ها بین مقاطع انتخاب شده ۵ برش فاصله وجود داشت. سپس رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (Hematoxylin and Eosin) در گروه‌های مورد مطالعه (به‌صورت سه نمونه در هر گروه) انجام شد. فقط فولیکول‌هایی با هسته مشخص در تخمک برای جلوگیری از شمارش مجدد فولیکول‌ها شمارش شدند. فولیکول‌ها با ریخت‌شناسی (Morphology) طبیعی دارای تخمک یکدست و سالم و سلول‌های گرانولوزای (Granulosa Cells) منظم شمارش شدند. علاوه بر گروه‌های کشت شده، شمارش فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی در تخمدان‌های کشت نشده ۱۴ روزه (معادل روز صفر کشت) و ۲۱ روزه (معادل روز هفتم کشت) به‌عنوان گروه‌های کنترل انجام شد.

فولیکول‌های بدوی دارای یک تخمک هستند که توسط یک لایه سلول‌های گرانولوزای سنگ‌فرشی احاطه شده است. فولیکول‌های اولیه با یک لایه از سلول‌های گرانولوزای مکعبی مشخص می‌شوند. فولیکول‌های پره آنترال یا ثانویه بیشتر از یک لایه سلول گرانولوزا دارند و فاقد آنتروم هستند. فولیکول‌های آنترال (Antral Follicles) دارای یک یا دو ناحیه از تجمع مایع فولیکولی هستند.

تجزیه و تحلیل اطلاعات

ارزیابی آماری داده‌های درصد فولیکول‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Analysis of Variance: ANOVA) و آزمون تکمیلی Post Hock Tukey انجام شد. در انجام آزمون‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ استفاده شد. کلیه اطلاعات ارایه شده برحسب میانگین $\pm$ خطای استاندارد (Mean $\pm$ SE) است. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

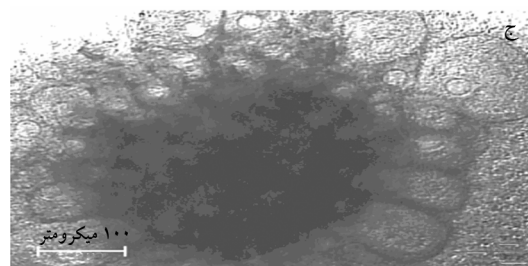
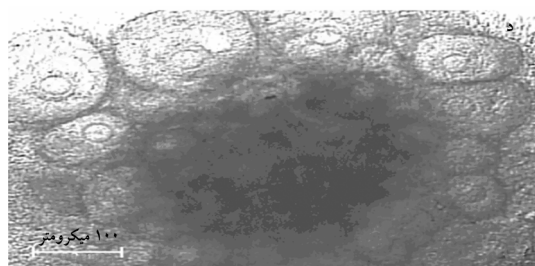
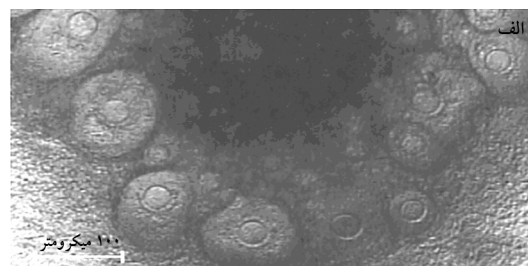
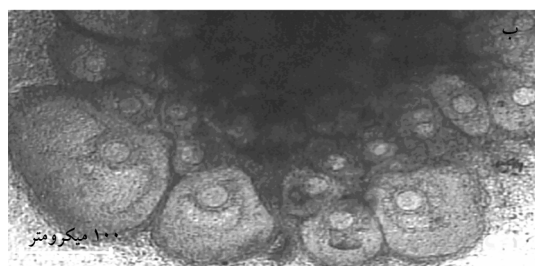
نتایج

تغییرات رشد فولیکول‌ها در تخمدان‌های کشت شده در حضور غلظت‌های مختلف GDF9B پس از یک هفته کشت در زیر میکروسکوپ معکوس در شکل ۱ نشان داده شده است. فولیکول‌های آنترال در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده در محیط پایه غنی شده با GDF9B نسبت به فولیکول‌های آنترال در گروه چهارده روزه کشت شده در محیط پایه دارای حفره آنتروم بزرگ‌تر بودند و تخمک و سلول‌های کومولوسی (Cumulus Cells) کاملاً به یک سمت رانده شده بودند. تصاویر مربوط به برش‌های بافتی گروه‌های مورد مطالعه در شکل ۲ آمده است و مشاهدات میکروسکوپ معکوس را تأیید می‌کند.

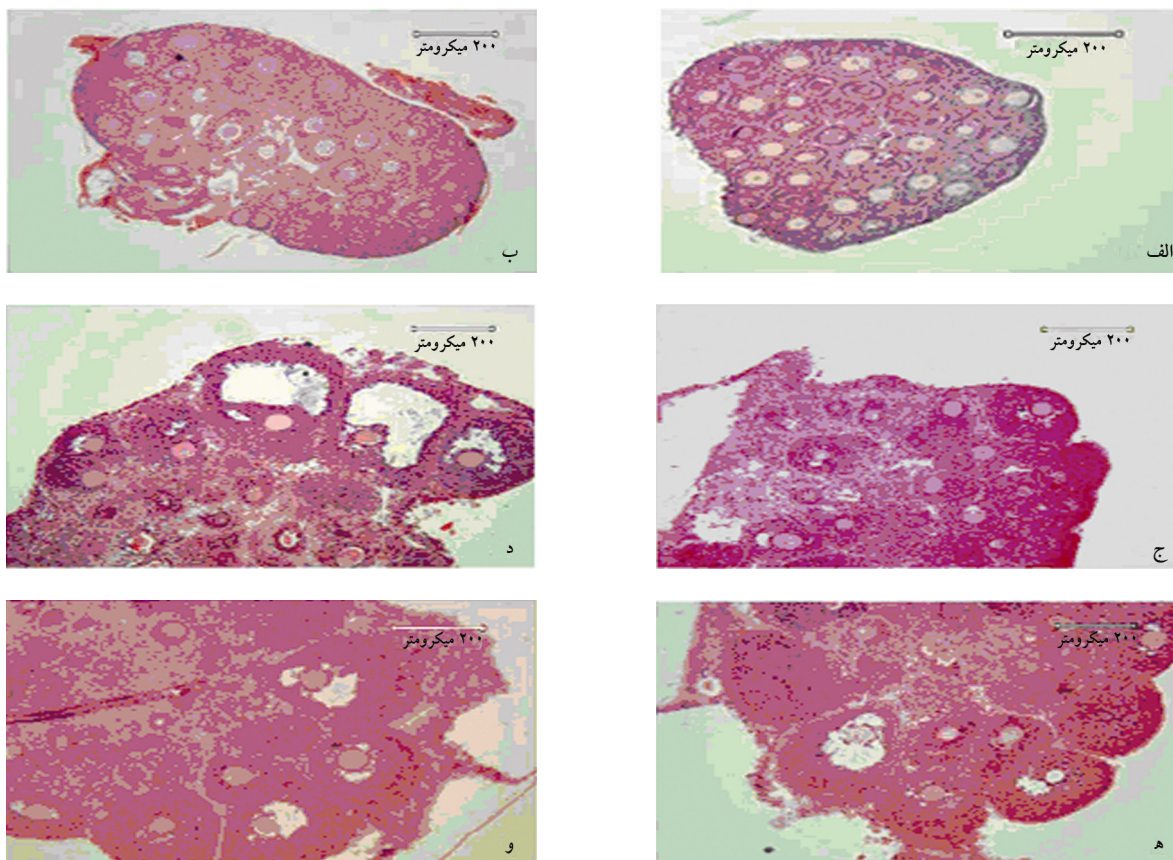
اطلاعات کمی رشد فولیکولی در تخمدان‌های کشت شده و نشده در جدول ۱ آورده شده است. درصد فولیکول‌های بدوی و اولیه در تخمدان‌های کشت شده در محیط پایه و تخمدان‌های کشت شده در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

درصد فولیکول‌های پره آنترال در تخمدان‌های کشت شده در حضور غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B به ترتیب $1/65 \pm 11/69$ ، $0/32 \pm 12/37$ و $0/65 \pm 12/60$ بود که کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کشت شده در محیط پایه $1/43 \pm 18/23$ نشان داد ($P < 0/05$). میانگین درصد فولیکول‌های آنترال در تخمدان‌های کشت شده در حضور غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B به ترتیب $27/82 \pm 0/52$ ، $24/29 \pm 0/58$ و $23/21 \pm 0/52$ بود که افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کشت شده در محیط پایه $16/36 \pm 0/34$ نشان داد ($P < 0/05$).

هرچند از نظر درصد فولیکول‌های پره آنترال و آنترال تفاوت معنی‌داری در سه دوز ۱۰، ۲۰ و ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B با یکدیگر نشان ندادند اما در غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B نمای کیفی بافت تخمدان نسبت به دو غلظت دیگر بهتر بود (شکل ۲ ب). میانگین درصد فولیکول‌های آنترال و پره آنترال در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده در محیط پایه نسبت به تخمدان‌های دست نخورده ۲۱ روزه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت.



شکل ۱ تصاویر میکروسکوپ معکوس از تخمدان‌های کشت شده؛ (الف) گروه چهارده روزه کشت شده در محیط پایه، (ب) گروه چهارده روزه کشت شده در محیط پایه غنی شده با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B، (ج) گروه چهارده روزه کشت شده در محیط پایه غنی شده با ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B، (د) گروه چهارده روزه کشت شده در محیط پایه غنی شده با ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B؛ همان گونه که در شکل مشخص است تعداد زیادی فولیکول آنترال با حفره مشخص در حاشیه بافت دیده می‌شود.



شکل ۲ ریخت‌شناسی تخمدان‌های کشت شده موش با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین؛ (الف) گروه ۱۴ روزه کنترل کشت نشده (ب) گروه ۲۱ روزه کنترل کشت نشده (ج) گروه چهارده روزه کشت شده در محیط پایه، (د) گروه چهارده روزه کشت شده در محیط پایه غنی شده با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B، (ه) گروه چهارده روزه کشت شده در محیط پایه غنی شده با ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B (و) گروه چهارده روزه کشت شده در محیط پایه غنی شده با ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B؛ همان گونه که در تصاویر دیده می‌شود در گروه‌های کشت شده در حضور تعداد فولیکول‌های آنترال بیشتر و واضح‌تر است.

جدول ۱ پراکندگی فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوینی در تخمدان‌های کشت شده در حضور غلظت‌های مختلف GDF9B (Mean $\pm$ SE)

گروه‌ها	۱۴ روزه کشت شده	۱۴ روزه کشت نشده	۲۱ روزه کشت نشده
GDF9B نانوگرم / میلی‌لیتر	صفر	۱۰	۲۰
تعداد کل فولیکول	۲۲۳	۲۵۸	۲۰۹
(Mean $\pm$ SE)	۴۹/۱۹ $\pm$ ۰/۵۹	۵۰/۱۴ $\pm$ ۲/۴۸	۵۰/۲۲ $\pm$ ۰/۶۰
فولیکول‌های بدوی	۱۰۸	۱۲۸	۱۰۵
(Mean $\pm$ SE)	۱۵/۱۸ $\pm$ ۰/۶۱	۱۳/۱۹ $\pm$ ۲/۰۷	۱۳/۸۳ $\pm$ ۰/۳۲
فولیکول‌های اولیه	۳۵	۳۵	۲۹
(Mean $\pm$ SE)	۱۸/۲۳ $\pm$ ۱/۴۳	۱۱/۶۹ $\pm$ ۱/۶۵	۱۲/۳۷ $\pm$ ۰/۳۲
فولیکول‌های پره آنترال	۴۱	۲۸	۲۶
(Mean $\pm$ SE)	۱۶/۳۶ $\pm$ ۰/۳۴	۲۷/۸۲ $\pm$ ۰/۳۷	۲۴/۲۹ $\pm$ ۰/۵۲
فولیکول‌های آنترال	۳۸	۶۷	۴۹
(Mean $\pm$ SE)	۱۵/۳۷ $\pm$ ۰/۳۵	۰*	۲۳/۲۱ $\pm$ ۰/۵۸
تعداد	۴۵	۰	۵۵

*: اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) با گروه کنترل کشت

گونه‌های دیگر بیان mRNA عامل GDF9B دیده نشده است [۱۹]. با این حال آغاز بیان GDF9B در تخمک فولیکول‌هایی که در مرحله انتقال از فاز اولیه به ثانویه هستند مشاهده می‌شود. مشخص شده پروتئین و mRNA مربوط به GDF9B در فولیکول‌های بدوی در تخمدان‌های به‌دست آمده از زنان قابل شناسایی است اما برای اثبات اثر GDF9B در فعال‌سازی فولیکول‌های تخمدانی به مطالعات گسترده‌ای نیاز است [۱۹].

نتایج این تحقیق نشان داد که میانگین درصد فولیکول‌های آنترال و پره آنترال در تخمدان‌های چهارده روزه کشت شده در محیط پایه نسبت به تخمدان‌های دست نخورده ۲۱ روزه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارد. این مسأله نشان دهنده این است که تخمدان‌های ۱۴ روزه پس از یک هفته کشت در محیط پایه از نظر تکوینی خود را به تخمدان‌های دست نخورده ۲۱ روزه رسانده‌اند که نشان دهنده شرایط کشت مطلوب بوده است.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تکوین فولیکول‌ها در حضور سه دوز ۱۰، ۲۰ و ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDF9B از نظر درصد فولیکول‌های پره آنترال و آنترال تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارد. گرچه در غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر اندازه فولیکول‌ها بزرگ‌تر بود شاید این مسأله نشان دهنده کیفیت متفاوت این فولیکول‌ها در مقایسه با بقیه باشد که نیاز به تحقیق بیشتری دارد.

به‌نظر می‌رسد شاید یکی از اصلی‌ترین عوامل در عدم مشاهده تفاوت معنی‌داری در تکوین فولیکول‌ها در این سه دوز می‌تواند مربوط به عدم تفاوت در بروز گیرنده GDF9B در این گروه از فولیکول‌ها باشد که حتی با تغییر در غلظت این عامل پاسخگویی سلول‌ها تفاوتی نکرده است که می‌توان با بررسی بروز گیرنده آن به این فرضیه رسید.

بنابراین نتایج تحقیق حاضر نشان داد GDF9B در رشد و تکوین فولیکول‌های مرحله پره آنترال به آنترال مؤثر بوده و تأثیر قابل توجهی در تکوین فولیکول‌های مرحله بدوی به اولیه نداشته است.

در این مطالعه براساس نتایج بافت‌شناسی تخمدان‌های کشت شده در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف GDF9B نسبت به گروه کشت شده در محیط پایه افزایش معنی‌داری در درصد فولیکول‌های آنترال و کاهش معنی‌داری در درصد فولیکول‌های پره آنترال نشان دادند. با توجه به این‌که GDF9B در حالت طبیعی توسط سلول تخمک ترشح می‌شود و با اثر بر گیرنده خود بر سلول‌های گرانولوزا منجر به تکثیر آن‌ها می‌شود انتظار می‌رود که اثر مشابهی در محیط کشت بر تکوین فولیکول‌ها داشته باشد. اگرچه در تحقیق حاضر بر بیان گیرنده GDF9B در فولیکول‌های مراحل مختلف تکوینی مطالعه‌ای صورت نگرفته اما تحقیقات قبلی همگی مؤید این است که این عامل در تخمک فولیکول‌های مراحل اولیه تا آنترال بیان می‌شود و به‌واسطه گیرنده خود بر سلول‌های گرانولوزا بر تکوین فولیکولی تأثیر می‌گذارد [۱۳، ۱۴]. احتمالاً در فولیکول‌های پره آنترال میزان بروز گیرنده این عامل می‌بایست بیشتر از فولیکول‌های بدوی و اولیه باشد که سبب شده فولیکول‌های مرحله پره آنترال پاسخ قابل توجهی به این عامل نشان دهند. در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتری است تا درستی یا نادرستی این فرضیه مشخص شود. در مطالعات قبلی بروز گیرنده مربوط به GDF9B در فولیکول‌های تخمدان گوسفند تا قبل از آغاز رشد فولیکول‌ها غیر قابل تشخیص بوده است و همچنین این گیرنده در تخمک و سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های آنترال خوک قابل شناسایی بوده و طی مرحله پیش از تخمک‌گذاری بیان آن افزایش نشان داده است [۱۵، ۱۶].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تکوین فولیکول‌های پره آنترال به فولیکول‌های مرحله آنترال در حضور GDF9B افزایش می‌یابد. در حالی که بعضی تحقیقات به تأثیر GDF9B بر رشد فولیکول‌های مراحل بدوی و اولیه اشاره دارد [۱۷] و تاکنون در بین همه گونه‌هایی که بررسی شده‌اند mRNA مربوط به GDF9B فقط در فولیکول‌های بدوی گونه *Brushtail Possum* مشاهده شده است [۱۸] و نیز در فولیکول‌های اولیه بسیاری از

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد است

گروه علوم تشریح است که با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

- [1] Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 2005; 11(5): 461-71.
- [2] Terada N, Kuroda H, Nakayama H, Matsumoto K, Kitamura Y. Effect of genetically defined oocyte depletion on production of androgens and oestrogens by ovaries of suckling mice. *J Steroid Biochem* 1986; 25(1): 83-9.
- [3] Campbell BK. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Anim Reprod* 2009; 6(1): 159-71.
- [4] Vitt UA, Hsueh AJ. Stage-dependent role of growth differentiation factor-9 in ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 183(1-2): 171-7.
- [5] Moore RK, Erickson GF, Shimasaki S. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15(8): 356-61.
- [6] Thomas FH, Ethier JF, Shimasaki S, Vanderhyden BC. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology* 2005; 146(2): 941-9.
- [7] Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol* 2006; 296(2): 514-21.
- [8] Mery L, Lefevre A, Benchaib M, Demirci B, Salle B, Guerin JF, Lornage J. Follicular growth in vitro: detection of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) during in vitro culture of ovine cortical slices. *Mol Reprod Dev* 2007; 74(6): 767-74.
- [9] Kedem A, Fisch B, Garor R, Ben-Zaken A, Gizunterman T, Felz C, Ben-Haroush A, Kravarusic D, Abir R. Growth differentiating factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 both activate development of human primordial follicles in vitro, with seemingly more beneficial effects of GDF9. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(8): E1246-54.
- [10] Lima IM, Brito IR, Rossetto R, Duarte AB, Rodrigues GQ, Saraiva MV, Costa JJ, Donato MA, Peixoto CA, Silva JR, de Figueiredo JR, Rodrigues AP. BMPRII and BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the in vitro effects of BMP-15 on preantral follicle development. *Cell Tissue Res* 2012; 348(1): 225-38.
- [11] Fenwick MA, Mora JM, Mansour YT, Baithun C, Franks S, Hardy K. Investigations of TGF- β signaling in preantral follicles of female mice reveal differential roles for bone morphogenetic protein 15. *Endocrinology* 2013; 154(9): 3423-36.
- [12] Pramod RK, Sharma SK, Singhi A, Pan S, Mitra A. Differential ovarian morphometry and

- follicular expression of BMP15, GDF9 and BMPR1B influence the prolificacy in goat. *Reprod Domest Anim* 2013; 48(5): 803-9.
- [13] Otsuka F, Moore RK, Iemura S, Ueno N, Shimasaki S. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289(5): 961-6.
- [14] Margulis S, Abir R, Felz C, Nitke S, Krissi H, Fisch B. Bone morphogenetic protein 15 expression in human ovaries from fetuses, girls, and women. *Fertil Steril* 2009; 92(5): 1666-73.
- [15] Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Gardner DK, Gilchrist RB, Thompson JG. Metabolic differences in bovine cumulus-oocyte complexes matured in vitro in the presence or absence of follicle-stimulating hormone and bone morphogenetic protein 15. *Biol Reprod* 2012; 87(4): 87.
- [16] Paradis F, Novak S, Murdoch GK, Dyck MK, Dixon WT, Foxcroft GR. Temporal regulation of BMP2, BMP6, BMP15, GDF9, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2 and TGFBR1 mRNA expression in the oocyte, granulosa and theca cells of developing preovulatory follicles in the pig. *Reproduction* 2009; 138(1): 115-29.
- [17] Wang J, Roy SK. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 2004; 70(3): 577-85.
- [18] Eckery DC, Whale LJ, Lawrence SB, Wyde KA, McNatty KP, Juengel JL. Expression of mRNA encoding growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 during follicular formation and growth in a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Mol Cell Endocrinol* 2002; 192(1-2): 115-26.
- [19] Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2003; 78(3-4): 135-63.
- [20] Passos MJ, Vasconcelos GL, Silva AW, Brito IR, Saraiva MV, Magalhães DM, Costa JJ, Donato MA, Ribeiro RP, Cunha EV, Peixoto CA, Campello CC, Figueiredo JR, van den Hurk R, Silva JR. Accelerated growth of bovine preantral follicles in vitro after stimulation with both FSH and BMP-15 is accompanied by ultrastructural changes and increased atresia. *Theriogenology* 2013; 79(9): 1269-77.