

The Effects of Different Concentrations of Ovarian Tissue Extract on Preantral Mouse Follicle Development after Three-dimensional Culture

Hamed Shoorei¹, Mojdeh Salehnia^{2*}, Shabnam Abdi³

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

3- Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Islamic Azad University of Medical Sciences, Tehran, Iran

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

Received: 09/Jan/2017, Accepted: 15/Apr/2017

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of ovarian tissue extract on isolated preantral follicle growth, maturation, and hormone production of neonatal mouse ovaries after three-dimensional culture.

Methods: We obtained the tissue extract from adult mouse ovaries and determined their protein concentrations by the Bradford method. The experimental group comprised mechanically isolated preantral follicles after encapsulation with alginate hydrogel in α -MEM supplemented with different concentrations of ovarian tissue extract and in 10% fetal bovine serum as the control group. Both groups were cultured for 12 days. At the end of the culture period, we assessed the mean diameters, survival and maturation rates, production of 17- β estradiol, and progesterone hormones.

Results: The follicles cultured in different concentrations of ovarian tissue extract underwent degeneration, with the exception of the group that contained tissue extract (one-half the protein level of FBS) which had a 71.78% survival compared to the control (75%). The average follicle diameter, rate of MII oocytes, production of 17- β estradiol, and progesterone hormones were significantly higher in the group supplemented with ovarian tissue extract (one-half the protein level of FBS) compared to the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: Ovarian tissue extract, as a proliferation and maturation factor, leads to growth, maturation, and better function of preantral follicles. This extract can be used to improve the in vitro follicular culture in a dose-dependent manner.

Keywords: Ovarian tissue extract, Culture of follicles, Sodium alginate

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.4, Pages: 41-53

آثار غلظت‌های مختلف عصاره بافت تخمدان بر تکوین فولیکول‌های پره آنترال موش پس از کشت سه بعدی

حامد شورایی^۱، مژده صالح نیا^{۲*}، شبنم عبدی^۳

۱- کارشناسی 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

۳- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

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

Email: salehnim@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۵/۱۰/۱۹

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۱/۲۶

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی آثار غلظت‌های مختلف عصاره بافت تخمدان بر رشد و بلوغ فولیکولی و همچنین تولید هورمون‌های استروئیدی پس از کشت سه بعدی بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا عصاره بافت تخمدان‌های موش بالغ تهیه شد؛ سپس میزان پروتئین آن‌ها محاسبه شد. فولیکول‌های پره آنترال نیز از تخمدان‌های موش‌های نابالغ جدا شدند و پس از کیسوله شدن با هیدروژل آلژینیت در محیط کشت پایه α -MEM غنی شده با غلظت‌های ۴ برابر، ۲ برابر، مساوی، ۱/۲ (یک دوم) و ۱/۴ (یک چهارم) و ۱/۸ (یک هشتم) پروتئین موجود سرم گاوی از عصاره تخمدان در مقایسه با گروه شاهد که محیط پایه حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو بود، به مدت ۱۲ روز کشت شدند. طی دوره کشت بررسی میانگین قطر، میزان بقا، میزان رشد و بلوغ فولیکول‌ها و همچنین تولید هورمون ۱۷-بتا استرادیول و پروژسترون ارزیابی شد.

نتایج: فولیکول‌های کشت شده در تمام غلظت‌های مختلف عصاره تخمدان رشد خوبی نداشت و فقط در گروه حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با ۱/۲ پروتئین موجود در پروتئین سرم گاوی نرخ زدن ماندن ۷۱/۷۸ درصد در مقایسه با گروه کنترل که ۷۵ درصد بود داشت. در این گروه نیز میانگین قطر فولیکول‌ها، میزان تخمک‌های بالغ (MII)، میزان ترشح هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول و پروژسترون افزایش قابل توجهی را نسبت به گروه کنترل داشت ($P \geq 0.05$).

نتیجه‌گیری: بنابراین در مجموع از مطالعه حاضر چنین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره بافت تخمدان به‌عنوان یک عامل تکثیری و بلوغی باعث افزایش رشد و تکوین فولیکول‌های پره آنترال تا مرحله بلوغ می‌شود و می‌تواند بر عملکرد آن‌ها نیز تأثیر داشته باشد و برای بهبود شرایط کشت آزمایشگاهی فولیکول‌ها استفاده شود و این امر کاملاً وابسته به مقدار عصاره به کار گرفته شده است.

کلیدواژگان: عصاره بافت تخمدان، کشت آزمایشگاهی فولیکول، سدیم آلژینیت

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵، صفحات: ۴۱-۵۳

رشد و بلوغ فولیکول‌های تخمدان در محیط کشت یک روش برای ارزیابی تأثیر مواد شیمیایی، عوامل مؤثر بر مکانیسم فولیکوژنیز (Folliculogenesis)، کیفیت، ساختار ژنتیکی تخمک، و افزایش قدرت باروری در تکنولوژی کمکی تولید مثل (Assisted Reproductive Technology) دارد [۱-۴]. رشد و تکوین فولیکول‌ها در تخمدان به تغییرات ریخت‌شناختی و عملکردی سلول‌های گرانولوزا (Granulosa cells) و تکایی (Theca cells) و ارتباط پیچیده آن‌ها با تخمک وابسته است. علاوه بر این؛ سلول‌های گرانولوزا و تخمک طیف وسیعی از عوامل رشد اتوکرین (Autocrine)، پاراکرین (Paracrine) و اندوکرین (Endocrine) را تولید می‌کنند که می‌توانند رشد فولیکول را تحت تأثیر قرار دهند و موجب بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک شوند [۵-۸]. امروزه سیستم‌های کشت آزمایشگاهی متعددی معرفی شده است که شرایط رشد و تکوین فولیکول‌های تخمدانی و بلوغ تخمک را فراهم می‌کند [۹]. سیستم کشت سه بعدی یکی از سیستم‌های جدید کشت آزمایشگاهی فولیکول‌های تخمدانی است که ساختار کروی و ارتباط بین تخمک و سلول‌های فولیکولی حفظ می‌شود و اجازه بررسی انواع عوامل مختلف دخیل در رشد فولیکول و همچنین عوامل غیر محلول مانند ماتریکس خارج سلولی را فراهم می‌کند. مطالعات متعددی نشان داده است که کشت فولیکول در هیدروژل‌هایی مانند سدیم آلژینات (Alginate sodium) می‌تواند موجب رشد فولیکول شود و تخمک‌هایی با قابلیت لقاح را تولید می‌کند [۱۰، ۱۱]. طی انجام کشت فولیکول در محیط سه بعدی می‌توان اثر ترکیبات مختلف را بر روند رشد و تکوین فولیکول بررسی کرد. از این رو تحقیقات زیادی در خصوص بهبود شرایط کشت فولیکول در محیط کشت به‌منظور افزایش رشد و تکوین فولیکول با اضافه کردن عوامل مؤثر در تکوین و بقا صورت گرفته است [۱۲، ۱۳].

عوامل پر اهمیت تنظیم‌کننده مکانیسم فولیکوژنیز را

عصاره تخمدان و تکوین فولیکولی

می‌توان به سه دسته عوامل رشدی، بلوغی و آنتی‌اکسیدانی تقسیم‌بندی کرد. عوامل رشدی مانند Activin، Kit ligand، EGF، Growth differentiation Factor 9-B (Fibroblast growth factor) یا عامل رشد فیبروبلاست (Proliferation) در تنظیم عملکردهای تخمدان مانند تکثیر (Proliferation) سلول‌های گرانولوزا، هورمون‌سازی و تمایز نقش دارند [۱۴-۱۷]. از جمله عوامل بلوغی می‌توان به گنادوتروپین‌ها (Gonadotropins)، استروئیدها و ترکیبات شیمیایی موجود در مایع فولیکولی اشاره کرد. غلظت بالای این هورمون‌ها در مایع فولیکولی باعث افزایش نرخ بلوغ تخمک و افزایش شانس لقاح می‌شود [۱۸، ۱۹]. همچنین گنادوتروپین‌ها نقش مهمی در ترشح چندین ماده از سلول‌های گرانولوزا را برعهده دارند، مثل اسید هیالورونیک (Hyaluronic acid) که روی بلوغ تخمک اثر گذار است [۲۰]. در مطالعات صورت گرفته نشان داده شده است که استروژن موجود در مایع فولیکولی دارای آثار ضد آترزی است و باعث رشد بهتر فولیکولی می‌شود [۲۱]. مایع فولیکولی حاوی مقادیر زیادی از اجزا سرمی به‌همراه ترشحاتی مانند عوامل رشدی از قبیل EGF و عامل رشد عروقی (Vascular growth factors) یا هورمون آنتی‌مولرین (anti Mullerian hormone) است که به‌وسیله سلول‌های خاصی از ریز محیط فولیکول ساخته می‌شود [۲۲]. همچنین در برخی از آزمایش‌ها نیز اثر مایع فولیکولی بر روند رشد و تکوین فولیکولی بررسی شده است [۱۹، ۲۳]. در بیشتر مطالعات انجام شده، اثر یکی از عوامل مطرح شده بر روند رشد و تکوین فولیکولی ارزیابی شده است و با توجه به نیاز فولیکول به عوامل متنوع رشدی و با توجه به اینکه تخمدان محل اصلی تکوین فولیکولی است؛ به‌نظر می‌رسد که عصاره بافت تخمدان به‌عنوان یک سیستم چند عاملی می‌تواند حاوی ترکیبات بیوشیمیایی مختلفی باشد که بر روند رشد و بلوغ فولیکول‌های تخمدانی در محیط کشت تأثیر داشته باشد. گرچه در برخی از تحقیقات اثر مایع فولیکولی بر روند رشد و تکوین فولیکولی بررسی شده است، اما تاکنون

آثار عصاره بافت تخمدان بر رشد و تکوین فولیکولی بررسی نشده است.

بنابراین به این منظور در این تحقیق آثار غلظت‌های مختلف عصاره بافت تخمدان بالغ بر روند رشد و تکوین فولیکولی و نیز عملکرد آن‌ها با ارزیابی هورمون‌های استروئیدی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه تخمدان‌ها

در این تحقیق از ۲۰ سر موش‌های سوری نابالغ با سن ۱۲ تا ۱۴ روزه و ۱۵ سر موش بالغ ۷ تا ۸ هفته ماده نژاد NMRI (National Medical Research Institute) استفاده شد. موش‌های نابالغ را برای خارج کردن بافت تخمدان و جداسازی فولیکول‌های آن‌ها برای کشت سه بعدی و موش‌های بالغ، برای تهیه عصاره بافت تخمدانی در نظر گرفته شدند. موش‌ها طبق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تربیت مدرس به شماره نامه ۵۲۴/۹۲۸۴ مورخ ۹۶/۱۲/۲۶ به روش جابجایی مهره‌های گردنی قطع نخاع شدند. پس از ایجاد شکاف در شکم موش تخمدان‌های آن‌ها از بدن خارج و در شرایط استریل به قطرات ۳۰۰ میکرولیتری محیط کشت α -MEM (α -Minimal Essential Medium) (Gibco، آمریکا) حاوی ۵ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco، آمریکا) منتقل شدند. چربی و بافت‌های اضافی اطراف تخمدان به کمک سوزن سرنگ انسولین جدا شد و تخمدان‌ها پس از شستشو در محیط، در انکوباتور نگهداری شدند و در مراحل تحقیق بررسی شدند.

تهیه عصاره بافت تخمدان

تخمدان‌ها جدا شده (۳۰ تخمدان در سه تکرار) از موش‌های بالغ به مدت ۱ دقیقه داخل محلول آمونیوم کلراید پتاسیم داده شدند تا گلبول‌های قرمز آن‌ها لیز شوند. پس از

شستشو با بافر (Phosphate Buffer Saline) PBS تخمدان‌های مزبور با اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر بافر Tris-HCL و همچنین افزودن ۵۰ میکرولیتر محلول مهارکننده پروتئاز یک‌دست شدند. در انتها محلول مورد نظر با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول بالایی برداشت شده و به عنوان عصاره بافت در نظر گرفته شد سپس میزان پروتئین عصاره بافت محاسبه شد [۲۴].

اندازه‌گیری پروتئین نمونه‌های عصاره بافتی

۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی (Supernatant) تهیه شده از عصاره بافت تخمدان برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین آن مورد استفاده قرار گرفت، مقدار پروتئین به روش بیوره (Biuret) محاسبه شد [۲۵]. میزان پروتئین موجود در FBS به عنوان شاخصی برای انتخاب غلظت‌های مختلف عصاره تخمدان استفاده شد. با توجه به میزان پروتئین در عصاره تخمدان غلظت‌های مختلف ۴ برابر، ۲ برابر، مساوی، ۱/۲ (یک دوم) و ۱/۴ (یک چهارم) و ۱/۸ (یک هشتم) پروتئین موجود در FBS تهیه شد.

جداسازی و کپسوله کردن فولیکول‌ها

فولیکول‌ها پره آنترال (Preantral follicle) با قطر ۱۵۰ تا ۱۷۰ میکرومتر از تخمدان‌های نابالغ به روش مکانیکی جدا شدند (۲۵۰ فولیکول در ۵ تکرار). برای کشت سه بعدی در ابتدا سدیم آلزینیت (Sigma، آمریکا) با غلظت ۰/۵ درصد با PBS ترکیب شد و پس از مخلوط شدن با ۰/۵ گرم زغال فعال شده به ازای هر گرم از پودر سدیم با فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. فولیکول‌ها به طور جداگانه به قطره ۷ میکرولیتری سدیم آلزینیت منتقل شدند و با استفاده از سر میکروپیپت به حمام کلسیم که ترکیبی از ۱۴۰ میلی‌مول CaCl_2 و ۵۰ میلی‌مول NaCl بود برای ایجاد پیوندهای کلسیم و تشکیل هیدروژل، منتقل شدند و پس از ۲ دقیقه

عصاره تخمدان و تکوین فولیکولی

موجود در FBS (۲۴ عدد).

- فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه غنی شده با عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS (۶۸ عدد).

- فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه غنی شده با عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۱/۴ (یک چهارم) پروتئین موجود در FBS (۳۲ عدد).

- فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه غنی شده با عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۱/۸ (یک هشتم) پروتئین موجود در FBS (۲۰ عدد).

پس از جمع‌آوری نتایج این بخش و بررسی نرخ بقا و رشد فولیکول‌ها در طی دوره کشت، بهترین غلظت برای مطالعات بعدی میزان عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در سرم FBS انتخاب شد.

القای تخمک گذاری

در روز انتهای روز ۱۲ کشت، برای القا تخمک‌گذاری، محیط کشت قطره‌ها با محیط پایه حاوی ۱/۵ واحد بین المللی/میلی لیتر hCG (Human chorionic gonadotropin) تعویض شد. سپس تا ۱۸ ساعت بعد، تخمک‌های بالغ متافاز دو (MII) جمع‌آوری و شمارش شدند. در پایان این مرحله تعداد و درصد تکوین تخمک بررسی و ثبت شد.

اندازه‌گیری قطر و رشد فولیکول‌ها

برای اندازه‌گیری قطر فولیکول‌ها فقط در دو گروه که بیشترین میزان زنده ماندن و تکوین را داشتند یعنی گروه کشت شده در عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در سرم FBS و گروه کنترل (در هر گروه تعداد ۲۰ فولیکول مورد ارزیابی قرار گرفت) در روز شروع کشت، ششم و دوازدهم با استفاده از میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۱۰۰× عکس تهیه شد. پس از آن توسط نرم‌افزار Image.J میانگین دو قطر عمود بر هم فولیکول‌ها بر حسب

قطره‌های هیدروژل آلژینیت جمع‌آوری و در محیط کشت شستشو شد. سپس هر فولیکول کپسوله شده به درون قطره‌های ۳۰ میکرولیتری از محیط کشت در زیر روغن در پلیت‌های ۳ سانتی‌متری برای کشت منتقل شدند.

کشت سه بعدی فولیکول‌های پره آنترال در

غلظت‌های مختلف عصاره تخمدان

فولیکول‌های جدا شده در محیط کشت پایه α -MEM حاوی ۱ درصد ITS (Insulin-Teransferrin-Selenium) (Gibco، آمریکا)، ۱۰۰ واحد بین المللی/میلی لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ میلی واحد بین المللی/میلی لیتر rFSH (Recombinant follicle stimulating hormone) (Serono، سوئیس)، غنی شده با غلظت‌های مختلف عصاره بافت تخمدان کشت شدند و همچنین گروه فاقد عصاره تخمدان و تکمیل شده با ۱۰ درصد FBS به عنوان گروه شاهد (کنترل) در نظر گرفته شد. فولیکول‌ها به مدت ۱۲ روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ CO₂ درصد کشت شدند. یک روز در میان نصف محیط کشت با محیط جدید تعویض شد و محیط‌های جمع شده در روز دوازدهم در فریزر و در برودت ۲۰- درجه سانتی گراد تا اندازه‌گیری هورمون نگهداری شد.

گروه‌های مورد مطالعه شامل موارد زیر بود:

- فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه حاوی ۱۰ درصد FBS (۶۲ عدد).
- فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه غنی شده با عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۴ برابر پروتئین موجود در FBS (۲۰ عدد).
- فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه غنی شده با عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۲ برابر پروتئین موجود در FBS (۲۴ عدد).
- فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه غنی شده با عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت برابر پروتئین

تحلیل آماری

نتایج حاصل از آزمایش‌های مختلف به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) بیان شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار spss نسخه ۲۲ و آزمون آنالیز واریانس (one way Analysis Of Variance: ANOVA) تجزیه و تحلیل شد. سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

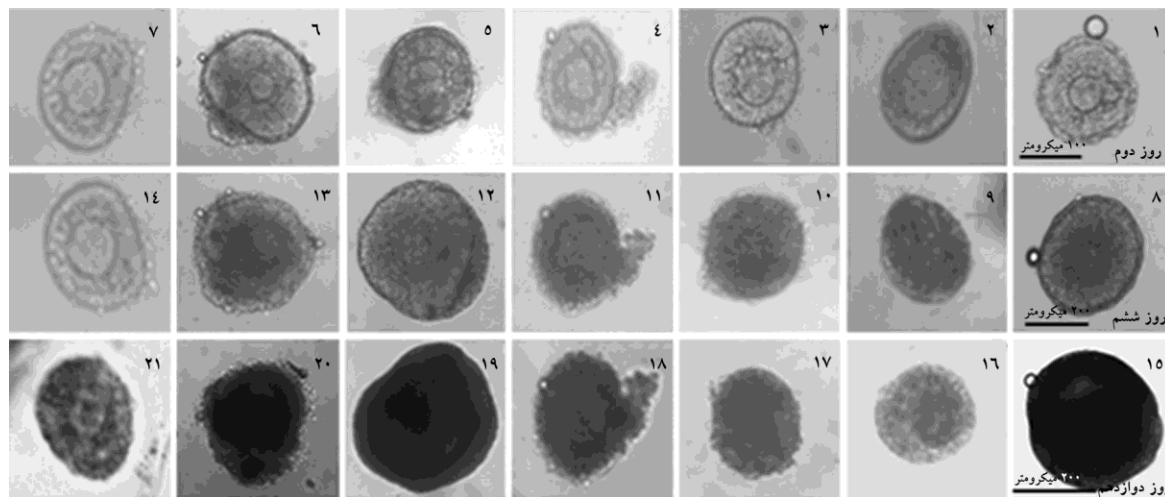
بررسی میکروسکوپی تکوین فولیکول‌ها در گروه‌های مورد بررسی

نتایج ریخت شناسی فولیکول‌های کشت شده که به وسیله میکروسکوپ معکوس (Inverted microscope) مشاهده شده بودند (شکل ۱) نشان داد که در روز صفر کشت (شروع کشت)، تمام فولیکول‌ها نمای کاملاً طبیعی دارند. داشتن تخمک گرد و مرکزی، سلول گرانولوزای یکدست و غشای پایه سالم از ویژگی‌های یک فولیکول طبیعی بود.

میکرومتر محاسبه شد. میزان بقا فولیکول‌ها زیر میکروسکوپ معکوس در گروه‌ها بررسی شد. تشکیل حفره آنتروم (Antrum) از روز شش به بعد مشاهده و ثبت شد.

ارزیابی هورمونی

به منظور ارزیابی عملکرد و رشد فولیکول‌ها میزان ترشح هورمون‌های ۱۷ بتا استرادیول (beta Estradiol) و پروژسترون (Progesterone) در روز دوازدهم در محیط کشت جمع‌آوری شده گروه کنترل و گروه حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS ارزیابی شد. تعداد نمونه‌ها در هر گروه حداقل پنج و در سه تکرار بود. غلظت ۱۷ بتا استرادیول با استفاده از روش (Enzyme Immuno Assay (Monobind، آمریکا) (حساسیت = ۶/۵ پیکوگرم/میلی لیتر) و همچنین سطح هورمون پروژسترون با استفاده از روش (ELISA (DiaPlus، آمریکا) (حساسیت = ۰/۱ نانوگرم/میلی لیتر) برای هر یک از گروه‌های کنترل و آزمون بررسی شد.



شکل ۱ تصاویر فولیکول‌های کشت شده در گروه‌های مختلف مطالعه. ردیف اول مربوط به روز دوم (۱-۷) کشت است و ردیف دوم مربوط به روز ششم (۸-۱۴) و ردیف سوم مربوط به روز دوازدهم (۱۵-۲۱) کشت است. ستون اول مربوط به گروه کنترل یا محیط پایه حاوی ۱۰ درصد FBS (۱، ۸، ۱۵)، ستون دوم گروه حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۴ برابر پروتئین موجود در FBS (۲، ۹، ۱۶)، ستون سوم حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۲ برابر پروتئین موجود در FBS (۳، ۱۰، ۱۷)، ستون چهارم محیط پایه حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت مساوی پروتئین موجود در FBS (۴، ۱۱، ۱۸)، ستون پنجم گروه حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS (۵، ۱۲، ۱۹)، ستون ششم حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۱/۴ (یک چهارم) پروتئین موجود در FBS (۶، ۱۳، ۲۰) و ستون آخر حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۱/۸ (یک هشتم) پروتئین موجود در FBS (۷، ۱۴، ۲۱).

عصاره تخمدان و تکوین فولیکولی

شده با ۱/۲ (یک دوم) و ۱/۴ (یک چهارم) پروتئین موجود در FBS و در گروه کنترل یعنی محیط پایه حاوی ۱۰ درصد FBS به ترتیب 1.1 ± 0.1 و 0.75 ± 0.3 درصد بود. و این نرخ در روز دوازدهم کشت، به ترتیب در گروه های قبلی 0.4 ± 0.071 ، 0.2 ± 0.093 و 0.3 ± 0.075 درصد بود. در گروه حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با ۱/۴ (یک چهارم) پروتئین موجود در FBS از نظر آماری کمترین نرخ زنده ماندن را در روزهای ششم تا دوازدهم را داشت ($P < 0.05$)، اما بین دو گروه دیگر تفاوت معنی دار نبود.

قطر فولیکول های کشت شده

با توجه به نرخ زنده ماندن فولیکول ها در گروه های مختلف، فقط مقایسه قطر فولیکول های پره آنترال کشت شده در حضور عصاره بافت تخمدان معادل شده با ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS (گروه آزمون) با گروه کنترل صورت پذیرفت؛ در روز دوم، ششم و دوازدهم در جدول ۲ آورده شده است. از لحاظ آماری، در روز شش و دوازده کشت میانگین قطر فولیکول های کشت شده در گروه آزمون به طور معنی دار در مقایسه با گروه فولیکول های کشت شده در محیط پایه حاوی ۱۰ درصد FBS (گروه کنترل) افزایش داشت ($P < 0.05$).

تکوین فولیکول های کشت شده

با توجه به نرخ زنده ماندن فولیکول ها در گروه های مختلف فقط تکوین فولیکول های کشت در غلظت عصاره بافت معادل شده با ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS و محیط پایه حاوی ۱۰ درصد FBS (گروه کنترل) مقایسه شد. پس از پایان دوره کشت میزان تشکیل آنتروم و بلوغ تخمک های حاصل از فولیکول های کشت شده در گروه های مورد مطالعه در جدول ۳ بیان شده است. میزان درصد تشکیل آنتروم نیز در گروه کنترل و آزمون به ترتیب $64 \pm 26/5$ و $78 \pm 21/51$ بود و از نظر آماری تفاوت معنی داری نداشت.

از روز دوم کشت به بعد فولیکول های کشت شده در غلظت های ۴ برابر، ۲ برابر و مساوی پروتئین موجود در FBS روند تیره و سیاه شدن را نشان دادند که نمایانگر تخریب فولیکولی بود و این مشاهدات در روز ششم نشان داد که هیچ یک از فولیکول ها زنده نبودند. این در حالی است که در بقیه گروه ها یعنی فولیکول های کشت شده در غلظت ۱/۴ (یک چهارم) و ۱/۸ (یک هشتم) پروتئین موجود در FBS علائمی از تخریب را نشان دادند و این در حالی است که فولیکول های کشت شده در محیط حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS و نیز گروه شاهد رشد قابل توجهی داشتند.

در روز دوازدهم کشت، اغلب فولیکول های کشت شده در حضور غلظت عصاره بافت معادل شده با ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS به حداکثر روند رشد و بلوغ خود رسیدند و حفره آنتروم قابل رویت بود و تخمک ها در خارج از مرکز فولیکول قرار گرفتند. نحوه رشد و تکوین فولیکول ها در این گروه بسیار با گروه کنترل مشابهت داشت که محیط پایه حاوی ۱۰ درصد FBS بود. همان گونه که شکل ۱ نشان می دهد تقریباً همه فولیکول های کشت شده در غلظت ۱/۴ (یک چهارم) و ۱/۸ (یک هشتم) پروتئین موجود در FBS در روز دوازدهم سیاه و تخریب شدند.

میزان زنده ماندن فولیکول های کشت شده در

گروه های مورد بررسی

نرخ بقا فولیکول های کشت شده در حضور غلظت های مختلف عصاره بافت تخمدان معادل شده با ۴، ۲، مساوی، ۱/۲ (یک دوم)، ۱/۴ (یک چهارم) و ۱/۸ (یک هشتم) پروتئین موجود در FBS در روزهای مختلف کشت در جدول ۱ آورده شده است و همان گونه که در جدول مشخص شده این نرخ در اغلب گروه های حاوی عصاره تخمدان طی روزه های اول تا ششم به صفر رسید. در روز دهم کشت، نرخ بقا فولیکول های کشت شده در حضور غلظت های عصاره بافت تخمدان معادل

درصد تخمک‌های ژرمینال وزیکول (Germinal vesicle)، متافاز یک (MI) و متافاز دو (MII) در محیط پایه حاوی ۱۰ درصد FBS به‌ترتیب $3/5/54 \pm 4/19$ ، $3/7/78 \pm 3/53$ و $2/76 \pm 2/70$ و در گروه حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS به‌ترتیب

درصد تخمک‌های ژرمینال وزیکول $3/0/87 \pm 4/89$ ، $3/6/74 \pm 3/88$ و $3/2/37 \pm 1/11$ درصد بود. از لحاظ آماری، اختلاف معنی‌داری بین درصد تخمک‌های ژرمینال وزیکول و متافاز یک (MI) در دو گروه کشت شده مشاهده نشد ($P > 0/05$)، اما بین درصد تخمک‌های متافاز دو (MII) اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P < 0/05$).

جدول ۱ مقایسه درصد فولیکول‌های سالم و کشت شده در حضور غلظت‌های مختلف عصاره بافت تخمدان

گروه‌ها	روز صفر	روز دوم	روز چهارم	روز ششم	روز دهم	روز دوازدهم
مقدار پروتئین (گرم/دسی لیتر)	تعداد فولیکول	تعداد فولیکول سالم ($\pm$ SD درصد)	تعداد فولیکول سالم ($\pm$ SD درصد)	تعداد فولیکول سالم ($\pm$ SD درصد)	تعداد فولیکول سالم ($\pm$ SD درصد)	تعداد فولیکول سالم ($\pm$ SD درصد)
گروه کنترل حاوی ۱۰ درصد FBS	۶۲	۵۶ ($90 \pm 0/2$)	۵۰ ($80 \pm 0/3$)	۵۰ ($80 \pm 0/3$)	۴۷ ($75 \pm 0/3$)	۴۷ ($75 \pm 0/3$)
عصاره ۴ برابر پروتئین FBS	۲۰	۰	۰	۰	۰	۰
عصاره ۲ برابر پروتئین FBS	۲۴	۰	۰	۰	۰	۰
عصاره برابر پروتئین FBS	۲۴	۳ ($12/5 \pm 0/4$)	۱ ($4/16 \pm 0/1$)	۰	۰	۰
عصاره نصف پروتئین FBS	۶۸	۶۸ (۱۰۰)	۶۲ ($90/62 \pm 0/3$)	۵۶ ($81/25 \pm 0/4$)	۵۱ ($75 \pm 0/4$)	۴۹ ($71/87 \pm 0/4$)
عصاره یک چهارم پروتئین FBS	۳۲ (۱۰۰)	۲۷ ($84/37 \pm 0/1$)	۱۱ ($34/37 \pm 0/2$) [#]	۸ ($25 \pm 0/1$) [#]	۳ ($9/37 \pm 0/26$) [#]	۳۲ (۱۰۰)
عصاره یک هشتم پروتئین FBS	۲۰ (۱۰۰)	۱۶ ($80 \pm 0/2$)	۱۰ ($50 \pm 0/4$)	۰	۰	۲۰ (۱۰۰)

*: اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) نسبت به گروه کنترل، # اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) نسبت به گروه حاوی عصاره نصف پروتئین FBS، تعداد تکرار آزمایشات حداقل ۵ بار بوده است.

جدول ۲ مقایسه تغییرات قطر فولیکول‌های پره آنترال (میکرومتر) کشت شده در حضور عصاره بافت تخمدان و سرم جنین گاو

گروه‌ها	تعداد فولیکول	روز صفر قطر ($\pm$ SD میکرومتر)	روز ششم قطر ($\pm$ SD میکرومتر)	روز دوازدهم قطر ($\pm$ SD میکرومتر)
گروه کنترل حاوی ۱۰ درصد FBS	۲۰	۱۵۲/۹ $\pm$ ۸/۴۵	۲۴۱/۱ $\pm$ ۷/۵	۳۴۲/۰۵ $\pm$ ۸/۰۶
گروه آزمون عصاره بافت تخمدان معادل با نصف پروتئین FBS	۲۰	۱۵۲/۸ $\pm$ ۴/۱۶	۲۷۱/۶ $\pm$ ۱۳/۱۶*	۳۸۳/۹۷ $\pm$ ۱۵/۷۸*

*: وجود اختلاف با گروه کنترل ۱، همان روز (همان ستون) ($P < 0/05$)؛ در همه گروه‌ها، میانگین قطر فولیکول‌ها در روز دوازدهم نسبت به روز شروع و روز شش کشت تفاوت معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). این بخش از آزمایش حداقل ۵ بار تکرار داشت.

عصاره تخمدان و تکوین فولیکولی

جدول ۳ مقایسه تکوین فولیکول‌های کشت شده در حضور عصاره بافت تخمدان و سرم جنین گاو پس از چهارده روز کشت

گروه‌ها	تعداد فولیکول	تعداد تشکیل آنتروم ($\pm$ SD درصد)	تخمک GV ($\pm$ SD درصد)	تخمک MI ($\pm$ SD درصد)	تخمک MII ($\pm$ SD درصد)
گروه کنترل	۶۲	۲۸ ($45/26 \pm 3/64$)	۲۲ ($35/54 \pm 4/19$)	۲۷ ($43/78 \pm 3/53$)	۱۳ ($20/66 \pm 2/60$)
حاوی ۱۰ درصد FBS					
گروه آزمون	۶۸	۳۵ ($51/21 \pm 3/78$)	۲۱ ($30/87 \pm 4/89$)	۲۵ ($36/74 \pm 3/88$)	۲۲ ($32/37 \pm 1/11$) *
عصاره بافت تخمدان معادل با نصف پروتئین FBS					

*: اختلاف معنی دار ($P < 0/05$) نسبت به گروه کنترل

مقایسه میزان هورمون‌های استروئیدی در

گروه‌های مورد مطالعه

مقایسه میزان هورمون‌های استروئیدی در گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۴ آورده شده است. میزان هورمون ۱۷ بتا استرادیول در فولیکول‌های کشت شده در محیط پایه حاوی ۱۰ درصد FBS (کنترل) و محیط حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS (گروه

آزمون) به ترتیب $1897/33 \pm 40/51$ و $2458/76 \pm 27/91$ پیکوگرم بر میلی لیتر بود. میزان هورمون پروژسترون در محیط کشت فولیکول‌های کشت شده در گروه کنترل و گروه آزمون به ترتیب $16/82 \pm 5/34$ ، $35/51 \pm 4/39$ نانوگرم بر میلی لیتر بود. از لحاظ آماری، تولید هورمون استروژن و پروژسترون در محیط کشت فولیکول‌های کشت شده در گروه آزمون به طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل افزایش داشت ($P < 0/05$).

جدول ۴ میزان تولید هورمون های ۱۷ بتا استرادیول و پروژسترون در محیط کشت فولیکول های کشت شده در حضور عصاره بافت تخمدان در مقایسه با گروه های کنترل در روز ۱۲ کشت ($\text{Mean} \pm \text{SD}$).

گروه‌های مورد مطالعه	میانگین میزان هورمون ۱۷ بتا استرادیول پیکوگرم/میلی لیتر	میانگین میزان هورمون پروژسترون نانوگرم/میلی لیتر
گروه کنترل	$1897/33 \pm 40/51$	$16/82 \pm 5/34$
حاوی ۱۰ درصد FBS		$35/51 \pm 4/39^*$
گروه آزمون	$2458/76 \pm 27/91^*$	
عصاره بافت تخمدان معادل با نصف پروتئین FBS		

*: وجود اختلاف با گروه کنترل ($P < 0/05$)

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره بافت تخمدان دارای آثار متفاوتی بر روند رشد و بلوغ فولیکول‌های پره آنترال در محیط کشت است. فولیکول‌های کشت شده در غلظت‌های مختلف عصاره بافت تخمدان تکوین

خوبی نداشت و تعداد زیادی از آن‌ها در روزهای اول کشت تخریب شدند؛ ولی مشاهدات بررسی حاضر نشان داد که غلظت عصاره بافت تخمدان معادل شده با نصف پروتئین موجود در FBS نسبت به غلظت‌های دیگر نتایج بهتری را در خصوص زنده ماندن و رشد فولیکول‌ها و عملکرد هورمونی دارد.

یکی از دلایل تخریب شدن زود هنگام فولیکول‌ها می‌تواند به علت وجود پروتئازهای مختلف در بافت باشد. گرچه در مرحله تهیه عصاره از آنزیم مهارکننده پروتئاز استفاده شد، اما ممکن است در غلظت‌های بالای عصاره پروتئازها همچنان در مایع استخراجی وجود داشته باشد. پروتئازها اغلب به صورت آبشاری عمل می‌کند یعنی به طور پی در پی یک پروتئاز باعث فعال شدن پروتئازهای بعدی شود. نمونه بارز واکنش‌های آبشاری پروتئازی را می‌توان در مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و پروتئازهای کاسپاز (Caspase) مشاهده کرد [۲۶].

از سوی دیگر؛ یکی از ترکیبات موجود در بافت تخمدان که بالتبع در عصاره آن نیز وجود دارد ترکیب اینهبین (Inhibin) است که خود مانع رشد فولیکولی می‌شود و در غلظت‌های بالا عصاره احتمالاً این ترکیب بیشتر اثر مهاری خود را نشان داده است [۲۷].

علاوه بر این؛ دلیل دیگر تخریب فولیکول‌ها در غلظت‌های مذکور عصاره تخمدان می‌تواند ناشی از تغییرات اسمولاریته محیط کشت باشد. در این تحقیق، فقط بر اساس میزان پروتئین عصاره، غلظت‌های مختلف آن انتخاب شده بود و اسمولاریته این محیط‌ها بررسی نشد و این در حالی است که نشان داده شده است که افزایش اسمولاریته محیط منجر به جلوگیری از تکثیر و رونویسی DNA، تخریب DNA و پروتئین‌ها و تغییر در قطبیت میتوکندری‌ها می‌شود [۲۸]. با افزایش اسمولاریته و تغییر در قطبیت میتوکندری‌ها فعالیت آنزیم کاسپاز ۹- افزایش یافته که می‌تواند منتج به مرگ سلولی شود [۲۹].

علاوه بر این؛ با افزایش اسمولاریته محیط، پدیده کم آبی هایپرتونیک (Hypertonic) اتفاق می‌افتد. در حالت عادی غلظت مواد محلول (نمک) در مایع داخل سلولی و خارج سلولی برابر است. در شرایطی که غلظت مواد محلول در مایع خارج سلولی افزایش یابد، طبق پدیده اسمز آب از محیط با تراکم کمتر به محیط پرتراکم‌تر وارد می‌شود؛ بنابراین اگر مقدار آب خارج شده از سلول زیاد باشد پدیده کم آبی هایپرتونیک در مایع داخل سلولی اتفاق می‌افتد و در نتیجه سلول دچار

چروکیدگی می‌شود [۳۰]. به طور مشابه در مطالعه صورت گرفته توسط کروز (Cruz) و همکاران، و آوری (Avery) و همکارانش اثبات کردند که افزودن دوز بالا و خالص شده مایع فولیکولی، منجر به کاهش نرخ بلوغ هسته‌ای و نرخ تخمک‌های MII به دست آمده شد [۳۱، ۳۲].

همچنین در غلظت‌های پایین عصاره عدم بقا و رشد فولیکولی می‌تواند به دلیل ناکافی بودن مواد مغذی و رشدی لازم برای فولیکول‌ها باشد. هیدن (Heiden) و همکارانش بیان کردند که سیگنال‌های رشدی در داخل غشای سلول منجر به افزایش جذب مواد مغذی محیط می‌شود و مواد مغذی نقش بسیار کلیدی در زنده ماندن سلول دارد [۳۳]. ماسون (Mason) و همکارانش اظهار داشتند زمانی که سلول‌ها موفق به دریافت مواد مغذی کافی نشود، ابتدا متابولیسم آن‌ها کاهش می‌یابد و بعد از آن چرخه سلولی متوقف می‌شود. بنابراین اگر متابولیسم سلول برای خواسته‌های سلول ناکافی باشد با القای درونی میتوکندی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده رخ خواهد که داد که پیامد آن مرگ سلول است [۳۴].

بر اساس نتایج، میانگین قطر، تکوین و نرخ تخمک‌های متافاز دو در فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS به طور معنی‌دار در مقایسه با گروه کشت شده در محیط پایه حاوی ۱۰ درصد FBS افزایش داشت. در بررسی وضعیت عملکرد فولیکول‌ها، میزان تولید هورمون‌های استرادیول و پروژسترون در محیط کشت فولیکول‌های گروه آزمون به طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل افزایش داشت. این مسئله نشان می‌دهد که عصاره بافت تخمدان در رشد تمایز و بلوغ سلول‌های گرانولوزا و تکا در فولیکول‌های پره آنترال کشت شده مؤثر بوده است. عصاره بافت تخمدان حاوی پروتئین‌ها، مواد مغذی، عوامل مختلف رشدی، هورمون‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است؛ بنابراین افزودن این عصاره یا غلظت مناسبی از آن به محیط کشت فولیکولی منجر به بهتر شدن بلوغ و تکوین فولیکول‌ها در دوره

عصاره تخمدان و تکوین فولیکولی

بنابراین در مجموع از مطالعه حاضر چنین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره بافت تخمدان به‌عنوان یک عامل تکثیری و بلوغی باعث افزایش رشد و تکوین فولیکول‌های پره آنترال تا مرحله بلوغ می‌شود و می‌تواند بر عملکرد آن‌ها نیز تأثیر داشته و برای بهبود شرایط کشت آزمایشگاهی فولیکول‌ها استفاده شود و این امر کاملاً وابسته به مقدار عصاره به کار گرفته شده دارد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح مصوب دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه به انجام رسیده است.

کشت می‌شود. عصاره بافت تخمدان همچنین می‌تواند معادلی از مایع فولیکولار موجود درون فولیکول‌های تخمدان باشد. عوامل رشدی، بلوغی و آنتی‌اکسیدانی مختلفی درون مایع فولیکولار وجود دارد. از جمله عوامل رشدی می‌توان به EGF, Activin, IGFs (Insulin-like growth factors) و BMP-15 (Bone morphogenetic protein 15) اشاره کرد [۱۴-۱۷]. این عوامل به‌صورت مستقیم یا غیر مستقیم از طریق سلول‌های گرانولوزا و کومولوس (Cumulus cells) بر تخمک اعمال اثر می‌کند. به عبارتی دیگر؛ حضور عوامل مختلف رشدی، بلوغی موجود در عصاره بافت تخمدان با اثر مستقیم یا غیر مستقیم خود توانسته فعالیت تکثیری را در سلول‌های فولیکولار افزایش دهد.

منابع

- [1] Morohaku K, Hirao Y, Obata Y. Developmental competence of oocytes grown in vitro: Has it peaked already? J Reprod Dev 2016; 62(1): 1-5.
- [2] Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC. Intraovarian control of early folliculogenesis. Endocr Rev 2015; 36(1): 1-24.
- [3] Ksiazkiewicz LK. Recent achievements in in vitro culture and preservation of ovarian follicles in mammals. Reprod Biol 2006; 6(1): 3-16.
- [4] Buratini J, Price CA. Follicular somatic cell factors and follicle development. Reprod Fertil Dev 2011; 23(1): 32-9.
- [5] Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. Reproduction 2001; 121(5): 647-53.
- [6] Qiao J, Feng HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. Hum Reprod Update 2011; 17(1): 17-33.
- [7] Hsieh M, Zamah AM, Conti M. Epidermal growth factor-like growth factors in the follicular fluid: role in oocyte development and maturation. Semin Reprod Med 2009; 27(1): 52-61.
- [8] Padhy N, Latha M, Sathya B, Varma TR. Antral follicle size in the downregulated cycle and its relation to in vitro fertilization outcome. J Hum Reprod Sci 2009; 2(2): 68-71.
- [9] Nayudu PL, Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. J Reprod Fertil 1992; 95(2): 349-62.
- [10] Kreeger PK, Deck JW, Woodruff TK, Shea LD. The in vitro regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. Biomaterials 2006; 27(5): 714-23.
- [11] Vanacker J, Luyckx V, Dolmans MM, Des

- Rieux A, Jaeger J, Van Langendonck A, Donnez J, Amorim CA. Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. *Biomaterials* 2012; 33(26): 6079-85.
- [12] Abdi S, Salehnia M, Hosseinkhani S. Quality of oocytes derived from vitrified ovarian follicles cultured in two- and three-dimensional culture system in the presence and absence of kit ligand. *Biopreserv Biobank* 2016; 14(4): 279-88.
- [13] Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142(11): 4891-9.
- [14] Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK. KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol Reprod* 2006; 75(3): 421-33.
- [15] Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod* 2008; 23(5): 1151-8.
- [16] Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(1): 316-21.
- [17] Lin JX, Jia YD, Zhang CQ. Effect of epidermal growth factor on follicle-stimulating hormone-induced proliferation of granulosa cells from chicken prehierarchical follicles. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011; 12(11): 875-83.
- [18] Tarlatzis BC, Pazaitou K, Bili H, Bontis J, Papadimas J, Lagos S, Spanos E, Mantalenakis S. Growth hormone, oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid after ovarian stimulation with various regimes for assisted reproduction. *Hum Reprod* 1993; 8(10): 1612-6.
- [19] Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, Dewulf J, de Kruif A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology* 2004; 62(6): 1131-43.
- [20] Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88(4): 399-413.
- [21] Lee MS, Ben-Rafael Z, Meloni F, Mastroianni L Jr, Flickinger GL. Relationship of human oocyte maturity, fertilization, and cleavage to follicular fluid prolactin and steroids. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1987; 4(3): 168-72.
- [22] Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen AP, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod* 2006; 21(9): 2223-7.

- [23] Ito M, Iwata H, Kitagawa M, Kon Y, Kuwayama T, Monji Y. Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 2008; 106(3-4): 421-30.
- [24] Skehel JM. Preparation of extracts from animal tissues. *Methods Mol Biol* 2004; 244: 15-20.
- [25] Nowotny A. Protein determination by the biuret method. In: *Basic Exercises in Immunochemistry: A Laboratory Manual*. Edited by Nowotny A. Springer Berlin Heidelberg, 1979; p: 168-9.
- [26] Díaz-Nido J, Armas-Portela R, Avila J. Addition of protease inhibitors to culture medium of neuroblastoma cells induces both neurite outgrowth and phosphorylation of microtubule-associated protein MAP-1B. *J Cell Sci* 1991; 98 (Pt 3): 409-14.
- [27] Sheng X, Weng J, Zhang H, Li X, Zhang M, Xu M, Weng Q, Watanabe G, Taya K. Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in the wild ground squirrel (*Citellus dauricus* Brandt) ovary. *J Reprod Dev* 2012; 58(5): 531-6.
- [28] Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 2007; 87(4): 1441-74.
- [29] Ip WK, Medzhitov R. Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation. *Nat Commun* 2015; 6: 6931.
- [30] Roger F, Martin PY, Rousselot M, Favre H, Féraïlle E. Cell shrinkage triggers the activation of mitogen-activated protein kinases by hypertonicity in the rat kidney medullary thick ascending limb of the Henle's loop. Requirement of p38 kinase for the regulatory volume increase response. *J Biol Chem* 1999; 274(48): 34103-10.
- [31] Cruz MH, Saraiva NZ, da Cruz JF, Oliveira CS, Del Collado M, Fernandes H, de Castro FC, Garcia JM. Effect of follicular fluid supplementation during in vitro maturation on total cell number in bovine blastocysts produced in vitro. *R Bras Zootec* 2014; 43(3): 120-6.
- [32] Avery B, Strøbech L, Jacobsen T, Bøgh IB, Greve T. In vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogenology* 2003; 59(3-4): 987-99.
- [33] Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 2001; 21(17): 5899-912.
- [34] Mason EF, Rathmell JC. Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(4): 645-54.