Original Article

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

Hamed Shoorei[1], Mojdeh Salehnia[2*], Shabnam Abdi[3]

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: salehnim@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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

مقاله اصیل

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

حامد شوریی[1]، مژده صالح نیا[2*]، شبنم عبدی[3]

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 پزشکی، دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، 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 کپسوله شدن با هیدروژل آلژینیت در محیط کشت پایه α-MEM غنی شده با غلظت‌های ٤ برابر، ۲ برابر، مساوی، ۱/۲ (یک دوم) و ۱/٤ (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، به‌مدت 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 زندن 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 ($P\geq ۰/۰۵$).

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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

مقدمه

رشد و بلوغ فولیکول‌های تخمدان در محیط کشت یک روش برای ارزیابی تأثیر مواد شیمیایی، عوامل مؤثر بر مکانیسم فولیکوژنزیس (Folliculogenesis)، کیفیت، ساختار ژنتیکی تخمک، و افزایش قدرت باروری در تکنولوژی کمکی تولید مثل (Assisted Reproductive Technology) دارد [۱-٤]. رشد و تکوین فولیکول‌ها در تخمدان به تغییرات ریخت شناختی 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 آلژینیت (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 فولیکوژنزیس را می‌توان به سه دستهٔ عوامل رشدی، بلوغی و آنتی‌اکسیدانی تقسیم‌بندی کرد. عوامل رشدی مانند Kit ligand، Activin، Epidermal) EGF ،Growth differentiation Factor 9-B growth factor) یا عامل رشد فیبروبلاست (Fibroblast) در تنظیم عملکردهای تخمدان مانند تکثیر (Proliferation) سلول‌های گرانولوزا، هورمون‌سازی و تمایز نقش دارند [۱٤-۱۷]. از جمله عوامل بلوغی می‌توان به گنادوتروپین‌ها (Gonadotropins)، استرویدها 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

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 استرویدی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه تخمدان‌ها

در این تحقیق از۲۰ سر موش‌های سوری نابالغ با سن ۱۲ تا ١٤ 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 ۹۲۸٤/د۵۲ مورخ ۹٦/۱۲/۲٦ 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 عصارهٔ بافت تخمدان

تخمدان‌ها جدا شده (۳۰ تخمدان در سه تکرار) از موش‌های بالغ به‌مدت ۱ دقیقه داخل محلول آمونیوم کلراید پتاسیم داده شدند تا گلبول‌های قرمز آن‌ها لیز شوند. پس از شستشو با بافر PBS (Phosphate Buffer Saline) 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 به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول بالایی برداشت شده و به‌عنوان عصاره بافت در نظر گرفته شد سپس میزان پروتئین عصاره بافت محاسبه شد [٢٤].

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 به‌عنوان شاخصی برای انتخاب غلظت‌های مختلف عصاره تخمدان استفاده شد. با توجه به میزان پروتئین در عصاره تخمدان غلظت‌های مختلف ٤ برابر، ۲ برابر، مساوی، ۱/۲ (یک دوم) و ۱/٤ (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 در۵ تکرار). برای کشت سه بعدی در ابتدا سدیم آلژینیت (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 فیلترشد. فولیکول‌ها به‌طور جداگانه به قطره ۷ میکرولیتری سدیم آلژینیت منتقل شدند و با استفاده از سر میکروپیپت به حمام کلسیم که ترکیبی از ۱٤۰ میلی‌مول $CaCl_2$ و ۵۰ میلی‌مول NaCl بود برای ایجاد پیوندهای کلسیم و تشکیل هیدروژل، منتقل شدند و پس از ۲ دقیقه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

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 درمحیط کشت پایه α-MEM حاوی ۱درصد ITS (Insulin-Teransferrin-Selenium) (Gibco، آمریکا)، ۱۰۰ واحد بین المللی/میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ میلی‌واحد بین‌المللی/میلی‌لیتر 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 به‌عنوان گروه شاهد (کنترل) درنظر گرفته شد. فولیکول‌ها به‌مدت ۱۲ روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ 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 سانتی‌گراد تا اندازه‌گیری هورمون نگهداری شد.

گروه‌های مورد مطالعه شامل موارد زیر بود:

- فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه حاوی ۱۰ درصد FBS (٦٢ عدد).
- فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه غنی شده با عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ٤ برابر پروتئین موجود درFBS (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 (٢٤ عدد).
- فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه غنی شده با عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت برابر پروتئین موجود در FBS (٢٤ 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 (٦٨ عدد).
- فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در محیط پایه غنی شده با عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۱/٤ (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 ۱۲کشت، برای القا تخمک‌گذاری، محیط کشت قطره‌ها با محیط پایه حاوی ۱/۵ واحد بین المللی/میلی‌لیتر 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

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

به‌منظور 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 EIA (Enzyme Immuno Assay) (Monobind، آمریکا) (حساسیت= ٦/٥ پیکوگرم/میلی‌لیتر) و همچنین سطح هورمون پروژسترون با استفاده از روش ELISA (DiaPlus، آمریکا) (حساسیت= ۰/۱ نانوگرم/میلی‌لیتر) برای هر یک از گروه‌های کنترل و آزمون بررسی شد.

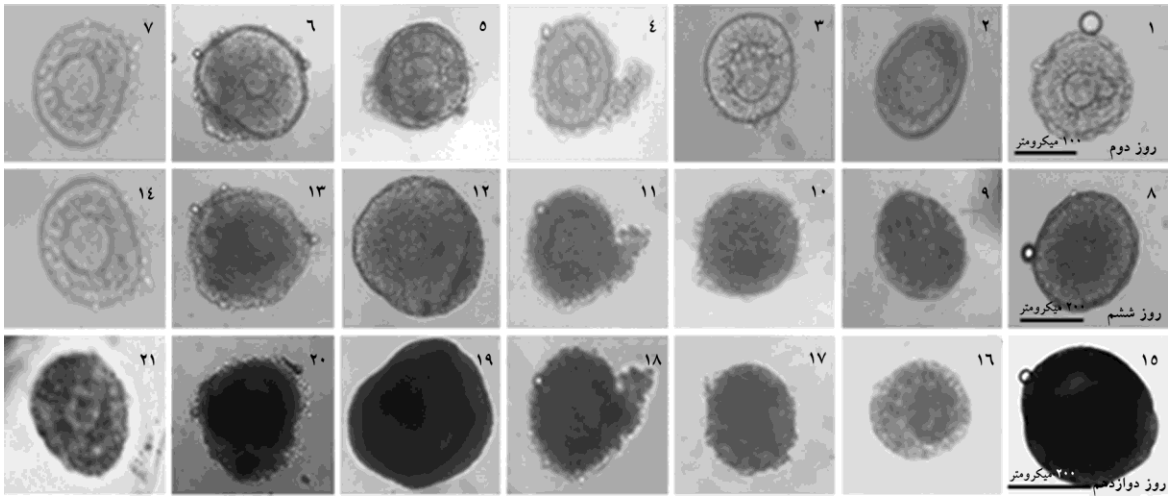
تحلیل آماری

نتایج حاصل از آزمایش‌های مختلف به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean±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 معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی میکروسکوپی تکوین فولیکول‌ها در گروه‌های مورد بررسی

نتایج ریخت شناسی فولیکول‌های کشت شده که به‌وسیله 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.



شکل ۱تصاویرفولیکول‌های کشت شده در گروه‌های مختلف مطالعه. ردیف اول مربوط به روز دوم (۱–۷) کشت است و ردیف دوم مربوط به روز ششم (۸–١٤) 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 ٤ برابر پروتئین موجود در FBS (۲، ۹، ١٦)، 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 (٤، 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 ۱/٤ (یک چهارم) پروتئین موجود در FBS (٦، ۱۳، ۲۰) و ستون آخر حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با غلظت ۱/۸ (یک هشتم) پروتئین موجود در FBS (۷، ١٤، ۲۱).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

از روز دوم کشت به بعد فولیکول‌های کشت شده در غلظت‌های ٤ برابر، ٢ 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 فولیکول‌ها زنده نبودند. این در حالی است که در بقیه گروه‌ها یعنی فولیکول‌های کشت شده در غلظت ١/٤ (یک چهارم) و ١/٨ (یک هشتم) پروتئین موجود در FBS علایمی از تخریب را نشان دادند و این در حالی است که فولیکول‌های کشت شده درمحیط حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با ١/٢ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS و نیز گروه شاهد رشد قابل توجهی داشتند.

در روز دوازدهم کشت، اغلب فولیکول‌های کشت شده در حضور غلظت عصاره بافت معادل شده با ١/٢ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS به حداکثر روند رشد و بلوغ خود رسیدند و حفره آنتروم قابل رویت بود و تخمک‌ها در خارج از مرکز فولیکول قرار گرفتند. نحوه رشد و تکوین فولیکول‌ها در این گروه بسیار با گروه کنترل مشابهت داشت که محیط پایه حاوی ١٠ درصد FBS بود. همان‌گونه که شکل ١ نشان می‌دهد تقریباً همه فولیکول‌های کشت شده در غلظت ١/٤ (یک چهارم) و ١/٨ (یک هشتم) پروتئین موجود در FBS در روز دوازدهم سیاه و تخریب شدند.

میزان زنده ماندن فولیکول‌های کشت شده در گروه‌های مورد بررسی

نرخ بقا فولیکول‌های کشت شده در حضور غلظت‌های مختلف عصاره بافت تخمدان معادل شده با ٤، ٢، مساوی، ١/٢ (یک دوم)، ١/٤ (یک چهارم) و ١/٨ (یک هشتم) پروتئین موجود در FBS در روزهای مختلف کشت در جدول ١ آورده شده است و همان‌گونه که در جدول مشخص شده این نرخ در اغلب گروه‌های حاوی عصاره تخمدان طی روزهای اول تا ششم به صفر رسید. در روز دهم کشت، نرخ بقا فولیکول‌های کشت شده در حضور غلظت‌های عصاره بافت تخمدان معادل شده با ١/٢ (یک دوم) و ١/٤ (یک چهارم) پروتئین موجود در FBS و در گروه کنترل یعنی محیط پایه حاوی ١٠ درصد FBS به‌ترتیب ١/١±٢٥±٠/٧٥،١ و ٠/٣±٧٥ درصد بود. و این نرخ در روز دوازدهم کشت، به‌ترتیب در گروه‌های قبلی ٠/٤±٧١/٨٧، ٠/٢±٩/٣٧ و ٠/٣± ٧٥ درصد بود. در گروه حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با١/٤ (یک چهارم) پروتئین موجود در FBS از نظر آماری کمترین نرخ زنده ماندن را در روزهای ششم تا دوازدهم را داشت (P<٠/٠٥)، اما بین دو گروه دیگر تفاوت معنی‌دار نبود.

قطر فولیکول‌های کشت شده

با توجه به نرخ زنده ماندن فولیکول‌ها در گروه‌های مختلف، فقط مقایسه قطر فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در حضور عصاره بافت تخمدان معادل شده با ١/٢ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS (گروه آزمون) با گروه‌کنترل صورت پذیرفت؛ در روز دوم، ششم و دوازدهم در جدول ٢ آورده شده است. از لحاظ آماری، در روز شش و دوازده کشت میانگین قطر فولیکول‌های کشت شده در گروه آزمون به‌طور معنی‌دار در مقایسه با گروه فولیکول‌های کشت شده در محیط پایه حاوی ١٠ درصد FBS (گروه کنترل) افزایش داشت (P<٠/٠٥).

تکوین فولیکول‌های کشت شده

با توجه به نرخ زنده ماندن فولیکول‌ها در گروه‌های مختلف فقط تکوین فولیکول‌های کشت در غلظت عصاره بافت معادل شده با ١/٢ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS و محیط پایه حاوی ١٠ درصد FBS (گروه کنترل) مقایسه شد. پس ازپایان دوره کشت میزان تشکیل آنتروم و بلوغ تخمک‌های حاصل از فولیکول‌های کشت شده در گروه‌های مورد مطالعه در جدول ٣ بیان شده است.

میزان درصد تشکیل آنتروم نیز در گروه کنترل و آزمون به‌ترتیب ٣/٦٤±٤٥/٢٦ و ٣/٧٨±٥١/٢١ بود و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

درصد تخمک‌های ژرمینال وزیکول (Germinal vesicle)، متافاز یک (MI) و متافاز دو (MII) در محیط پایه حاوی ۱۰ درصد FBS به‌ترتیب ۴/۱۹±۳۵/۵۴، ۳/۵۳±۴۳/۷۸ و ۲/۶۰±۲۰/۶۶ و در گروه حاوی عصاره بافت تخمدان معادل شده با ۱/۲ (یک دوم) پروتئین موجود در FBS به‌ترتیب ۴/۸۹±۳۰/۸۷، ۳/۸۸±۳۶/۷۴ و ۱/۱۱±۳۲/۳۷ درصد بود. از لحاظ آماری، اختلاف معنی‌داری بین درصد تخمک‌های ژرمینال وزیکول و متافاز یک (MI) در دو گروه کشت شده مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، اما بین درصد تخمک‌های متافاز دو (MII) اختلاف معنی‌دار مشاهد شد (P<۰/۰۵).

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

گروه‌ها / مقدار پروتئین (گرم/دسی لیتر)		روز صفر	روز دوم	روز چهارم	روز ششم	روز دهم	روز دوازدهم
		تعداد فولیکول	تعداد فولیکول سالم (SD±درصد)	تعداد فولیکول سالم (SD±درصد)	تعداد فولیکول سالم (SD±درصد)	تعداد فولیکول سالم (SD±درصد)	تعداد فولیکول سالم (SD±درصد)
گروه کنترل حاوی ۱۰ درصد FBS		۶۲	۵۶ (۹۰±۰/۲)	۵۰ (۸۰ ±۰/۳)	۵۰ (۸۰ ±۰/۳)	۴۷ (۷۵ ±۰/۳)	۴۷ (۷۵ ±۰/۳)
عصاره ۴ برابر پروتئین FBS	۱۲	۲۰	۰	۰	۰	۰	۰
عصاره ۲ برابر پروتئین FBS	۸	۲۴	۰	۰	۰	۰	۰
عصاره برابر پروتئین FBS	۳	۲۴	۳ (۱۲/۵±۰/۴)	۱ (۴/۱۶ ±۰/۱)	۰	۰	۰
عصاره نصف پروتئین FBS	۱/۵	۶۸	۶۸ (۱۰۰)	۶۲ (۹۰/۶۲ ±۰/۳)	۵۶ (۸۱/۲۵ ±۰/۴)	۵۱ (۷۵ ±۰/۴)	۴۹ (۷۱/۸۷ ±۰/۴)
عصاره یک چهارم پروتئین FBS	۰/۷۵	۳۲ (۱۰۰)	۲۷ (۸۴/۳۷ ±۰/۱)	۱۱ (#*۳۴/۳۷±۰/۲)	۸ (#* ۲۵ ±۰/۱)	۳ (#* ۹/۳۷±۰/۲۶)	۳۲ (۱۰۰)
عصاره یک هشتم پروتئین FBS	۰/۳۷	۲۰ (۱۰۰)	۱۶ (۸۰ ±۰/۲)	۱۰ (۵۰ ±۰/۴)	۰	۰	۲۰ (۱۰۰)

*: اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل، # اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) نسبت به گروه حاوی عصاره نصف پروتئین FBS، تعداد تکرار آزمایشات حداقل ۵ بار بوده است.

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

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

*: وجود اختلاف با گروه کنترل ۱، همان روز (همان ستون) (P<۰/۰۵)؛ در همه گروه‌ها، میانگین قطر فولیکول‌ها در روز دوازده نسبت به روز شروع و روز شش کشت تفاوت معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). این بخش از آزمایش حداقل ۵ بار تکرار داشت.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

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 (SD ± درصد)	تخمک GV (SD ± درصد)	تخمک MI (SD ± درصد)	تخمک MII (SD ± درصد)
گروه کنترل حاوی ۱۰ درصد FBS	٦٢	٢٨ (٤٥/٢٦ ± ٣/٦٤)	٢٢ (٣٥/٥٤ ± ٤/١٩)	٢٧ (٤٣/٧٨ ± ٣/٥٣)	١٣ (٢٠/٦٦ ± ٢/٦٠)
گروه آزمون عصاره بافت تخمدان معادل با نصف پروتئین FBS	٦٨	٣٥ (٥١/٢١ ± ٣/٧٨)	٢١ (٣٠/٨٧ ± ٤/٨٩)	٢٥ (٣٦/٧٤ ± ٣/٨٨)	٢٢ (٣٢/٣٧ ± ١/١١) *

*: اختلاف معنی دار (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل

مقایسه میزان هورمون‌های استروئیدی در گروه‌های مورد مطالعه

مقایسه میزان هورمون‌های استرویيدی در گروه‌های مورد مطالعه در جدول ٤ 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) به‌ترتیب ٤٠/٥١±١٨٩٧/٣٣، و ٢٧/٩١±٢٤٥٨/٧٦ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بود. میزان هورمون پروژسترون در محیط کشت فولیکول‌های کشت شده در گروه کنترل و گروه آزمون به‌ترتیب ٥/٣٤±١٦/٨٢، ٤/٣٩±٣٥/٥١ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. از لحاظ آماری، تولید هورمون استروژن و پروژسترون در محیط کشت فولیکول‌های کشت شده در گروه آزمون به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل افزایش داشت (P<۰/۰۵).

جدول ٤ 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 (Mean±SD).

گروه‌های مورد مطالعه	میانگین میزان هورمون ۱۷ بتا استرادیول پیکوگرم/میلی لیتر	میانگین میزان هورمون پروژسترون نانوگرم/ میلی لیتر
گروه کنترل حاوی ۱۰ درصد FBS	٤٠/٥١ ±١٨٩٧/٣٣	٥/٣٤ ±١٦/٨٢
گروه آزمون عصاره بافت تخمدان معادل با نصف پروتئین FBS	٢٧/٩١* ±٢٤٥٨/٧٦	٤/٣٩* ±٣٥/٥١

*: وجود اختلاف با گروه کنترل (P<۰/۰۵)

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.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

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 به‌صورت آبشاری عمل می‌کند یعنی به‌طور 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 ان نیز وجود دارد ترکیب اینهیبین (Inhibin) است که خود مانع رشد فولیکولی می‌شود ودر 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 محیط ها 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، پدیدهٔ 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 پدیدهٔ کم آبی هایپرتونیک در مایع داخل سلولی اتفاق می‌افتد و در نتیجه سلول دچار چروکیدگی می‌شود [۳۰]. به‌طور 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 به‌دست آمده شد [۳۱، ۳۲].

همچنین در غلظت‌های پایین عصاره عدم بقا و رشد فولیکولی می‌تواند به‌دلیل 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 به‌طور 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 به‌طور 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 فولیکول های 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

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) و ... 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.

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 پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح مصوب دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی ان دانشگاه به انجام رسیده است.

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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

Rieux A, Jaeger J, Van Langendonckt 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.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]

[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, Féraille 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.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-09]