مقاله تحقیقی

تاثیر فاکتور رشد فیبروبلاستی بر از سرگیری میوز،بلوغ آزمایشگاهی و تکوین جنین‌های حاصل از تخمک‌های نابالغ موش

مهناز آذرنیا .Ph.D *، فاطمه قاسمیان .M.Sc *، محمدهادی بهادری.Ph.D **، فهیمه قاسمی.Ph.D **

معصومه جلالی احمدی مقدم.B.Sc ***

* گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم، تهران،ایران

** گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

*** مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تاریخ وصول: بهمن ماه ۸۷، تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۸۸

چکیده

هدف: بررسی بیان اثر فاکتور رشد فیبروبلاست بربلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ و تکوین جنین‌ها

مواد و روش‌ها: مجموعه تخمک - کومولوس و وزیکول زاینده از موش‌های ماده نژاد NMRI به‌دنبال تزریق 5IU PMSG (*i.p.*) به‌دست آورده شد. تخمک‌ها در محیط TCM-199 (Tissue culture medium-199) تأمین شده با دوزهای مختلف فاکتور رشد فیبروبلاست کشت داده شدند. بعد از ۲٤ ساعت تخمک‌های متافازII در مجاورت اسپرم‌ها به مدت ٦-٤ ساعت در محیط T6 انکوبه شدند. در همه گروه‌ها، کلیواژ جنین‌ها درهمان محیط طی ۵ روز بررسی شد.

یافته‌ها: در همه گروه‌ها، گروه‌های تیمار شده با 20ng/ml FGF (92.5%) و (94.4%)10ng/mlFGF به‌طور معنی‌داری میزان تشکیل تخمک‌های متافازII بالاتری رانسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد.اما گروه تیمار شده با 20ng/ml FGF میزان تکوین بالاتری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری: فاکتور رشد فیبروبلاست طی شرایط آزمایشگاهی، بلوغ تخمک و تکوین جنین را افزایش می‌دهد.

کلید واژه‌ها: فاکتور رشد فیبروبلاست، بلوغ آزمایشگاهی، لقاح آزمایشگاهی، تکوین جنین

مقدمه

بلوغ آزمایشگاهی تخمک یک روش امیدبخش برای درمان ناباروری است که کاربرد پزشکی آن به‌واسطه موفقیت پایین با محدودیت مواجه است. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که بلوغ آزمایشگاهی (IVM: In vitro maturation) تخمک‌های وزیکول زاینده (GV: Germinal Vesicle) به مرحله متافاز II (MII: Metaphase II) به‌طور تکنیکی در گونه‌های بسیار متفاوتی از پستانداران امکان پذیراست [۱]. بلوغ آزمایشگاهی تخمک، در هر یک از زنانی که با خطر تحریک‌پذیری بالا تخمدان مواجه هستند یا در پاسخ به تحریک هورمونی شکست می‌خورند و در نهایت در بیمارانی با سندروم پلی کیستیک تخمدان از اهمیت بالایی برخوردار است [۲]. در بسیاری از پستانداران اهلی مانند خوک و گاو ، بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های GV به‌دست آمده از تخمدان‌ها به‌طور معمول برای تولید جنین و در نتیجه تولید احشام جدید استفاده

آدرس مکاتبه: گیلان، رشت، کیومتر ۱۰ جاده تهران، مجتمع دانشگاهی دانشگاه گیلان، دانشکده پزشکی، صندوق پستی: ۳٤۷۷ E-mail: Bahadori.mh@gmail.com

می‌شود [۳ و٤]. در حیوانات آزمایشگاهی مثل موش صحرایی و موش، بلوغ آزمایشگاهی به‌عنوان یک روش جامع، میزان بالایی از موفقیت در تولید جنین‌ها و حیوانات جدید را ثابت کرده است [٥ و٦]. در مقایسه، بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های GV انسان در روش‌های کمک باروری با موفقیت کمتری همراه‌است [۷و۸]. در فولیکول قبل از تخمک‌گذاری، تخمک‌های نابالغ با رشد کامل به وسیله چندین لایه از سلول‌های گرانولوزا، کومولوس اووفروس احاطه شده اند. تخمک و سلول‌های کومولوس از طریق اتصالات شکافدار یک سن سیتیوم عملکردی به‌نام مجموعه تخمک-کومولوس (COC: Cumulus – Oocyte Complexs) را تشکیل می‌دهند [۹]. قبل از تخمک‌گذاری، گنادوتروپین‌ها دو حادثه را تحریک می‌کند: بلوغ تخمک و پخش شدن کومولوس. بلوغ تخمک شامل پیشرفت آن از پروفاز میوزI به متافاز میوز II (MII) است. اولین نشانه از سرگیری میوز تشکیل تخمک‌هایی با هسته شکسته شده (GVBD: Germinal Vesicle Break Down) است که تقریبا ۲ ساعت بعد از تحریک اتفاق می‌افتد. تخمک بعد از تقریبا ۱۰ ساعت اولین تقسیم میوز را کامل می کند و MII تشکیل می‌شود. علاوه بر این اتفاقات چرخه سلولی، تغییراتی در سیتوپلاسم سلول نیز اتفاق می‌افتد که می‌توان مطمئن شد که لقاح طبیعی اتفاق افتاده است [۱۰].

افزایش پلی اسپرمی به دنبال لقاح آزمایشگاهی و پتانسیل پایین تکوین، مانع از تولید عمده آزمایشگاهی (*in vitro*) جنین‌های قابل زنده با کیفیت بالاتر می شود. میزان بالای لقاح پلی اسپرمی و میزان پایین تشکیل پیش هسته نر بعد از لقاح آزمایشگاهی (IVF: In vitro fertilization) ممکن است به دلیل بلوغ ناقص تخمک در شرایط آزمایشگاهی باشد. چندین مطالعه برای غلبه بر این مسایل در راستای بهبود بلوغ تخمک به‌دنبال تغییرات سیستم بلوغ آزمایشگاهی (IVM) صورت گرفته است [۱۱-۱۳]. به‌طور قابل ملاحظه‌ای، کارهای مداوم پروفسور ادوارد (Edward) به خوبی توسط دانشمندان همه نقاط جهان شناسایی شده است. ایشان اولین کسی بودند که با موفقیتIVF را در موش در سال ۱۹٦٤ تکوین دادند [١٤].

مطالعات دیگر نشان می‌دهد که تخمک‌های بالغ شده در آزمایشگاه، نسبت به شرایط کشت با مطلوبیت کمتر، بسیار حساس‌تر از تخمک‌های بالغ شده *in vivo* هستند [۱۵] و محیط کشت می‌تواند تکوین *in vivo* و *in vitro* را تحت تاثیر قرار دهد [١٦]. فاکتورها و مکانیسم‌های درگیر در این روند هنوز به خوبی تعریف نشده است. صرفه نظر از گنادوتروپین درگیر، شواهد خوبی وجود دارد که فاکتورهای تنظیمی موضعی در این روند کاربرد دارد [۱۷]. فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) یک گروه از زنجیره پلی پپتیدهای خاص اتصال یابنده به هپارین است که نقش اساسی در تکوین، رشد سلول، ترمیم بافت و انتقالات بر عهده دارد. این‌ها تمایز سلول‌های گرانولوزای تخمدان [۱۸]، بیان رسپتورهای هورمون لوتئینزه کننده (LH)، توسط سلول‌های گرانولوزا و تکثیر سلول‌های زاینده تخمدان [۱۹]، را تحریک می‌کنند. بنابراین در اینجا تاثیر فاکتور رشد فیبروبلاست بر میزان از سرگیری میوز ، بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM)، لقاح آزمایشگاهی (IVF) و تکوین جنین بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

همه مواد به‌جز Fetal calf serum (FCS) (Gibco,UK) و human chronic gonadotropin (hCG) (Organon,Holand) از شرکت SIGMA خریداری شد.حیوانات مطالعه شده توسط انستیتوی رازی کرج (ایران) تهیه شد.

موش‌های ماده ۸-٦ هفته‌ای از نژاد NMRI با جابه‌جایی گردن، ٤٨-٤٦ ساعت بعد از تزریق داخل صفاقی ٥ واحد PMSG کشته شدند. تخمدان‌ها برداشته شده و فوری در محیط TCM-199 شامل FCS ٥ درصد از پیش انکوبه شده قرار گرفتند. مجموعه تخمک – کومولوس (COCs) و وزیکول زاینده (GV) به‌وسیله سوزن انسولین برداشت شدند. تخمک‌های برهنه شده با تکرار پیپت کردن، از COCs به‌دست آمد و با پیپت‌های دهانه کوچک (حدود ۱۳۰ میکرون) سلول‌های کومولوس اطراف برداشت شد.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها

تخمک‌های برهنه شده در مرحله GV جمع‌آوری شدند و سه بار در محیط تازه TCM شامل FCS ۵ درصد که از قبل انکوبه شده است با روغن برای بلوغ آزمایشگاهی شستشو داده شدند. این محیط بلوغ (TCM) به‌عنوان محیط کنترل (بدون وجود فاکتور رشد فیبروبلاست) استفاده می‌شود. مقدار مورد نیاز فاکتور رشد فیبروبلاست برای طراحی آزمایش در دوزهای مختلف از قبل اضافه و دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 ۵ درصد، ٢٤ ساعت قبل به تعادل رسانده شد.

طراحی آزمایش

برای مطالعه اثر فاکتور رشد فیبروبلاست(FGF) بر بلوغ هسته‌ای تخمک‌های برهنه شده، تخمک‌های برهنه شده در مرحله وزیکول زاینده (GV) به مدت ٢٤ ساعت در محیط TCM حاوی FCS ۵ درصد تأمین شده باng/ml ۱۰(گروه ۲)، ng/ml ۲۰(گروه ۳)،ng/ml ۵۰ (گروه٤) و ng/ml ۱۰۰فاکتور رشد فیبروبلاست (گروه ۵) و TCM به تنهایی (گروه کنترل، گروه۱) کشت داده شدند. بعد از ٢٤ ساعت مرحله بلوغ توسط میکروسکوپ اینورت بررسی شد. برای مطالعه اثر FGF بر لقاح و تکوین متعاقب آن بر تخمک‌های موش بالغ شده در شرایط آزمایشگاه، تخمک‌هایی که متحمل GVBD و تشکیل اولین جسم قطبی شده‌اند به‌عنوان اولین نشانه بلوغ میتوزی در نظر گرفته شد.

لقاح آزمایشگاهی و تکوین جنین

اسپرم از موش‌های نر بالغ نژاد NMRI از دم اپیدیدیم آن تهیه شد و سپس به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه و مقدار۱۰٦ ×۱ اسپرم بر میلی‌لیتر در قطرات µl ۵۰ از محیط T6 شامل ۱۵mg/ml BSA (bovine serum albumin) و تخمک‌های بالغ شده *in vitro* قرار گرفتند. بعد از ٦-٤ ساعت از مجاورت با اسپرم، زیگوت‌ها از محیط لقاح برداشت شدند و در گروه‌های ۱۰-۵ در قطرات µl ۵۰ از محیط T6 شامل ٤ mg/ml BSA پوشیده شده با روغن مینرال در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 ۵ درصدکشت داده شدند.

در مواردی که هیچ نشانی از لقاح وجود ندارد و برای رسیدن به مرحله دوسلولی دچار شکست شدند بعد از کشت، بیشتر به عنوان تخمک‌های لقاح نیافته در نظر گرفته شدند. جنین‌های طبیعی تا مرحله بلاستوسیست کشت داده شدند.

آنالیز آماری

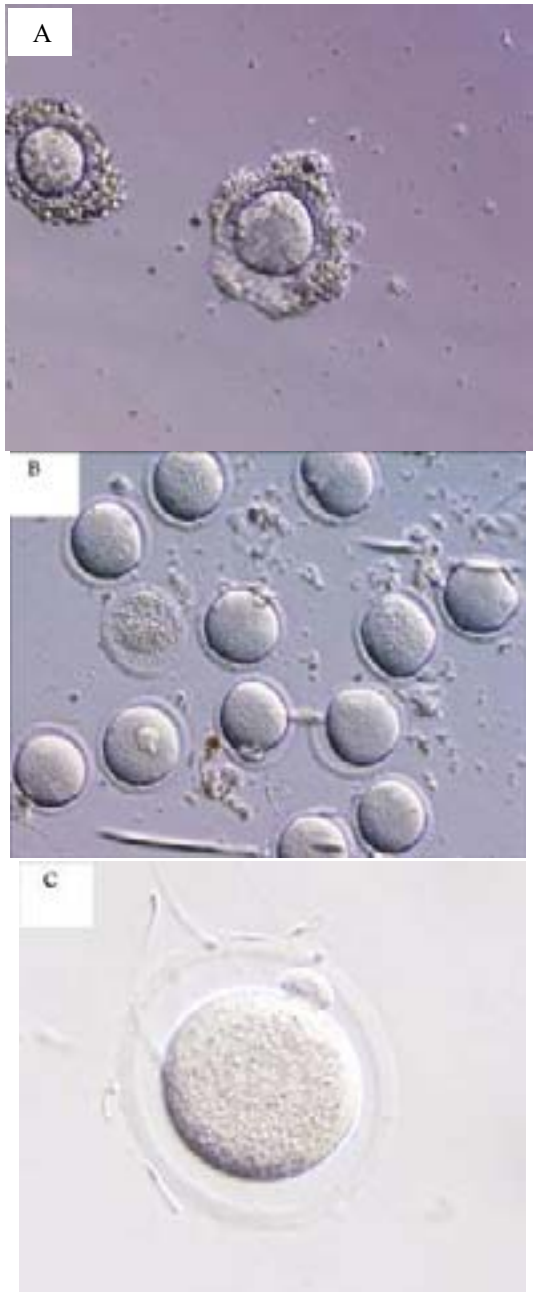
برای بررسی تأثیر فاکتور رشد فیبروبلاست برمیزان موفقیت بلوغ، لقاح و تکوین جنین درهمه گروه‌ها اطلاعات مربوط جمع آوری و با استفاده از روش chi-square و با کمک نرم افزار SPSS 13، مقایسه و تجزیه تحلیل شد.

یافته‌ها

همان طور که در شکل۱ نشان داده شده است، بهبود بلوغ تخمک‌های COCs و GV (شکل.۲: A,B) به متافاز II (شکل.۲c) در گروه کنترل (۱)، گروه‌های۲، ۳، ٤ و ۵ به‌ترتیب ۳ و۸۱ درصد، ٤٤ و ٩٤ درصد، ۵ و۹۲درصد، ٤ و۸۱ درصد و ۳ و ٦۱ درصد است.

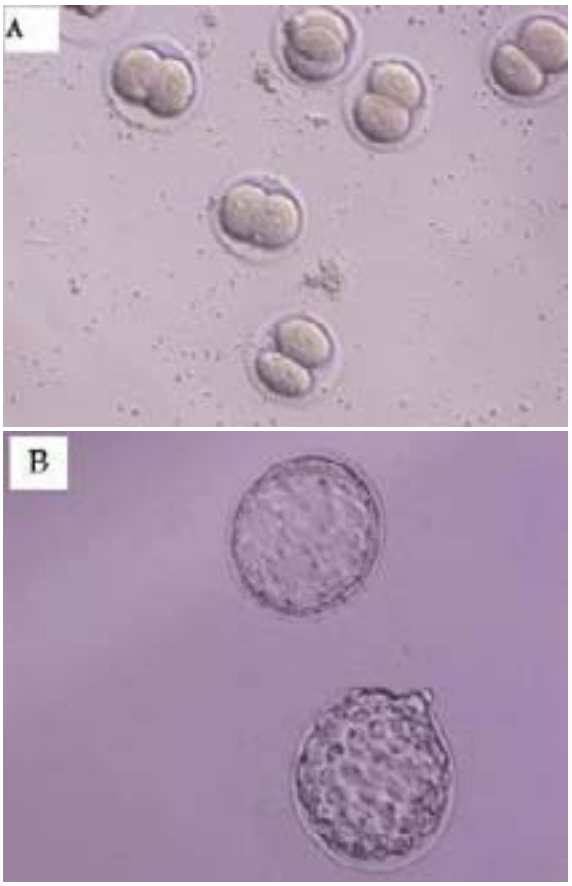
شکل ۱: تاثیر فاکتور رشد فیبروبلاست در دوزهای مختلف بر میزان تشکیل متافازII از تخمک‌های GV و COCs بعد از کشت در محیط TCM.
*:p=0.0001, **:p=0.001

در شکل ۱؛ گروه ۱: گروه کنترل بدون فاکتور رشد، گروه آزمون۲: ۱۰ ng/ml، گروه آزمون۳ ۲۰ ng/ml، گروه آزمون ٤: ۵۰ ng/ml و گروه آزمون ۵: ۱۰۰ ng/ml فاکتور رشد فیبروبلاست. ستاره به کار رفته در بالای ستون‌ها متعلق به گروهی است که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد.



شکل ۲. تخمک موش در مرحله مجموعه تخمک. کومولوس (A)، وزیکول زاینده (B) و متافاز II (C)

درصد تخمک‌های باقی مانده در مرحله GV در گروه ۵ بالاتر از گروه‌های دیگر است؛ اما میزان تخمک‌هایی که به مرحله متافاز II بلوغ می‌یابد به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) در حضور غلظت‌های ۱۰ ng/ml و ۲۰ ng/ml از فاکتور رشد فیبروبلاست (گروه ۲و ۳) در مقایسه با گروه کنترل (۱) افزایش می‌یابد (شکل۱). درصد جنین‌هایی که به مرحله دوسلولی (شکل، 3A) تکوین می‌یابند در تخمک‌هایی که در محیط شامل ۲۰ ng/mlکشت داده شده‌اند در مقایسه با گروه کنترل بالاتر است(۷۰/۸٪ ، $p<0.05$).



شکل ۳. جنین موش در مرحله دو سلولی (A) و مرحله بلاستوسیست (B)

در این مطالعه میزان تشکیل جنین‌های دو سلولی، میزان لقاح آزمایشگاهی را نشان می‌دهد. در حالی‌که درصد تخمک‌های رسیده به مرحله دوسلولی در گروه کنترل و گروه‌های ۲، ٤ و ۵ به‌ترتیب ۵۹، ۵٦/۱، ۳۹/۱ و ۲۹/۲ درصد

است و همچنین درصد جنین‌هایی که به مرحله بلاستوسیست (شکل.۳B) رسیده‌اند در گروه ۳ با غلظت ۲۰ ng/ml از فاکتور رشد فیبروبلاست به‌طور معنی‌داری($p<0.05$) نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد (شکل ٤).

شکل ٤: اثر فاکتور رشد فیبروبلاست در دوزهای مختلف بر میزان تشکیل دوسلولی و بلاستوسیست از تخمک‌های GV و COCs بعد از کشت در محیط T6. :p=0.01, **:p=0.005

در شکل ٤؛ گروه ۱: گروه کنترل بدون فاکتور رشد، گروه آزمون۲: ۱۰ ng/ml، گروه آزمون۳ ۲۰ ng/ml، گروه آزمون ٤: ۵۰ng/ml و گروه آزمون ۵: ۱۰۰ ng/ml فاکتور رشد فیبروبلاست. ستاره به کار رفته در بالای ستون‌ها متعلق به گروهی است که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که حضور فاکتور رشد فیبروبلاست (۱۰و۲۰ ng/ml) در محیط بلوغ، توانایی بلوغ تخمک‌های موش و تشکیل متافاز II را بالا می‌برد. در حالی‌که فاکتور رشد فیبروبلاست در غلظت‌های بالا (۵۰ و۱۰۰ ng/ml) آثار منفی بر نقش‌های مذکور دارد. درصد رشد تخمک‌ها به مرحله متافازII به‌طور معنی‌داری($p<0.05$) در غلظت ۱۰ ng/ml و ۲۰ng/ml افزایش می‌یابد (به ترتیب ۹٤/٤ و ۹۲/۵۷ درصد در مقابل گروه کنترل (۸۱/۳ درصد)). این درصد در حضور غلظت ۱۰۰و۵۰ ng/ml نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد. یافته‌ها نشان می‌دهد که تأمین محیط بلوغ با FGF، میزان تشکیل تخمک‌های متافاز II و در نتیجه بلوغ هسته‌ای را بهبود می‌بخشد. بلوغ تخمک اغلب به دو فرایند سیتوپلاسمی و هسته‌ای تقسیم می‌شود. بلوغ هسته‌ای اصطلاحی است که به از سرگیری میوز و پیشرفت به سمت متافاز II اطلاق می‌شود. بلوغ سیتوپلاسمی به حوادث دیگر بلوغ اشاره می‌کند که به‌طور غیر مستقیم به پیشرفت میوزی که تخمک را برای لقاح و تکوین قبل از لانه‌گزینی آماده می‌کند، مربوط می‌شود [۲۰]. فرایند بلوغ میتوزی و اکتساب پتانسیل تکوین، توانایی تخمک‌هایی را که متحمل لقاح، کلیواژ و تکوین جنین موفق می‌شود را تعیین می‌کند. این‌ها مراحل مهمی هستند که به تنوعی از فاکتورها وابسته است و منجر به آمادگی بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی می‌شود [۲۱]. بلوغ میوزی تخمک یک فرایند پیچیده است که شامل تشکیل GVBD، متراکم شده کروموزوم، تشکیل صفحه متافازی، تکمیل میوز I و آزاد شدن اولین جسم قطبی (Polar body:PB) و توقف در متافاز II است [۲۲].

فاکتور رشد فیبروبلاست ابتدا از هیپوفیز گاو در سال ۱۹۷۰ ایزوله شد [۲۳]. این یک مولکول است که در همه جا حضور دارد و در بیولوژی تخمدان توجه ویژه‌ای به آن می‌شود و به‌عنوان عامل میتوزی قوی برای سلول‌های گرانولوزای گونه‌های متنوعی در کشت شناسایی شده است [۲۷-۲٤]. مطالعات ایمنوهیستوشیمی، لوکالیزه شدن سلولی پروتئین فاکتور رشد فیبروبلاست را گزارش داده‌اند روی هم رفته وجود فاکتور رشد فیبروبلاست در تخمک‌ها و سلول‌های گرانولوزا در بسیاری از مراحل فولیکولی نشان داده شده است، اما رنگ‌آمیزی ایمنو در مراحل خاصی که مبهم است را گزارش داده اند [۳۲-۲۸]. لوکالیزه شدن mRNA bFGF درون بافت تخمدان موش صحرایی توسط گاتریج (Guthridge) و همکارانش در سال ۱۹۹۲ مطالعه شده است و متوجه شده‌اند

که سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های تکای فولیکول‌های انترال بزرگ و پرانترال کوچکتر، mRNA bFGF را تولید می‌کنند. اضافه کردن FGF در طول بلوغ COCs موش، آزاد شدن جسم قطبی و آمادگی تخمک‌ها برای رسیدن به مرحله متافاز II را افزایش می‌دهد. همچنین ژن FGF در فعالیت سیتوپلاسمی و میانجی‌گری مسیر سیگنالی سلول کاربرد دارد. فاکتور رشد فیبروبلاست یک گروه از زنجیره پلی‌پپتیدهای منفرد اتصال یابنده به هپارین هستند و با سطح سلول به‌واسطه سولفات هپارین میان کنش می‌دهد که نشان دهنده ضرورت حضور FGF برای انتقال سیگنال است [۳۳ و۳٤] که نقش اساسی در فرایند تکثیر و تمایز تخمک برعهده دارد. فاکتور رشد فیبروبلاست تمایز سلول‌های گرانولوزا تخمدان [۱۸]، بیان رسپتور هورمون لوتئینزه کننده (LH) توسط سلول‌های گرانولوزا و تکثیر سلول‌های زاینده تخمدان [۱۹] را تحریک می‌کنند.

اثر FGF بر توانایی تکوین یافتن جنین از تخمک‌های بالغ شده *in vitro* تا کلیواژ به مرحله دو سلولی توسط غلظت‌های متفاوتی میانجی‌گری می شود. اگر چه فاکتور رشد فیبروبلاست می‌تواند میزان بلوغ و لقاح را بهبود ببخشد، اما تنها FGF در غلظت ۲۰ ng/ml ظرفیت تکوین تخمک‌های بالغ شده *in vitro* را بهبود می‌بخشد. تغییرات در محیط کشت برای تکوین تخمک‌های بالغ شده در شرایط آزمایشگاهی مفید به نظر می‌رسد. واضح است که تخمک‌های موش در شرایط آزمایشگاهی پتانسیل لازم برای حساسیت به بسیاری از موارد را دارند [۱۵]. به نظر می‌رسد که هورمون‌ها و فاکتورهای رشد که در محیط کشت حضور دارند یا آن‌هایی که از تخمک‌ها ترشح می‌شوند، نقش اساسی در اکتساب توانایی تکوین دارند [۳۵].

با وجود یافته‌هایی درباره این‌که جنین‌های مشتق شده از تخمک‌های بالغ شده *in vitro* قادر به تکوین در مراحل مشخصی هستند، تکوین *in vitro* ضعیف تلقی می‌شود و تنها تقسیمات کلیواژ در دوز متوسط FGF محدود می‌شود؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد که جنین به شرایط کشت استفاده شده برای تکوین بسیار حساس است. بلوک تکوینی *in vitro* جنین از تخمک‌های بالغ شده در محیط کشت، بلوک دوسلولی *in vitro* نامیده می‌شود و در اکثر نژادهای موش ظاهر می‌شود [۳٦]. تکوین تخمک‌های بالغ شده در شرایط آزمایشگاهی و محیط کشت، نشان می‌دهد که تحت تاثیر محیط کشت استفاده شده برای بلوغ قرار می گیرند [۱٦] و محیط کشت برای بهبود تکوین جنین‌ها از بلوکه شدن نژادهای موش برای حمایت تکوین تخمک‌های بالغ شده *in vitro* تنظیم شده است.

از این رو ٤۸/۸ درصد جنین‌ها بعد از لقاح، در غلظت ۲۰ng/ml فاکتور رشد فیبروبلاست تا مرحله بلاستوسیست پیش رفته‌اند.

چندین مطالعه اثر هورمون‌ها و فاکتورهای رشد را بربلوغ آزمایشگاهی(IVM) تخمک‌ها مطرح می‌کند. اثر مثبت فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها در خوک [۳۷] و موش [۲۰] گزارش شده است، اما مطالعات محدودی بر فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) صورت گرفته است [۳۸] که نشان دهد تکوین جنین/تخمک به مرحله بلاستوسیست توسط FGF اگزوژن در یک مرحله خاص تنظیم می‌شود [۳۹].

در مقایسه با EGF، گزارش‌های کمتری از تاثیر FGF بر بلوغ آزمایشگاهی وIVF در دست است. میوز تخمک در موش توسط EGF دوباره آغاز می‌شود [٤۰]. هر چند بیسر (Bieser) و همکارانش [٤۱] گزارش داده‌اند که یک پروتئولیز خارج سلولی به‌خوبی در طول بلوغ آزمایشگاهی سلول‌های COCs اتفاق می‌افتد که برای عمل آن فاکتور رشد تعدیل کننده شبیه FGF ضروری است. از این رو مطالعات ما نشان می‌دهد که فاکتور رشد فیبروبلاست اگزوژن طی شرایط آزمایشگاهی بلوغ آزمایشگاهی (IVM)، لقاح تخمک‌ها و تکوین جنین را بهبود می‌بخشد.

Front Biosci 2006; 11: 2565-73.

14. **Edwards RG,** An introductionto Bourn Hall. The biomedical background of Bourn Hall Clinic. In: Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction; ed. Brinsden PR. Taylor & Francis Group; London 2005; 26: 1-8.

15. **Jinno M, Sandow BA, Hodgen GD.** Enhancement of the developmental potential of mouse oocytes matured in vitro by gonadotropins and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). J. In Vitro Fert Embryo Transf 1989; 6: 36–40.

16. **Van De Sandt JJM, Schroeder AC, Eppig JJ**. Culture media for mouse oocyte maturation affect subsequent embryonic development. Mol Reprod Dev 1990; 25: 164–71.

17. **Quennell JH, Stanton JAL, Hurst PR**. Basic fibroblast growth factor expression in isolated small human ovarian follicles. Mol Hum Reprod 2004; 10: 623-8.

18. **Adashi EY, Resnick CE, Croft CS, May JV, Gospodarowicz D**. Basic fibroblast growth factor as a regulator of ovarian granulosa cell differentiation: a novel non-mitigenic role. Mol Cell Endocrinol 1988; 55: 7-14.

19. **Gospodarowicz D, Plouet J, Fujii DK.** Ovarian germinal epithelial cells respond to basic fibroblast growth factor and express its gene: implications for early folliculogenesis. Endocrinology 1989; 125: 1266-76.

20. **De La Fuente R, J.O,Brien M, Eppig JJ**. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes.Hum Reprod 1999;14: 3060-8.

21. **Trounson A, Anderiesz C, Jones G.** Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction 2001;121:51-75.

22. **Modina S, Luciano AM, Vassena R, Baraldi-Scasi L, Lauria A, Gandolfi F.** Oocyte developmental competence after in vitro maturation depends on the persistence of cumulus-oocyte communications which are linked to the intracellular concentration of Camp. Ital J Anat Embryol 2001;106:241-8.

23. **Gospodarowicz D.** Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. J Biol Chem 1975; 250: 2515–2520.

24. **Gospodarowicz D, Bialecki H**. The effects of the epidermal and fibroblast growth factors on the replicative lifespan of cultured bovine granulosa cells. Endocrinology 1978; 103: 854–65.

25. **Gospodarowicz D, Bialecki H.** Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine, and human origin. Endocrinology 1979; 104: 757–64.

26. **Lavranos TC, Rodgers HF, Bertoncello I, Rodgers RJ**. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. Exp Cell Res 1994; 211: 245–51.

27. **Roberts RD, Ellis RC**. Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells in vitro. Biol Reprod 1999; 61: 1387–92.

28. **Grothe C, Unsicker K**. Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine adrenal gland, ovary, and pituitary. J Histochem Cytochem 1989; 37: 1877–83.

29. **Wordinger RJ, Brun-Zinkernagel AM, Chang IF.** Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) within growing and atretic mouse ovarian follicles. Growth Factors 9 1993; 279–289.

30. **van Wezel IL, Umapathysivam K, Tilley WD, Rodgers RJ**. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. Mol Cell Endocrinol 1995; 115: 133–40.

31. **Yamamoto S, Konishi I, Nanbu K, Komatsu T, Mandai M, Kuroda H, et al.** Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary. Gynecol Endocrinol 1997; 11: 223–30.

32. **Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R**. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. Endocrinol 2000; 167: 371–82.

33. **Amaya E, Musci TJ, Kirschner MW**. Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in xenopus embryos. Cell 1991;66:257-70.

34. **Pandey A, Gupta N, Gupta SC**. Improvement of *in vitro* oocyte maturation with lectin supplementation and expression analysis of Cx43, GDF-9, FGF-4 and fibronectin mRNA transcripts in buffalo (*Bubalus bubalis*). J Assist Reprod Genet 2009; 26: 365-71.

35. **Gupta PSP, Nandi S, Ravindranatha BM, Sarma PV**. In vitro maturation of buffalo oocytes with epidermal growth factor and fibroblast growth factor. Ind J Anim Sci 2002; 72: 23-4.

36. **Muggleton-Harris A, Whittingham DG, Wilson I.** Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse. Nature 1982; 299: 460-2.

37. **Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN**. Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyte development after in vitro fertilization. Mol Reprod Dev 1998; 51: 395-401.

38. **Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H.** Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor-α on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. Reprod Fertil 1994 ;100:439-46.

39. **Beker ARCI, Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM**. Effect of growth hormone releasing hormone (GHRH) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on in vitro bovine oocyte maturation. Theriogenology 2000; 53: 1771-82.

40. **Vorob, eva OA, Nikitin AI.** The effect of hormones and growth factors on regulation of meiosis in oocytes of mice during culture. Tsitologia 1991 ;33:42-9.

41. **Bieser B, Stojkovic M, Wolf E, Meyer H, Einspanier R**. Growth factors and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. Biol Reprod 1998; 59: 801-6.

نتایج نشان می‌دهد که میزان بلـوغ تخمـک، لقـاح و پتانـسیل تکـوین جنـین تـا مرحلـه بلاستوسیـست در حـضور غلظـت خاصی از فاکتور رشد فیبروبلاست افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه در طول کشت، جنین دچار دژنره شدن و بلوک می‌شود، لازم است که یک شرایط کشت مناسب فـراهم شـود کـه بـه شرایط *in vivo* نزدیک باشد. در این مطالعه مـشاهده شـد کـه فاکتور رشد فیبروبلاست در دوزهای بالا اثر منفـی بـر مـوارد مذکور دارد درحالی‌که در غلظـت ۲۰ ng/ml از FGF، بلـوغ و تکوین به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این تحقیق از همکـاری مـسئولین دانـشکده پزشـکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان از جمله آقای دکتر حیدرزاده بابت انجام آنالیز آمـاری و همچنـین آقـای فرشـاد جبـاری کارشـناس آزمایشگاه جنین شناسی قدردانی می‌نمایند

References

1. **Heikinheimo O, Gibbons WE**. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. Mol Hum Reprod 1998; 48: 745–56.
2. **Cooper A, Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW**. Differential effects of cryopreservation on nuclear or cytoplamic maturation in vitro in immature mouse oocytes from stimulated ovaries. Hum Reprod 1998; 13: 971-8.
3. **Chanson A, Nocera D, Senn A, De Grandi P, Germond M**. Development of a well-defined medium for the in vitro maturation of immature bovine cumulus–oocyte complexes. Assist Reprod Genet 2001; 182:97–105.
4. **Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, et al**. Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured in vitro. Biol Reprod 1999; 602:336–40.
5. **Zhang X, Rutledge J, Armstrong DT**. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured in vitro in a serum-free medium. Mol Reprod Dev 1991; 283: 292–6.
6. **Anderiesz C, Trounson AO**. The effect of testosterone on the maturation and developmental capacity of murine oocytes in vitro. Hum Reprod 1995; 109: 2377–81.
7. **Trounson A, Anderiesz C, Jones GM, Kausche A, Lolatgis N, Wood C**. Oocyte maturation. Hum Reprod 1998; 13: 52–62.
8. **Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, et al**. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. Hum Reprod 2000; 155: 1140–8.
9. **Gilula, N, Epstein M, Beers W.** Cell-to-cell communication and ovulation: a study of the cumulus cell–oocyte complex. J. Cell Biol 1978; 78: 58–75.
10. **Perreault SD, Barbee RR, Slott VL.** Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. Dev Biol 1988 ; 125: 181–6.
11. **Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG**. Glutathion concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. Biol Reprod 1993; 49: 89-94.
12. **Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y**. Effect of porcine oocytes matured in vitro. Gamete Res 1988; 21: 289-95.
13. **Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K , Kikuchi K**. Up data of in vitro production of porcine embryos.

Original Article

Effect of Fibroblastic Growth Factor on Resumption of Meiosis, In Vitro Maturation and Embryo Development of Immature Mouse Oocytes

Azarnia M., Ph.D., Ghasemian F., M.Sc., Bahadori M.H., Ph.D. * , Mohammad Ghasemi F., Ph.D., Ahmadi Jalali Moghaddam M., B.Sc.

** P.O.Box: 3477, Anatomy Department, Gilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran*

Abstract

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the effect of fibroblastic growth factor on resumption of meiosis, in vitro maturation of immature mouse oocytes and resulting embryo development with and without basic fibroblastic growth factor-4 (bFGF-4).

Materials and Methods: cumulus – oocyte complex (COCs) and germinal vesicle (GV) were obtained from female NMRI mice 46-48 hours after administration of an intra-peritoneal injection of 5 IU PMSG. COCs were cultured in TCM199 supplemented with different dosages of bFGF-4. After 24 hours, metaphase II (MII) oocytes were co-incubated with sperms for 4-6 hours in T6 medium. For all groups, the rate of cleaved embryos was assessed in the T6 medium until blastocyst stage.

Results: In all compared groups, the percentage of matured MII oocytes in the10 ng/ml (%94.4) and 20 ng/ml(%92.5) of bFGF-4 treatment groups, was significantly higher ($P<0.05$) than those of the control group but the percentage of embryos that developed to blastocyst in 20 ng/ml bFGF-4 treatment group was significantly higher than those of the control group ($P<0.05$).

Conclusion: Exogenous bFGF-4 improved the oocyte maturation and embryo development.

Key words: Fibroblast growth factor, IVM, IVF, Embryo Development