مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۹، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۰
صفحه: ۵۹۷-۵۸۶

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 19, No. 5, Nov-Dec 2011
Pages: 586-597

بررسی اثرات in vitro اسید آسکوربیک و FSH روی بلوغ اووسیت و فولیکول‌های موش

فاطمه برزگری فیروزآبادی*

کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشگاه پیام نور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۶/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۲

چکیده

مقدمه: توسعه و بهبود شرایط کشت آزمایشگاهی برای بلوغ اووسیت در محیط in vitro پیشرفتی در درمان ناباروری انسان و حیوانات می‌باشد. در این مطالعه به بررسی اثرات FSH و اسید آسکوربیک روی بلوغ فولیکول موش و اووسیت محصور در آن در محیط in vitro پرداختیم.

روش بررسی: برای آزمایش، فولیکول‌های پره آنترال تخمدان‌های موش‌های ماده ۶ هفته‌ای جدا و در محیط TCM199 کشت داده شدند. مقادیر خاصی از FSH و اسید آسکوربیک به محیط‌های کشت(حاوی ۳۰-۲۵ فولیکول) در طی آزمایشات جداگانه‌ای اضافه شد. غلظت‌های ۵، ۲۰، ۴۰،۶۰، ۱۰۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و ۲۲۰IU/l از FSH و غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۲۴۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ nmol/ml از اسید آسکوربیک استفاده گردید. فولیکول‌ها به مدت ۶ روز در محیط کشت‌ها داخل انکوباتور با درجه حرارت۳۷°C، رطوبت ۹۲٪ و CO2 ۵٪ در هوا کشت داده شدند. نوع مطالعه از نیمه تجربی بود و آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون ANOVA یکطرفه انجام گرفت. از آزمون Post hoc نیز برای مقایسه‌های چندگانه با درجه اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید. Pvalue<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج: در غلظت ۱۰۰IU/lFSH افزایش در قطر فولیکولی(۱۹۰µm)، میزان زیست‌پذیری(۹۱٪)، شکافتگی وزیکول ژرمینال (Germinal Vesicle Breakdown) (GVBD) (۸۱٪) و بلوغ اووسیت(۶۱٪) مشاهده شد($p \geq ۰/۰۵$). اسید آسکوربیک بقاء فولیکولی را افزایش داد(۴۲٪ و $p< ۰/۰۰۱$) اما روی قطر، شکافتگی وزیکول ژرمینال و میزان بلوغ اووسیت اثری نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری: محیط حاوی ترکیب اسید آسکوربیک و FSH افزایش قابل توجه‌ای در تمام پارامترها به جز قطر فولیکول‌ها نشان داد. FSH و اسید آسکوربیک هر یک به تنهایی میزان بلوغ فولیکول و اووسیت داخل آن را افزایش می‌دهند اما ترکیب آنها تاثیر قابل توجه تری روی سرعت رشد فولیکول‌ها و اووسیت محصور در آن دارد.

واژه‌های کلیدی: هورمون محرک فولیکولی، اسید آسکوربیک، فولیکول‌های پره آنترال

*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۵۲-۶۲۳۲۸۰۰، پست الکترونیکی: f.barzegary@gmail.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مقدمه

توسعه و بهبود شرایط کشت آزمایشگاهی برای بلوغ اووسیت در محیط In vitro، پیشرفتی در درمان ناباروری انسان و حیوانات محسوب می‌شود(۱). تحقیق و پژوهش در این زمینه از بیولوژی انسانی بسیار سخت و منمودار است. امروزه استفاده از مدل جوندگان پیشرفته‌ترین و عالی‌ترین سیستم را برای مطالعه در زمینه بلوغ فولیکول‌های نارس در آزمایشگاه (IVM: In vitro maturation) فراهم کرده است.

موش خانگی تنها گونه‌ای است که در مورد آن تمام مراحل رشد فولیکولی، بلوغ اووسیت، لقاح و انتقال جنین به بدن گیرنده ماده با موفقیت انجام شده است. در موش‌های خانگی فاز رشد طی ۱۲-۱۰ روز در محیط In vitro کامل می‌شود همچنین جداسازی فولیکول‌های پره‌آنترال در موش‌ها نسبت به انسان آسان‌تر انجام می‌گیرد. به هر حال حتی در موش‌های خانگی هم تلاش‌های بیشتری لازم است تا سیستم‌های کشت سلولی تصحیح و بی‌عیب شوند(۲).

تولید اووسیت بالغ و بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی فرآیندهای پایه و اساسی در تخمدان‌های پستانداران است. این فعالیت‌ها طی رشد و توسعه فولیکولی که خود یک فرآیند پیچیده و تحت کنترل هورمون‌ها است کامل می‌شود. فولیکول‌های مرحله ابتدایی(اشکالی که در تخمدان وجود دارد) یک منبع غنی برای تهیه اووسیت است(۱ و ۲) اما توانایی رساندن فولیکول‌های ابتدایی یا پره‌آنترال با اووسیت نابالغ به مرحله بلوغ در محیط In vitro یک شرط لازم و ضروری است. انتخاب محیط کشت به هدف آزمایش بستگی دارد و همیشه نوعی اعتدال رعایت می‌شود(۳).

بلوغ اووسیت‌های قابل بارور، فرآیند پیچیده‌ای است که به توسعه و رشد مناسب اووسیت در محیط خاص فولیکول‌های تخمدانی بستگی دارد. در هنگام تخمک گذاری، فولیکول بالغ و رسیده پاره می‌شود و اووسیت را آزاد می‌کند. هورمون FSH به وسیله گنادوتروپ‌های هیپوفیزی ترشح و به رسپتورهای خود در گنادها باند شده تولید هورمون‌های استروئیدی و تولید گامت‌ها(گامتوژنز) را تحریک می‌کند. هورمون محرک فولیکولی (FSH: Follicle Stimulate Hormone) جزء خانواده ایزوهورمون‌ها محسوب می‌شود و از یک زیر واحد آلفا و یک زیر واحد بتا با دو زیر واحد گلیکوزیلی تشکیل شده است(۴).

FSH هیپوفیزی رشد فولیکولی در محیط In vitro را حمایت و تایید می‌کند(۵). در افراد ماده، اندام و هدف اصلی FSH بافت تخمدان است جایی که FSH گسترش فولیکولی، بلوغ اووسیتی و تخمک‌گذاری را تحریک می‌کند(۷،۶). موش‌های ماده که زیر واحد بتای هورمون FSH آنها ناقص است، نابارور هستند(۱۰،۸،۹). FSH همچنین از آپوپتوزیر سلول‌های گرانولوزا در محیط‌های in vitro و in vivo ممانعت به عمل می‌آورد(۲،۱۰). این هورمون با چندین فاکتور رشد از جمله EGF(Epidermal Growth Factor)، ActivinA، اینهیبین، فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF-I: Insulin-Like Growth Factor I) واکنش می‌دهد و آنها را فعال می‌کند. اثرات فاکتورهای اندوکرینی و موضعی که در طول توسعه فولیکولی در محیط In vitro شرح داده می‌شود با توجه به محیط کشت و نوع گونه جانوری متفاوت خواهد بود.

اسید آسکوربیک(ویتامین C) یک مکمل غذایی بسیار مهم در پریمات‌ها و تعدادی دیگر از پستانداران است(۱۱). مقدار زیادی اسید آسکوربیک در تخمدان‌ها و دیگر بافت‌های اندوکرینی انباشته می‌شود. در تخمدان‌ها محل تجمع اسید آسکوربیک، سلول‌های گرانولوزا، تکا و لوتئال است که در ارتباط تنگاتنگ با میزان باروری می‌باشد.

با مطالعه سلول‌های گرانولوزای لوتئینی مشخص شده که اسید آسکوربیک تولید پروژسترون و غلظت آن را افزایش می‌دهد(۱۲) که این رابطه به صورت کنترل فیدبک منفی بسیار قوی است به طوری که افزایش پروژسترون به نوبه خود میزان اسید آسکوربیک را کاهش می‌دهد و ساخت آن را بلوکه می‌کند(۱۳،۱۲). اسید آسکوربیک از مرگ سلولی(Apoptosis) سلول‌های گرانولوزا و فولیکول‌های پره آنترال موش خانگی در محیط in vitro جلوگیری می‌کند و آن را به میزان زیادی کاهش می‌دهد(۱۴،۱۱). همچنین ثابت شده است که اسید آسکوربیک افزایش دهنده درصد فولیکول‌هایی است که

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

تمامیت و یکپارچگی غشاء پایه را حفظ می‌کنند.

موارد بالا نشان دهنده نقش چندگانه آنتی‌اکسیدانت‌ها در طول مسیر تولید فولیکول‌های جوندگان و سایر گونه‌های خانگی است(۱۱،۱۵).

مطالعه حاضر قصد دارد تا به اهمیت بیولوژیکی FSH و مکمل غذایی اسید آسکوربیک روی رشد فولیکولی فولیکول‌های پره آنترال موش‌های نابالغ و بلوغ اووسیت محصور در آن درمحیط In vitro بپردازد. آزمایشات زیادی برای بهبود بخشیدن به بلوغ In vitro لازم است انجام شود که امید می‌رود مطالعه حاضر کمکی در جهت هموارتر کردن مسیر باشد.

روش بررسی

این پژوهش در پاییز ۱۳۸۸ در پارک علم و فناوری یزد انجام شد. روش مطالعه در این بررسی از نوع نیمه تجربی بوده است. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشات کاملا خالص و بدون آلودگی بودند و از شرکت سیگما(Sigma, USA) خریداری شدند.

۳۰ سر موش سوری ماده(۱۶) از دانشگاه علوم پزشکی یزد تهیه و داخل لانه حیوانات تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. موش‌ها در خوردن آب و غذا محدودیتی نداشتند(۵). روش انتخاب موش‌ها به صورت تصادفی بود. نمونه‌های ۶ تا ۸ هفته ای برای جدا کردن فولیکول‌های حاوی تخمک استفاده شد(۱۷). تمام مراحل آزمایش طبق اصول اخلاقی انجام شد و موش‌ها به روش جابجایی گردن، همان طور که Degen در سال ۲۰۰۹ شرح داد کشته شدند(۱۸) و اجساد باقی مانده دفن شدند.

برای تهیه فولیکول‌های پره آنترال، تخمدان‌ها جدا و در داخل پتریدیش‌های کاملا استریل قرار داده شدند. سرم سلول‌های گوساله جنینی(FCS)(fetal calf serum) به عنوان منبع پروتئینی در نظر گرفته شد. FSH در محیط کشت بدون مکمل آماده و در ۱۰۰ml الکل در دمای ۲۰°C نگهداری شد تا برای تهیه غلظت‌های نهایی ۰-۲۰۰mIU/ml استفاده شود. محلول(5mg/ml) اسید آسکوربیک در محیط کشت TCM199 و الکل آماده و در دمای ۷۰°C- برای مدت یک ماه نگهداری شد.

پتریدیش‌ها در دمای اتاق با محیط کشت پایه Tcm 199 همراه با مکمل‌های پیروات سدیم(2mm)، گلوتامین(2mm)، پنی‌سیلین(75g/mlμ) و استرپتومایسین(50μg/ml) پر شده بودند(۱۱). در ابتدا بافت‌های پیوندی موجود در محیط کشت جدا شد. تخمدان‌ها به ذرات ریز قطعه قطعه و کورتکس تخمدانی با استفاده از اسکاپل برداشته شد. فولیکول‌های پره انترال(μm ۵± ۹۵) با یک یا دو لایه از سلول‌های گرانولوزای اطراف اووسیت به همراه لایه پایه ای دست نخورده که حاوی سلول‌های تکا می‌باشد از برش‌های غشایی زیر میکروسکوپ جدا شدند. فولیکول‌های جدا شده حاوی اووسیت سالم مرکزی و یک لایه نازک از سلول‌های تکا در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت TCM199 به همراه مکمل‌هایش داخل انکوباتور با درجه حرارت ۳۷°C، رطوبت ۹۲٪ و میزان Co_2 برابر ۵٪ کشت داده شدند.

برای ارزیابی اثرات مکمل‌های غذایی روی رشد اووسیت و فولیکول، غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۲۴۰، ۳۰۰ و ۴۰۰nmol/ml آسکوربیک اسید به محیط کشت‌های حاوی فولیکول‌ها اضافه گشت.

اطلاعات حاضر از رشد فولیکول‌ها تنها در مورد آنهایی است که در تمام دوره کشت ۶ روزه سالم مانده بودند. در روز دوم دوره، تمام فولیکول‌های سالم به محیط کشت تازه منتقل شدند و فولیکول‌هایی که در این مدت ۲ روزه، آسیب دیده بودند از مسیر آزمایش خارج شدند(حدود ۲ درصد). یکبار در روز، محیط کشت فولیکول‌ها تعویض می‌شد.

برای کم کردن خطا در نتایج آزمایش‌ها دوبار تکرار شدند و در هر بار تکرار گروه‌های ۳۰تایی فولیکول مورد بررسی قرار گرفت(از نظر آماری این تعداد قابل قبول می‌باشد) که در مجموع برای هر گروه آزمایشی تعداد ۶۰ فولیکول تخصیص داده شد در انتهای آزمایش‌ها برای هر گروه از نتایج مقدار میانگین محاسبه گردید. برای برقرای شرایط مشابه با گروه‌های تیمار و ممانعت از ایجاد خطا، گروه کنترل که حاوی ۳۰ فولیکول بود در محیط Tcm199 حاوی الکل کشت داده شد و در طول دوره آزمایش‌ها هیچ ماده‌ای به محیط کشت آن اضافه نشد.

آنالیزهای آماری

اثرات مواد مختلف روی بلوغ اووسیت، گسیختگی وزیکول

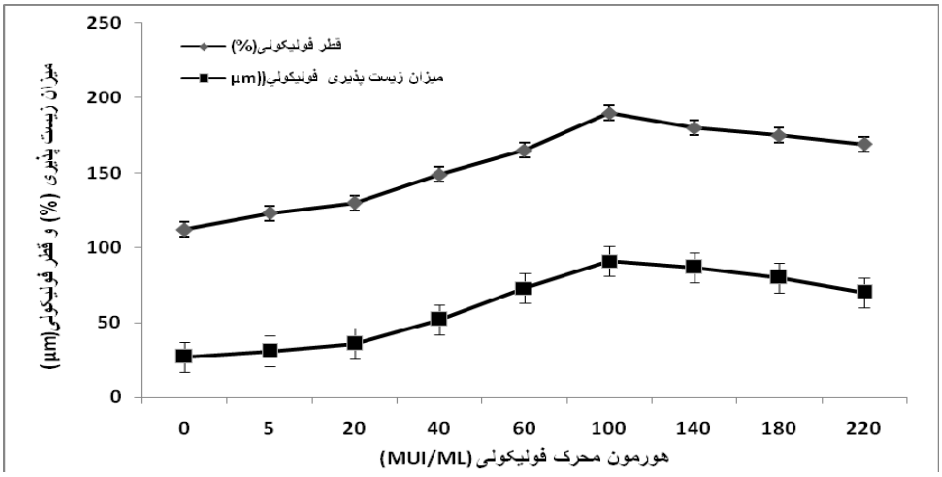
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

ژرمینال، تغییر قطر فولیکول‌ها و میزان ماندگاری آنها به وسیله آزمون ANOVA یکطرفه بررسی شد. درصدهای بدست آمده در آزمون ANOVA برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌های گروه‌ها مقایسه شدند. از آزمون Post hoc نیز برای مقایسه چندگانه با درجه اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 14.0 for Windows) انجام گرفت. P<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

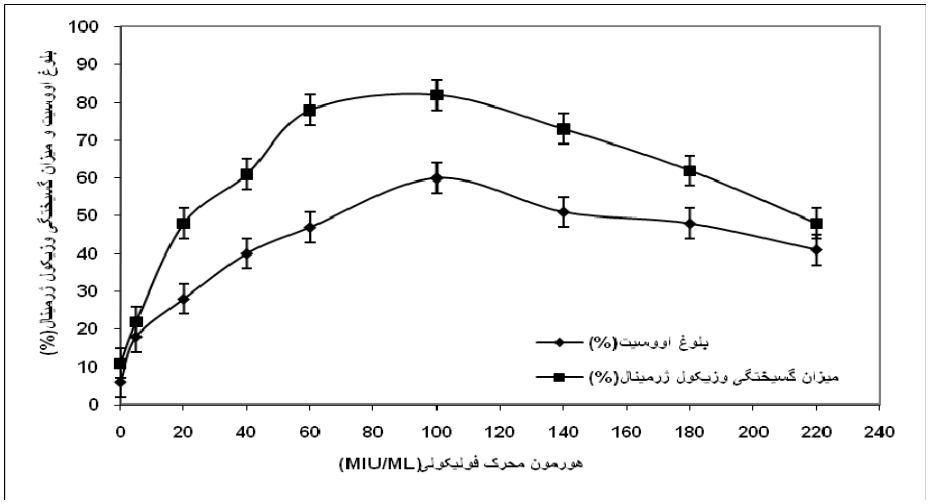
نتایج

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

میزان تاثیرات غلظت‌های مختلف FSH روی بلوغ اووسیت و درصد گسیختگی وزیکول ژرمینال در طول مدت ۶ روزه کشت با استفاده از آزمون ANOVA و Post hoc ارزیابی شد. تغییرات مورفولوژیکی فولیکول‌های پره آنترال موش‌های نابالغ در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. هیچ تغیی معنی‌داری در قطر و میزان ماندگاری فولیکول‌های پره آنترال تیمار شده با غلظت‌های ۵، ۲۰، ۴۰،۶۰، ۱۴۰، ۱۸۰ و ۲۲۰IU/l از FSH در مقایسه با گروه کنترل نشان ندادند. در مقابل افزایش معنی‌داری در قطر(۱۹۰µm) و قدرت زیست‌پذیری(۹۱٪) فولیکول‌ها در غلظت ۱۰۰mIU/ml FSH در دوره ۶ روزه کشت بدست آمد که با گروه کنترل و دیگر گروه‌های آزمایشی مقایسه شده است(P <۰/۰۰۰۱).



نمودار ۱: اثرات غلظت‌های مختلف FSH روی قطر فولیکولی(µm) و قدرت زیست‌پذیری فولیکولی(٪). N =۳۰(تعداد کلی فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش)، غلظت ۱۰۰mIU/ml از FSH مناسب‌ترین دوز شناخته شد.

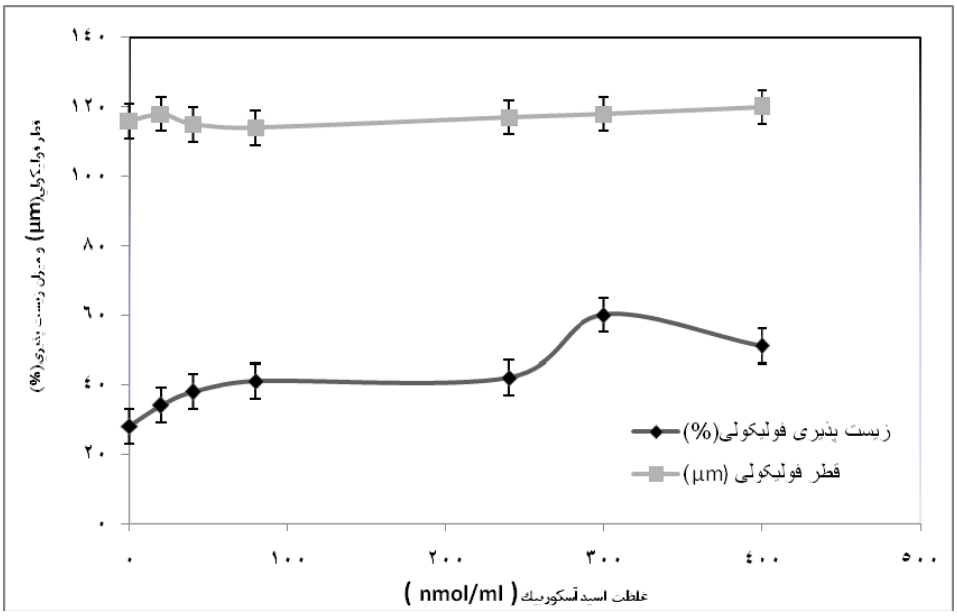


نمودار ۲: اثرات غلظت‌های مختلف FSH روی بلوغ اووسیت و GVBD. N =۳۰ (تعداد کلی فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش)، غلظت ۱۰۰mIU/ml از FSH مناسب‌ترین دوز شناخته شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

۲- اثرات اسید آسکوربیک روی قطر و قدرت زیست‌پذیری فولیکول‌های سالم:

فولیکول‌ها به مدت شش روز در محیط کنترل و محیط‌های حاوی غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۲۴۰، ۳۰۰ و ۴۰۰nmol/ml از اسید آسکوربیک کشت داده شدند. آنالیز داده‌ها در نرم‌افزار SPSS با استفاده از آزمون ANOVA و Post hoc نشان داد در غیاب اسید آسکوربیک، تنها ۲۷٪ فولیکول‌ها زنده می‌مانند. این فولیکول‌ها غشاء پایه پیوسته و یکپارچه و قطری در حدود ۱۱۲/۵ µm داشتند. علاوه بر این در محیط کشت‌های حاوی ۲۰، ۴۰ و ۸۰nmol/ml اسید آسکوربیک، افزایش غیر معنی‌داری در میزان بقاء فولیکول‌ها مشاهده می‌شود که در مقایسه با گروه کنترل قابل توجه نبود، در حالی که غلظت ۲۴۰nmol/ml اسید آسکوربیک افزایش نسبتاً قابل توجه‌ای در میزان بقاء فولیکول‌ها نشان می‌دهد(۴۲٪ و $p<0/001$) این افزایش در محیط کشت حاوی ۳۰۰nmol/ml اسید آسکوربیک بیشترین مقدار است(۵۹٪ و $p<0/001$) (نمودار ۳). هیچ کدام از غلظت‌های اسید آسکوربیک مورد استفاده بر روی قطر فولیکول‌ها تاثیرگذار نبود. فولیکول‌های گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک در تمام دوره ۶ روزه کشت دارای قطر یکسان و مشابه‌ای بودند(۱۱۱±۲µm)(نمودار ۳).

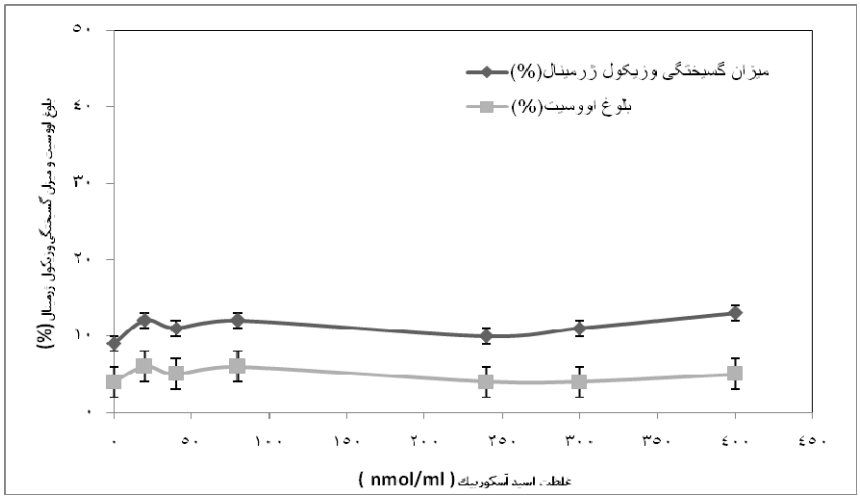


نمودار ۳: اثرات غلظت‌های مختلف اسکوربیک اسید روی قطر فولیکولی(µm) و قدرت زیست پذیری فولیکولی(٪).تعداد کلی فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش برابر ۳۰ عدد بود.

۳- اثرات اسید آسکوربیک روی بلوغ اووسیت و GVBD:

در روز ششم کشت، مطالعات بافت شناسی بر روی فولیکول‌های کشت شده در محیط کنترل و محیط‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک(۲۰، ۴۰، ۸۰، ۲۴۰، ۳۰۰ و ۴۰۰nmol/ml) انجام شد. با اتمام دوره، فولیکول‌ها با دقت توسط دو سوزن نازک شکافته شدند و مجموعه اووسیت توده‌ای(Cumulus oocyte complexes)(CoCs) که مجموعه‌ای از اووسیت با لایه‌های به هم فشرده سلول‌های کومولوس است از نظر مورفولوژیکی بررسی شد. همچنین درصد گسیختگی وزیکول ژرمینال و بلوغ اووسیت تعیین و مقایسه شد. در حضور اسید آسکوربیک یک روند آرام و تدریجی در بلوغ اووسیت و درصد گسیختگی وزیکول ژرمینال مشاهده می‌شود($p>0/05$) (نمودار ۴).

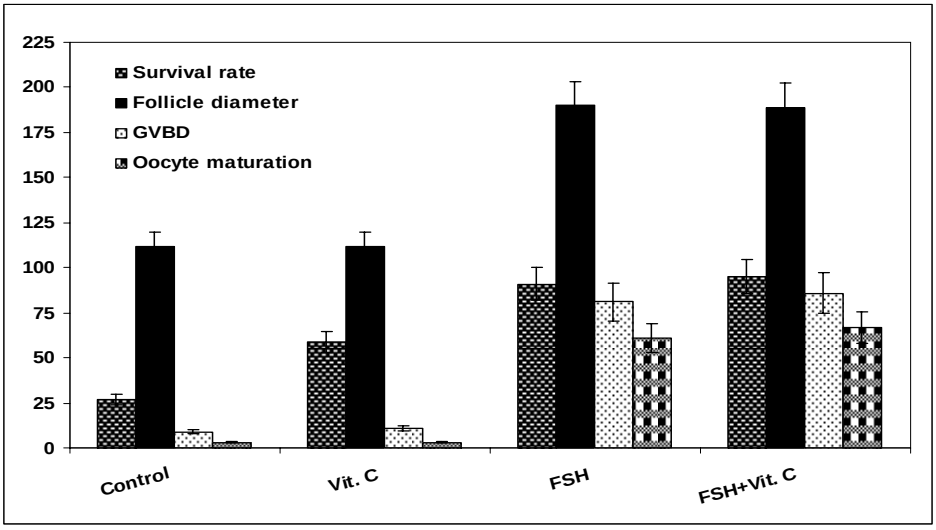
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



نمودار ۴: اثرات غلظت‌های مختلف اسید اسکوربیک روی بلوغ اووسیت و گسیختگی وزیکول ژرمینال (تعداد کلی فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش برابر ۳۰ عدد بود).

۴- مقایسه اثرات ترکیبی اسید آسکوربیک و FSH روی رشد فولیکول‌ها و اووسیت محصور در آنها:

آزمایش‌ها با اضافه کردن ۳۰۰nmol/ml اسید آسکوربیک همراه با ۱۰۰mIU/ml از FSH به محیط کشت تکرار شد. ترکیب اسید آسکوربیک و FSH افزایش ۹۵٪ در میزان بقاء فولیکول‌ها در مقایسه با گروه کنترل(۲۷٪) و محیط‌های بدون FSH(۵۹٪) نشان دادند($p<۰/۰۰۰۱$). در حالی که این افزایش در مقایسه با گروهی که تنها ۱۰۰mIU/ml از FSH دریافت کرده بود قابل ملاحظه نبود. قطر فولیکول‌ها نیز به بالاتر از ۱۸۹µm در محیط‌های ترکیبی در مقایسه با گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با اسید آسکوربیک(۱۱۲µm) رسید($p<۰/۰۰۰۱$). اما این افزایش در مقایسه با گروه دریافت کننده ۱۰۰mIU/ml از FSH قابل توجه نبود. بلوغ اووسیت(۶۷٪) و GVBD(۸۶٪) افزایش قابل ملاحظه‌ای در حضور اسید آسکوربیک و FSH در مقایسه با کنترل و سایر گروه‌ها نشان دادند($p<۰/۰۰۰۱$)(نمودار ۵).



نمودار ۵: اثرات ترکیبی و مقایسه ای اسید آسکوربیک و FSH روی رشد فولیکولی و اووسیت محصور در آن در طی مدت ۶ روز، آزمایشات در ۴ گروه انجام شد: رشد فولیکولی ۱) در محیط کشت به تنهایی(کنترل) ۲) در حضور ۳۰۰ nmol/ml اسید آسکوربیک ۳)FSH ۱۰۰ mIU/ml و ۴) FSH ۱۰۰mIU/ml + ۳۰۰nmol/ml اسید آسکوربیک، (تعداد کلی فولیکول‌های مورد بررسی در هر آزمایش برابر ۳۰ عدد بود).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

بحث و نتیجه گیری

فاکتور اندوکرینی اصلی که تنظیم کننده رشد فولیکول‌ها است هورمون محرک فولیکولی(FSH) نام دارد. آزمایشات ما به وضوح، نقش کلیدی FSH در افزایش رشد و تمایز فولیکول‌های پره آنترال ابتدایی در محیط in vitro را نشان می‌دهد.

FSH برای ساخت استروئید در پاسخ به آنزیم‌های تحریک کننده تمایز سلول‌های گرانولوزا و همچنین تشکیل حفره انتروم فولیکولی لازم و ضروری است. FSH همچنین تنظیم کننده پیوستگی بین اووسیت و سلول‌های گرانولوزای اطراف آن است(۱۹). Cortvrindt و همکاران(۱۹۹۷) اظهار کرد که FSH دارای نقش بسیار مهم و حیاتی در رشد فولیکول‌های ابتدایی محیط in vitro است. در موش خانگی، حذف FSH از محیط کشت بقای سلول‌های گرانولوزا را به خطر می‌اندازد و موجب مرگ سلول‌های فولیکولی می‌شود(۲۰).

Chun و همکاران در سال ۲۰۰۰ پیشنهاد کرد در شرایط فقدان FSH، انتشار و نفوذ چندین فاکتور مهم فیزیکی و شیمیایی از خلال غشاء پایه مختل می‌شود(۲۱). در محیط کشت فاقد FSH، به وفور خروج اووسیت از ساختمان فولیکولیش رخ داده است(۸،۲۰) این امر ممکن است به علت اختلال در اتصالات شکافدار(Gap Junction) یا کاهش تعداد اتصالات شکافدار باشد. با افزودن FSH به محیط کشت، رشد فولیکول‌های پره آنترال، قدرت زیست پذیری فولیکول‌ها و تشکیل حفره آنتروم فولیکولی موش‌های خانگی و صحرایی افزایش می‌یابد(۲۲). در انسان، FSH تولید استروژن و تشکیل حفره آنتروم در محیط in vitro را افزایش می‌دهد(۵،۲۳).

وجود گنادوتروپین‌ها تحریک کننده بیان بازدارنده‌های پروتئین‌های آپوپتوزیزی(IAP) می‌باشند، این بازدارنده‌ها توسط سلول‌های گرانولوزا در محیط‌های invivo و invitro تشکیل می‌شوند(۱۰). FSH با چندین فاکتور رشد از جمله activinA، اینهیبین و فاکتور رشد شبه اسنولینی۱(IGF-1) واکنش می‌دهد و بدین وسیله رشد فولیکولی را تحریک می‌کند. این تنظیم‌های داخل تخمدانی واسطه اثرات گنادوتروپین‌ها در واکنش‌های سلولی است. گنادوتروپین‌ها واکنش‌های سلولی را بوسیله مکانیسم‌های اتوکرین و پاراکرین تنظیم می‌کنند. از دیدگاه بیو شیمیایی با شروع تمایز لایه های سلولی گرانولوزا و سلول‌های داخلی و خارجی تکا، رسپتورهای FSH بر روی سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های پره آنترال ظاهر می‌شوند(۵،۷). در نتیجه فولیکول‌ها به گنادوتروپین ها وابسته می‌گردند هم چنین FSH نقش بسیار کلیدی در مهار آترزی فولیکولی دارد. در روند آترزی، آپوپتوزیز سلولی یک رکن پایه محسوب می‌شود که با حضور FSH در محیط کشت فولیکول‌های آنترال و پره آنترال موش‌های خانگی مهار می‌گردد(۱۰،۲۰،۲۴).

FSH هیپوفیزی و FSH نوترکیبی (rFSH) هر دو رشد فولیکولی را حمایت می‌کنند(۷،۲۵،۲۶). ولی طبق نتایج Wang در سال ۲۰۰۳ FSH نوترکیب فقط میزان رشد فولیکول‌های پره آنترال را به میزان خیلی اندک افزایش می‌دهد و روی بلوغ اووسیت و GVBD تاثیر چشم‌گیری ندارد(۱۰). این نتایج هم چنین توسط Baker در سال ۲۰۰۷ ارائه شد در حالی که Cortvrindt و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داد که حداقل غلظت ۱۰mIU/ml FSH برای رشد فولیکول‌های پره آنترال سالم در محیط ضروری است و در فقدان FSH، تنها ۱۷٪ از فولیکول‌ها زنده می‌مانند.

در سیستم محیط کشت in vitro، تمایز کامل فولیکول‌های پره آنترال تنها در حضور FSH امکانپذیر است(۲۷) Adriaens و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ با مدل کشت مشابه، یک بقاء فولیکولی ۱۰٪ را در فقدان FSH در محیط رشد in vitro گزارش کرد(۲۸).

همانطور که منحنی وابسته به دوز برای اثرات FSH در طول کشت فولیکولی پره‌آنترال نشان می‌دهد با افزایش غلظت FSH تا حداکثر۱۰۰mIU/ml، یک افزایش در سرعت رشد متوسط فولیکولی مشاهده می‌شود(۲۵). آزمایش‌های ما نشان می‌دهد که فولیکول‌های پره آنترال به افزایش سطح FSH عکس‌العمل نشان می‌دهند و با کشت فولیکول‌های پره آنترال می‌توان اثرات تنظیمی FSH بر روی آنها را بررسی و مطالعه کرد.

نتایج ما بیان می‌کند که FSH به میزان زیادی بلوغ اووسیت و GVBD را افزایش می‌دهد. این مشاهدات همچنین توسط

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

Cortvrindt و همکاران(۱۹۹۷) گزارش شد. در غلظت ۱۰۰mIU/mlFSH بیشترین درصد زیست‌پذیری فولیکول‌ها مشاهده می‌شود اما در غلظت‌های بالاتر از آن، میزان بقاء فولیکولی، GVBD و همچنین بلوغ اووسیت کاهش می‌یابد این مشاهدات در راستای گزارشات Nayadu و Osbom در سال ۲۰۰۶ است.

زمانی که ما بتوانیم شرایط محیط in vitro را به شرایط in vivo نزدیک کنیم میزان فولیکول‌هایی که زنده می‌مانند و به مرحله بلوغ می‌رسند و می‌توانند لقاح انجام دهند افزایش می‌یابد.

با جمع‌بندی نتایج این مطالعه و مطالعه‌های قبلی و با توجه به دلایلی که در بالا ذکر شد، نقش حیاتی FSH در رشد فولیکولی، میزان گسیختگی وزیکول ژرمینال و بلوغ اووسیت محصور در آن تایید می‌شود. با تایید این فعالیت‌های اصلی، معمولا FSH به محیط کشت فولیکول‌های پره آنترال موش خانگی و دیگر پستانداران بزرگ اضافه می‌شود.

همانند بافت‌های آندوکرینی دیگر، تخمدان‌ها نیز محل تجمع آسید آسکوربیک هستند که میزان آن در پاسخ به تحریکاتی از قبیل LH (Luteinizing Hormone)، cAMP (Cyclic Adenosine Mono Phosphate) و پروستاگلندین‌ها متغیر است(۲۹). در مقالات زیادی قابلیت اسید آسکوربیک به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی تایید شده است(۱۵،۳۰).

طی فرایند ساخت استروژن، انواع رادیکال‌های اکسیژن آزاد تولید می‌شود که گمان می‌رود اسید آسکوربیک به میزان زیادی این مواد اکسید کننده را خنثی می‌کند. در محیط کشت in vitro برای حفظ شرایط ایده‌آل و مناسب باید مقدار کافی اسید آسکوربیک به محیط اضافه کنیم. مطالعه حاضر طوری طراحی شده تا فولیکول‌های در حال رشد بتوانند در مقابله با رادیکال‌های آزاد یکپارچگی غشای خود را در محیط in vitro (غنی از مواد غذایی) حفظ کنند.

نتایج مطالعه حاضر تایید کننده فعالیت‌های چندگانه اسید آسکوربیک در کمک به رشد فولیکولی است. تاثیرات هورمونی در طی رشد و توسعه فولیکولی به خوبی شناخته شده است اما در مورد فرآیندهای فیزیکی مؤثر در رشد فولیکولی اطلاعات اندکی در دست است.

اگر چه اسید آسکوربیک هیچ تاثیری روی قطر فولیکول‌ها ندارد اما به طور قابل توجه‌ای درصد فولیکول‌های حاوی غشاء پایه یکپارچه را افزایش می‌دهد. آزمایشات ما نشان می‌دهد که در دوره کشت ۶ روزه، در غیاب اسید آسکوربیک تنها ۲۷٪ فولیکول‌ها بعد از اتمام دوره زنده می‌مانند در حالی که با اضافه کردن ۳۰۰nmol/ml اسید آسکوربیک به محیط کشت این درصد تا ۵۹٪ افزایش می‌یابد(نمودار ۳). این موضوع علت غلظت زیاد اسید آسکوربیک در مایع فولیکولی انسان را بیان می‌کند(۱۴،۳۱).

نتایج حاضر موافق گزارشات Rose و همکارانش در سال ۱۹۹۹ است(۳۲)، ایشان با افزودن سلنیوم و اسید آسکوربیک به محیط کشت توانست درصد فولیکول‌های زیست پذیر در محیط in vitro را افزایش دهد. در مطالعه حاضر هیچ سلنیومی به محیط کشت افزوده نشده است بنابراین تغییراتی که مشاهده می‌شود منحصرا مربوط به افزودن اسید آسکوربیک به محیط است. آزمایش‌های اولیه روی خوک‌ها نشان داد که دیواره فولیکولی این حیوانات در فقدان اسید آسکوربیک به شدت آسیب می‌بینند. کلاژن IV جزء اصلی تیغه پایه فولیکولی است که سلول‌های تکا و گرانولوزا هر دو می‌توانند در محیط in vitro آن را تولید کنند(۳۱). اسید آسکوربیک هم در سطح ژن و هم به عنوان کوفاکتور در ترشح و تثبیت پروتئین، موجب افزایش سنتز کلاژن می‌شود(۱۵،۳۳). بنابراین فرض می‌شود فولیکول‌های در حال رشد جهت ساخت ترکیبات غشاء پایه و حفظ یکپارچگی غشاء نیاز به مقادیر زیادی اسید آسکوربیک دارند.

اسید آسکوربیک بدون اینکه تاثیری روی رشد و قطر فولیکول‌ها داشته باشد قدرت زیست پذیری فولیکول‌های محیط in vitro را افزایش می‌دهد در نتیجه برای افزایش عملکرد هورمون FSH در محیط in vitro، اضافه کردن اسید آسکوربیک می‌تواند تاثیر قابل توجهی داشته باشد در واقع ویتامین C میزان آپوتپوزیز فولیکول‌های در معرض استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. انباشته شدن اسید آسکوربیک در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

محیط کشت می‌تواند بقاء فولیکولی را بهبود بخشد ولی برای افزایش قدرت زیست پذیری فولیکول‌ها، از FSH استفاده شد که میزان فولیکول‌های سالم را از ٪ ۵۹ به ٪ ۹۵ افزایش می‌دهد.

این مطالعه با امید ساخت و گسترش محیط مناسب کشت با استفاده از گونه موش خانگی انجام شد که مدل مناسبی برای ارزیابی اثرات ترکیبات مختلف روی توسعه و رشد فولیکولی در محیط in vitro است. آزمایشات زیادی برای بهبود بخشیدن به بلوغ in vitro لازم است انجام شود که امید می‌رود مطالعه حاضر کمکی در جهت هموارتر کردن انجام مطالعات آینده باشد.

سپاسگزاری

در پایان از دانشگاه پیام نور استان یزد به علت تامین اعتبار این طرح سپاسگزاری می‌گردد.

منابع:

1- Anderliesz, C, Fong CY, Bongso A, Trounson A. ***Regulation of human and mouse oocyte maturation in vitro with 6-methylaminopurine.*** Hum Reprod 2009; 15(4): 379-88.

2- Eppig JJ, O'Brien MJ. ***Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles.*** Biol Reprod 1996; 54(3): 197-207.

3- Smitz JEJ, Cortvrindt GR. ***The earliest stages of folliculogenesis in vitro.*** Reproduct 2002; 123(2): 185-202.

4- Dahl K, Stone MP. ***FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays, and their significance***. J Androl 2003; 13(1): 11-22.

5- Liu X, Andoh K, Mizunuma H, Kamijo T, Kikuchi N, Yamada K, et al. ***Effects of recombinant human FSH(rhFSH), urinary purified FSH(uFSH) and hMG on small preantral follicles and tertiary follicles from normal adult and androgen-sterilized female mice.*** J Fertil Steril 2000; 73(4): 372-80.

6- Chappel SC. ***Heterogeneity of follicle stimulating hormone: control and physiological function.*** Hum Reprod 2003; 1(2): 479-87.

7- Allan CMM, Haywood S, Swaraj J, Spaliviero A, Koch M. ***A novel transgenic model to characterize the specific effects of follicle stimulating hormone on gonadal physiology in the absence of luteinizing hormone actions.*** J Endocrinol 2008; 142(6): 2213-20.

8- Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM. ***The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction.*** J Endocrinol 2000; 141(5): 1795-803.

9- Bukovsky A, Chen TT, Wimalasena J. ***Cellular localization of luteinizing hormone receptor immunoreactivity in the ovaries of immature, gonadotropin-primed and normal cycling rats.*** Biol Reprod 2010; 48(2): 1367-82.

10- Wang Y, Rippstein PU, Tsang BK. ***Role and gonadotrophic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein expression during rat ovarian follicular development in vitro.*** Biol Reprod 2003; 68(3): 610-9.

11- Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, et al. ***Role of ascorbic acid and α-tocopherol in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro.*** Reproduct 2001; 121(3): 89-96.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

*12-*Byrd JA, Pardue SL, Hargis BM. ***Effect of ascorbate on luteinizing hormone stimulated progesterone biosynthesis in chicken granulosagranulosa cells in vitro.*** J Compar Biochem Physiol 2003; 104(2): 279-81.

*13-*Luck MR, Junglas B. ***Catecholamines and ascorbic acid as stimulators of bovine ovarian oxytocin secretion.*** Endocrinol 2002; 114(5): 423-30.

*14-*Eppig JJ, Hosoe M, O'Brien MJ, Pendola FM, Requena A, Watanabe S. ***Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose, α-tocopherol and ascorbic acid.*** J Mol And Cel Endocrinol 2000; 163(2): 109-16.

*15-*Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE. ***Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture.*** Reproduct 2001; 122(3): 487-95.

*16-*Cecconi S, Rucci N, Scaldafferi ML, Mascuilli MP, Rossi G, Moretti C, et al. ***Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity.*** J Endocrinol 2001; 140(4): 1783-8.

*17-*Mahmoudi R, Subhani A, Pasbakhsh P, Abolhasani F, Amiri I, Salehnia M, et al. ***The effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes.*** Ir J Reprod Med 2005; 3(2): 74-8.

*18-*Degen SM, Stanton PG, Loveland KL, Meachem SJ. ***Follicle stimulating hormone(FSH) with drawl induces germ cell apoptosis in the immature rat testis in vitro.*** J Endocrinology 2009; 51(9): 253-6.

*19-*Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. ***Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development.*** Reproduct 2001; 121(4): 647-53.

*20-*Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. ***In vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system.*** Hum Reprod 1997; 11(8): 2656-66.

*21-*Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafriri A, Hsueh AJ***. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I.*** Endocrinol 2000; 135(6): 1845-53.

*22-*McGee E, Spears N, Minami S, Hsu SY, Chun SY, Billig H, et al. ***Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 39, 59-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by folliclestimulating hormone.*** J Endocrinol 1997; 138(9): 2417-24.

*23-*Dumoulin JCM, Meijers CJJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL. ***Effect of oxygen concentration on human in vitro fertilization and embryo culture.*** Hum Repro 2008; 14 (2): 465-9.

*24-*Baker SJ, Spears N. ***Follicle stimulating hormone inhibits apoptosis in pre- and early-antral murine follicles in vitro.*** J Reprod Fertil Abstr Ser 2007; 19: 21.

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

*26-*Mao J, Wu G, Smith MF, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, et al. ***Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

antrum formation in vitro. Biol Reprod 2002; 67(8): 1197-203.

27-Cortvrindt R, Smitz J, Van-Steirteghem AC. ***Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro.*** Hum Reprod 2001; 12(5): 759-68.

28-Adriaens I, Cortvrindt R, Smitz JX. ***Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence.*** Hum Reprod 2005; 19(2): 398-408.

29-Sanyal S, Datta S. ***Effect of ascorbic acid in in vitro rat adrenal and ovarian steroidogenesis Ind***. J Experiment Biol 2003; 17(1): 86-8.

30-Padh H. ***Vitamin C: newer insights into its biochemical functions.*** Nutr Rev 2007; 49(1): 65-70.

31-Zhao Y, Luck MR. ***Gene expression and protein distribution of collagen, fibronectin and laminin in bovine follicles and corpora lutea***. Reprod Fertil 1995; 104(2): 115-23.

32-Rose UM, Hanssen JM, Kloosterboer HJ. ***Development and characterization of an in vitro ovulation model using mouse ovarian follicles.*** Biol Reprod 1999; 61(5): 503-11.

33-Pinnell SR. ***Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid: a review.***Yale J Biol Medi 2002; 58(4): 553-9.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

Effects of Ascorbic Acid and FSH on the Maturation of Mice's Oocytes and Follicles

Barzegari Firouzabadi F(MSc)*

Department of Animal Physiology, Payam Noor University, Tehran, Iran

Received: 22 Sep 2010 ***Accepted:*** 23 Jun 2011

Abstract

Introduction: Progress in laboratory culture conditions for in vitro oocyte maturation has led to development of the treatment of human and animal infertility. In this study we investigated the effects of FSH and ascorbic acid on the *in vitro* maturation of mouse's follicles and enclosed oocytes.

Methods: For experiment, intact pre-antral follicles were isolated from the ovaries of 6 week-old female mice and cultured in TCM-199 medium. Special quantities of FSH and ascorbic acid were added to the culture medium (containing 25-30 follicles) during separate experiments: 5, 20, 40, 60, 100, 140, 180 and 220 IU/L of FSH and 20, 40, 80, 240, 300 and 400 nmol/mL of ascorbic acid. Follicles were cultured for 6 days in an incubator at 37 °C, 92% humidity and 5% air CO_2. Our study was semi-experimental. The entire statistical analysis was carried out by SPSS (version 14.0 for Windows) using one way ANOVA. Post Hoc tests were used for the multiple comparisons at 95% confidence interval. P values < 0.05 were considered statistically significant.

Results: At FSH concentration of 100 IU/L increase in follicle diameter (190µm), survival rate (91%), germinal vesicle breakdown (GVBD) (81%) and oocyte maturation rates (61%) was observed ($p \geq 0.05$). Ascorbic acid increased survival rate (42%, $p<0.001$) but didn't affect diameter, GVBD and oocyte maturation rates.

Conclusion: Ascorbic acid and FSH-containing medium showed a marked increase in all parameters except for follicle diameter. FSH and ascorbic acid increase the maturation rate of follicles and enclosed oocytes but if they are supplied in a combination, this growth rate can be significantly increased.

Keywords: Follicle Stimulating Hormone; Ascorbic Acid; Ovarian Follicle; Oocytes; Mice

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

This paper should be cited as:

Barzegari Firouzabadi F. ***Effects of ascorbic acid and FSH on the maturation of mice's oocytes and follicles***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 19(5): 686-97.

Corresponding author: Tel:+ 98 352 6232800, Email: f.barzegary@gmail.com