مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۲، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۳
صفحه: ۱۲۷۳-۱۲۶۵

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 22, No. 3, Jul-Aug 2014
Pages: 1265-1273

تأثیر عصاره تخلیص شده پلاکت‌های خون بر روی رشد و بقاء اووسیت و فولیکول پره‌آنترال موش سوری نژاد NMRI

حسن پازکی*[۱]، حسین ایمانی[۲]، فرح فرخی[۳]، عبدالحسین شاهوردی[۴]، بیتا ابراهیمی[۵]، لیلا سادات طاهایی[۶]

۱،۶- کارشناس ارشد جنین شناسی، مرکز بیولوژی تولید مثل، موسسه رویان، تهران، ایران
۲- استاد گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
۳- دانشیار گروه بیولوژی، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی، ایران
۴،۵- دانشیار جنین شناسی، مرکز بیولوژی تولید مثل، موسسه رویان، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۱

چکیده

مقدمه: عناصر موجود در محیط کشت می‌تواند تأثیر فزآینده‌ای در رشد و تکوین فولیکول و اووسیت در محیط آزمایشگاهی داشته باشد. در مطالعه حاضر اثر عصاره پلاکت‌های خون روی رشد و بقای فولیکول و اووسیت در محیط آزمایشگاهی بررسی شده است.

روش بررسی: فولیکول‌های پره‌آنترال موش سوری نابالغ نژاد NMRI با ابعاد ۱۰۰ تا ۱۳۰ میکرومتر تهیه گردید. فولیکول‌ها برای مدت ۱۲ روز در محیط‌های متفاوت کشت داده شدند. محیط‌ها حاوی ۵ و ۱۰ درصد عصاره پلاکت‌های خون (PL) به عنوان محیط مورد آزمایش و دو محیط دیگر حاوی ۵ و ۱۰ درصد سرم گاوی (FBS) به عنوان محیط کنترل بودند. محیط کشت هر یک روز در میان تعویض گردید. در نهایت درصد بقاء و رشد فولیکول توسط میکروسکوپ اینورت یک روز بعد از کشت و در پایان کشت بررسی گردید.

نتایج: بعد از ۱۲ روز کشت اووسیت‌ها رشد معنی‌داری در محیط‌های دارای عصاره پلاکت‌های خون(PL) نشان دادند و توانستند به اندازه اووسیت‌های بالغ در محیط کنترل برسند. تعداد فولیکول‌ها بعد از یک روز در محیط حاوی ۱۰٪ FBS و محیط‌های آزمایشی نسبت به ۵٪ FBS کاهشی معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$). اما در پایان دوره ۱۲ روزه کشت بیشترین بقاء متعلق به محیط آزمایشی حاوی ۵٪ PL بود و تعداد فولیکول در دیگر گروه‌ها کاهشی معنی‌دار نسبت به این گروه آزمایشی نشان دادند ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: عصاره پلاکت‌های خون باعث بهبود محیط کشت فولیکول شده و در رشد اووسیت و میزان بقاء فولیکول‌ها مؤثر می‌باشد. به نظر می‌رسد PL می‌تواند به عنوان مکمل یا یک جایگزین مناسب برای سرم‌های معمول از جمله FBS باشد.

واژه‌های کلیدی: عصاره پلاکت‌های خون، سرم گاوی، بلوغ آزایشگاهی فولیکول، فولیکول پره آنترال

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۲۱-۳۶۰۳۲۷۲۱، پست الکترونیکی: hasan_fsh33@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-23]

مقدمه

بلوغ آزمایشگاهی فولیکول‌های پره‌آنترال به یک روش کارآمد برای کسب اووسیت‌های بالغ در شرایط آزمایشگاهی جهت استفاده در روش‌های کمک ناباروری (ART: Assist Reproductive Technology) تبدیل شده است(۱). این تکنیک به همراه روش‌های انجمادی نقش مهمی در باز گرداندن باروری در انسان و دیگر پستانداران دارد(۲). معمولاً دسترسی به فولیکول‌های آنترال با محدودیت همراه است به همین دلیل بهبود و تکامل محیط‌های کشت فولیکول‌های پره آنترال می‌تواند توانایی بالقوه‌ای در تولید تعداد زیادی اووسیت بالغ داشته باشد. از سویی دیگر اووسیت و فولیکول در مرحله پره‌آنترال خیلی سریع به حداکثر رشد خود می‌رسند(۳). رشد فولیکول‌ها از مرحله پری موردیال به پره آنترال مستقل از گنادوتروپین‌ها می‌باشد(۴). پس هنوز تحت اثر هورمون‌های تحریک‌کننده قرار نگرفته است. بنا به دلایل ذکر شده گرایش محققان به رشد و تکوین فولیکول‌های پره آنترال در شرایط آزمایشگاهی است و بهبود این تکنیک می‌تواند منجر به استفاده تا از این تکنیک جهت حفظ و نگهداری سلول‌های جنسی ماده برای زمان طولانی شود(۵). روش‌های متفاوتی جهت کشت فولیکول‌های پره‌آنترال موش ایجاد شده است در حالت کلی محیط‌ها ترکیبی از سرم مواد افزودنی و عوامل رشد می‌باشند. در شرایط مناسب یک فولیکول پره‌آنترال با یک اووسیت با توانایی میوزی می‌تواند به اندازه نهایی خود رسیده و یک تخمک بالغ آزاد کند.

تکنیک بلوغ آزمایشگاهی فولیکول (in vitro Folliculogenesis) نیاز به پیشرفت بسیاری دارد زیرا تخمک‌های نابالغ توانایی قابل قبولی جهت بلوغ و رسیدن به مرحله MII از خود نشان می‌دهند ولی رشد و تکوین متعاقب خیلی امیدوارکننده نیست. بین ۴۰ تا ۸۰ درصد از اووسیت‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی توانایی لقاح و مراحل اولیه جنینی را دارند ولی تنها ۱۵ درصد از آ نها به جنین تبدیل می‌شوند(۱۰-۶).

ساختن یک اووسیت لقاح پذیر و تولد نوزادان در پی رشد فولیکول پری آنترال موش در شرایط آزمایشگاهی با موفقیت انجام شده است(۱۱). به همین دلیل در گونه‌های دیگر تلاش‌ها بر روی کشت و رشد فولیکول پره آنترال متمرکز شده است. فولیکول‌های پره‌آنترال پستانداران به عنوان یک واحد عملیاتی برای کشت آزمایشگاهی فولیکول بسیار مناسب می‌باشند اما فولیکول‌ها در مرحله Primordial و Primary و بعد از جدا شدن از بافت‌های تخمدان در محیط کشت خوب رشد نمی‌کنند که این امر اهمیت فولیکول‌های پره آنترال را در فرآیند رشد بلوغ و تکوین آزمایشگاهی نشان می‌دهد(۱۲). از مهمترین چالش‌ها در فرآیند رشد و تکوین آزمایشگاهی فولیکول تهیه محیط کشت منطبق با شرایط داخل بدن In vivo می‌باشد(۱۲).

سرم اضافه شده به محیط کشت از مهمترین عوامل در بلوغ و تکوین آزمایشگاهی فولیکول می‌باشد. از معمول‌ترین این سرم‌ها می‌توان به سرم گاوی اشاره نمود. استفاده از این سرم مشکلاتی مانند هزینه بالا، وجود ترکیبات ناخواسته و شرایط سخت تولید دارد و همچنین تهیه این سرم از نوزاد گاو از نظر اخلاقی سؤال برانگیز است. بنابراین دانشمندان به دنبال جایگزین مناسبی برای سرم گاوی هستند. عصاره استخراج شده از پلاکت‌های خون با داشتن عناصر مورد نیاز در رشد سلولی می‌توانند تأثیر فزآینده‌ای در رشد و تکوین فولیکول و اووسیت داشته باشد و همچنین می‌تواند جایگزین بالقوه‌ای برای سرم گاوی باشد(۱۳).

پلاکت‌ها به واسطه نقشی که در جلوگیری از خونریزی دارد شناخته می‌شوند. پلاکت‌ها موادی را ترشح می‌کنند که فرآیند ترمیم و بهبودی بافت‌های آسیب دیده در محل زخم‌ها را تسریع می‌کند همین نکته باعث توجه محققان به این نوع سلول خونی و مواد مترشحه از آن شده است تا از مواد درون آن جهت ارتقاء محیط‌های کشت استفاده کنند(۱۴). برای اولین بار در دهه ۱۹۷۰ میلادی نشان داده شد که پلاکت در ترمیم زخم‌ها بسیار مؤثر است و دارای منابع غنی از عوامل رشد مثل (PDGF: Platelet-Derived Growth Factor) و (TGFβ: Transforming Growth Factor) به همراه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-23]

فیبرونکتین، آنزیم و دیگر عوامل می‌باشد و در رشد سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی مؤثر است(۱۷-۱۵). سپس در تحقیقات بعدی نشان داده شد که پلاکت انسانی علاوه بر عوامل رشد دارای گرانول‌های حاوی سیتوکاین‌های مؤثر در ترمیم بافتی می‌باشد(۱۸،۱۹). این مواد شامل عوامل رشد دیگری چون (IGF: Insulin-like Growth Factor), (Epidermal Growth Factor :EGF), (FGF :Fibroblast Growth Factor)، فیبرینوژن و سروتونین می‌باشد(۲۰). استفاده از عصاره پلاکت‌های خون (PL: Platetet Layset) جدید بوده و تاکنون اثر آن روی فولیکول بررسی نگردیده است اما دانشمندان از PL در آزمایشات دیگر استفاده کرده‌اند. در سال ۲۰۰۷ میلادی Alden و همکاران از PL در کشت سلول‌های تخمدان همستر چینی استفاده نمودند و میزان حیات سلول‌ها (Viability) ۹۰ درصد بوده و تعداد سلول‌ها هم نسبت به محیط سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovine Serum) افزایش چشمگیری داشته است. همچنین در سال ۲۰۱۲ میلادی آزمایش دیگری توسط Lohmann و همکاران انجام گردید در این مطالعه PL با دوزهای متفاوت روی سلول‌های مزانشیمی تأثیر داده شد که به شکل چشمگیری مؤثر بود(۲۱).

فرض این مطالعه این بود که PL با داشتن گروه وسیعی از عوامل رشد می‌تواند باعث غنی شدن محیط کشت جهت رشد و بقاء اووسیت‌های فولیکول پره آنترال موش سوری نژاد NMRI در شرایط آزمایشگاهی شود بنابراین تأثیر مثبتی در رشد و بقاء اووسیت و فولیکول‌های پره آنترال خواهد گذاشت. از اینرو فولیکول‌های پره آنترال موش سوری نژاد NMRI جدا گردید و در محیط حاوی PL کشت داده شد و میزان رشد آزمایشگاهی و درصد بقاء آنها بررسی گردید.

روش بررسی

پلاکت‌های خون از خون بند ناف در موسسه رویان تهران تهیه شده است. برای تهیه آن خون بند ناف پس از جمع‌آوری در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شده و در آزمایشگاه ابتدا با دور ۳۰۰ g سانتریفیوژ شده تا پلاسمای غنی از پلاکت (PRP :Plasma Reach Platelet) تهیه شود و سپس با دور ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شده تا کنسانتره پلاکتی جدا شود و آن عصاره در دمای $-70^{\circ}C$ نگهداری شد. در مرحله بعد این کنسانتره در بن ماری $37^{\circ}C$ ذوب گردیده و در نهایت لوله فالکون حاوی این فرآورده در دمای اطاق با دور ۳۰۰۰g سانتریفیوژ گردید تا عصاره پلاکت خون از آن جدا شود و نمونه عصاره پلاکتی پس از طی این مراحل در فریز $-20^{\circ}C$ نگهداری شد.

در این مطالعه از موش ماده ۱۲روزه سوری نژاد NMR1 استفاده گردید. موش‌ها به روش قطع نخاع کشته شدند و تخمدان‌ها جدا شده و در محیط α MEM (USA-Sigma) قرار گرفت که حاوی ۱۰٪ FBS (Gibco) و ۱۰۰IU/ml پنیسیلین، ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین (USA-Sigma) می‌باشد سپس فولیکول‌ها در مرحله پره آنترال به شکل مکانیکی جدا شده و فولیکول‌هایی انتخاب شدند که بین (۱۰۰-۱۳۰µM) اندازه داشته باشند و حاوی ۲ تا ۳ لایه گرانولوزا با هسته قابل رؤیت و سالم در مرکز باشد(۲۲).

فولیکول‌های انتخاب شده در محیط کشت قرار گرفتند. محیط‌های کشت شامل α MEM (USA-Sigma), IU/ml ۱۰۰m (USA-Sigma)FSH, (USA-Sigma) LH 10mIU/ml، انسولین µg/ml ۵، ترانسفرین µg/ml۵، سلنیوم µg/ml۵ (USA-Sigma) بودند که با لایه‌ای از Mineral oil (USA-Sigma) پوشیده شده و در پتری دیش (Germany-60x15 Falcon) قرار گرفتند. محیط‌های کشت علاوه بر موارد بالا از نظر سرم متفاوت بودند به این صورت که دو محیط اول به عنوان محیط‌های مورد آزمایش حاوی PL ۵٪ و ۱۰٪ بودند و دو محیط دیگر به عنوان محیط کنترل حاوی (Gibco) ۵٪ و ۱۰٪ FBS بودند. در هر ظرف کشت ۱۶ قطره ۲۰µL از محیط کشت قرار داده شد و در هر قطره یک فولیکول قرار گرفت. آزمایش ۶ بار تکرار گردید و در هر محیط ۹۶ فولیکول و جمعاً ۳۸۴ فولیکول مورد آزمایش قرار گرفت.

محیط‌های کشت هر یک روز در میان تعویض شدند. فولیکول‌ها به مدت ۱۲ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با رطوبت ۱۰۰٪ و CO_2 ۵٪ انکوبه شدند(۲۲). داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست توکی مورد

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-23]

تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

کشت به مدت ۱۲ روز نشان داد که اندازه اووسیت‌ها در مقایسه با روز اول در همه محیط‌های آزمایش به شکل معنی‌داری افزایش یافته بود (p<۰/۰۵). هر چند بهترین رشد در محیط کنترلی FBS ۵٪ مشاهده گردید ولی رشد اووسیت‌ها در پایان روز دوازدهم در همه محیط‌های آزمایشی مشابه بود و اختلاف معنی‌داری بین آنها در روز دوازدهم مشاهده نشد. همان طور که در جدول یک دیده می‌شود اووسیت‌ها توانستند در محیط‌های بدون سرم و فقط با حضور PL رشد کرده و به اندازه اووسیت‌های بالغ در محیط‌های دارای FBS برسند.

نمودار یک نشان می‌دهد که میزان بقاء فولیکول‌ها بعد از یک روز کشت در محیط حاوی FBS ۵٪ به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بوده است (p<۰/۰۵). در دیگر گروه‌ها کاهش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌ها مشاهده گردید (p<۰/۰۵). بیشترین کاهش مربوط به گروه حاوی PL ۵٪ بود که ۹۳٪ از فولیکول‌ها زنده ماندند.

بعد از پایان کشت در روز دوازدهم درصد بقاء فولیکول‌های زنده در محیط آزمایشی PL ۵٪ به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها آزمایشی بود (p<۰/۰۵). بیشترین کاهش نیز مربوط به محیط حاوی PL ۱۰٪ بود.

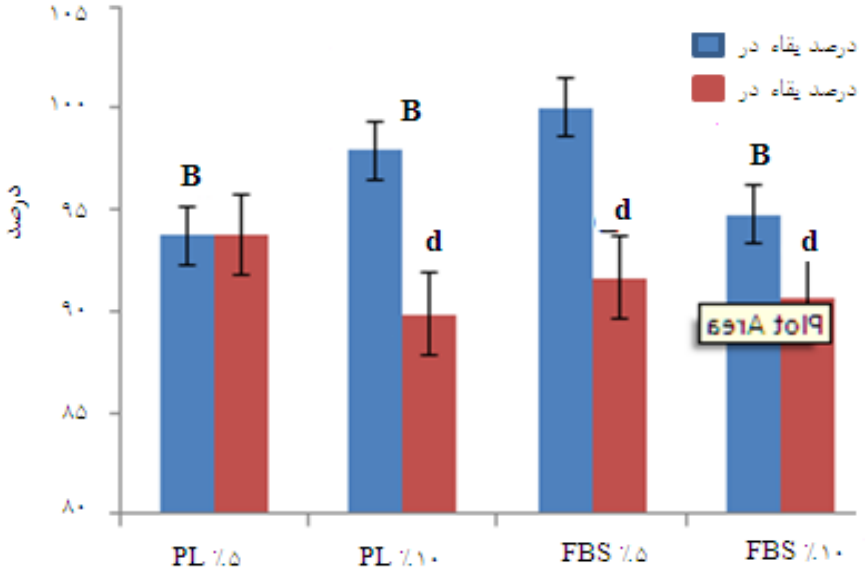
جدول ۱: وضعیت رشد اووسیت (اندازه اووسیت) در گروه‌های مورد مطالعه

	روز صفر (میانگین±انحراف معیار)	روز دوم (µm) (میانگین±انحراف معیار)	روز چهارم (µm) (میانگین±انحراف معیار)	روز هفتم (µm) (میانگین±انحراف معیار)	روز نهم(µm) (میانگین±انحراف معیار)	روز دوازدهم (µm) (میانگین±انحراف معیار)
٪۵FBS	۶۰/۳۱±۲/۸۶	۶۳/۱۲±۲/۵	۶۵/۳۱±۳/۴	۷۲/۴۳±۶/۲۵	۸۰±۵/۱۶	۸۲/۱۸±۲/۵۶*
٪۱۰FBS	۶۰/۲۸±۲/۳۹	۶۲/۱۶±۲/۳۹	۶۴/۱۳±۲/۲۱	۷۳/۲۶±۴/۴۲	۷۸/۷۸±۲/۸۶	۸۱/۱۲±۲/۵۸*
٪۵PL	۶۰/۳۱±۲/۸۶	۵۹/۳۷±۳/۰۹	۶۲/۵±۳/۱۶	۶۸/۴۳±۳/۰۱	۷۲/۵±۴/۰۸	۸۰/۶۲±۳/۵۹*
٪۱۰PL	۶۰/۶۲±۳/۰۹	۶۱/۲۵±۲/۸۸	۶۳/۷۵±۳/۸۷	۶۸/۷۵±۵/۶۲	۷۵/۹۳±۴/۵۵	۸۰/۳۱±۴/۲۶*

توجه: اعداد به صورت درصد (میانگین متوسط ± انحراف معیار) است

* میزان معنی‌داری بین گروه‌ها مختلف و در مقایسه با روز صفر (p<۰/۰۵) بوده است

نمودار ۱: مقایسه درصد بقاء فولیکول‌ها در محیط‌های مختلف کشت



B = میزان معنی‌داری در مقایسه با گروه FBS ۵٪ در بین دیگر گروه‌ها p< ۰/۰۵ بوده است

d = میزان معنی‌داری در مقایسه با گروه L ۵٪ در بین دیگر گروه‌ها p<۰/۰۵ بوده است

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-23]

بحث و نتیجه‌گیری

بلوغ و تکوین آزمایشگاهی فولیکول نه تنها در بدست آوردن یک اووسیت بالغ لقاح‌پذیر به ما کمک خواهد کرد بلکه با این روش می‌توان عوامل دخیل در تکوین و بلوغ آزمایشگاهی فولیکول را بهتر شناخت و گام‌های مهمی در جهت بهبود این تکنیک برداشت. هدف نهایی در بلوغ آزمایشگاهی فولیکول کسب اووسیت بالغ و لقاح پذیر است(۲۶-۲۳). در سال‌های اخیر محیط‌های کشت مختلفی جهت تکوین فولیکول و بلوغ آزمایشگاهی تخمک در گونه‌های متفاوت پستانداران بررسی گردیده است. استفاده از این تکنیک‌ها جهت حفظ باروری در انسان و یا حفظ گونه‌های در خطر انقراض و همچنین تاسیس یک بانک اووسیت می‌تواند جهت مقاصد تحقیقاتی مفید باشد(۲۷). بنابراین تکامل محیط‌های کشت و تکنیک‌های مورد استفاده در روش های کمک ناباروری می‌تواند آینده‌ای روشن در درمان ناباروری در انسان را ترسیم نماید.

در مورد فولیکول پره آنترال انتخاب محیط کشت و گونه مورد مطالعه بسیار تعیین کننده است اولین اقدام در کشت و تکوین فولیکول پره آنترال در سال ۱۹۹۴ میلادی توسط Figueiredo انجام شد و در سال‌های بعد هم تلاش‌های مشابهی روی گوسفند، خوک و موش انجام گردید و نتایج جالب توجهی بدست آمد(۱۲). ارتقاء محیط کشت می‌تواند تأثیر بسزایی در کسب اووسیت مطلوب جهت استفاده در موارد تحقیقاتی و حتی در درمان ناباروی داشته باشد. در سال های اخیر توجه زیادی به عصاره پلاکت‌های خون به عنوان یک ماده که می‌تواند باعث غنی شدن محیط‌های کشت شود امیدهای تازه‌ای را در استفاده از آن در کشت سلولی ایجاد کرده است. هرچند این ایده که PL می‌تواند باعث تأثیری شگرف در افزایش موفقیت کشت سلولی شود بسیار نو و بکر است ولی برای اولین بار نتیجه کار Alden و همکاران در سال ۲۰۰۷ میلادی مسیری جدید در کشت سلولی ایجاد نموده است. در آزمایشات انجام شده بر روی سلول‌های تخمدان همستر چینی، میزان بقاء بسیار بالا بوده که نشان از اثر مطلوب PL روی رشد و بقاء سلولی دارد(۲۰). در مطالعه حاضر تلاش بر این بود تا تأثیر PL بر روی بقاء فولیکول‌ها در طول مدت کشت بررسی شود. در این مطالعه PL در افزایش بقاء فولیکول‌ها تأثیر داشت هر چند بعد از یک روز کشت تعداد فولیکول‌ها کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در گروه‌های آزمایشی حاوی PL داشتند اما با سازگار شدن فولیکول‌ها با محیط جدید تعداد فولیکول‌ها در پایان کشت در محیط‌های حاوی PL نسبت به گروه‌های کنترلی بهتر شده بود و بهترین درصد بقاء متعلق به گروه آزمایشی PL ۵٪ بود.

تکوین و بلوغ فولیکول به طور کلی شامل دو بخش می‌باشد: بلوغ هسته و بلوغ سیتوپلاسم. بلوغ هسته‌ای معمولاً به فرآیندی گفته می‌شود که اووسیت رشد کرده و ژرمینال ویزیکول (GV) میوز را از سر گرفته و به مرحله MII می‌رسد و بلوغ سیتوپلاسمی بیشتر یک حالت عمومی دارد و به دیگر مراحل بلوغ گفته می‌شود که مسئول آماده کردن اووسیت جهت لقاح و تشکیل جنین است(۲۱،۲۳). درون فولیکول تنظیم بلوغ تخمک و وظایف هسته توسط اتصالات شکافی، ارتباطات پاراکرینی و دیگر عوامل بین سلولی کنترل می‌شود(۳۰-۲۸).

در شرایط داخل بدن علایم متفاوتی نشان‌دهنده بلوغ اووسیت می‌باشد. یکی از مهمترین نشانه‌های بلوغ افزایش اندازه اووسیت است(۳۱). بر اساس نتایج مطالعه اووسیت‌ها در محیط‌های غنی شده با PL و بدون سرم به شکل معنی‌داری توانستند رشد کرده و به اندازه یک اووسیت بالغ در محیط‌های کنترلی برسند ($p<۰/۰۵$). با توجه به این که رشد اووسیت می‌تواند یکی از نشانه‌های بلوغ باشد بنابراین می‌توان به این نکته اشاره کرد که PL می‌تواند روی رشد و بلوغ اووسیت مؤثر بوده و می‌توان از آن به عنوان یک ماده افزودنی و مؤثر در محیط کشت و بلوغ اووسیت در آینده استفاده نمود.

استفاده از عصاره تخلیص شده پلاکت‌های خون یک تلاش جدید در جهت غنی کردن محیط و یا حتی به عنوان جایگزین مناسب برای سرم‌های متداول است. با توجه به اینکه در مطالعات Alden و همکاران و Lohmann و همکاران به بررسی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-23]

اثر این ماده در رشد و بقاء فولیکول و اووسیت پرداخته شد و نتایج حاکی از آن بود که PL می‌تواند نقش تعیین کننده‌ای در کشت سلولی و تکوین آزمایشگاهی فولیکول در آینده بازی کند(۲۰،۲۱).

هرگونه تغییر در محیط کشت می‌تواند بر روی رشد و بقاء سلول‌ها مؤثر باشد. تغییر محیط کشت از سرم‌های معمول مانند FBS که میزان ایمونوگلوبولین کمی دارند به عصاره پلاکت خون که ترکیبی متفاوت دارد و البته میزان ایمونوگلوبولین بالاتری نسبت به سرم‌های معمول مثل FBS دارد می‌تواند روی بقاء فولیکول‌ها به خصوص در مراحل اول کشت مؤثر باشد(۳۲).

در این مطالعه در ابتدای کشت میزان بقاء در محیط‌های دارای PL کاهشی معنی‌داری نسبت به محیط کنترلی حاوی FBS داشت که می‌تواند نشان دهنده تأثیر تغییر محیط و بالاتر بودن بعضی ترکیبات مثل ایمونوگلوبولین باشد ولی در ادامه با هماهنگ شدن فولیکول‌ها با محیط این شرایط تغییر کرده است و حتی در پایان کشت بهترین بقاء مربوط به PL ۵٪ بوده است.

البته استفاده از دوزهای متفاوت PL و آزمایشات دیگر با تعداد بیشتر فولیکول و در مورد جانوران دیگر پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

در پایان از زحمات اساتید و همکاران زحمت‌کش در بخش‌های جنین‌شناسی حیوان خانه و همکاران عزیز در قسمت مولکولی و تهیه PL در موسسه رویان تهران و اساتید گرامی دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References:

1- Nottola SA, Cecconi S, Bianchi S, Motta C, Rossi G, Continenza MA, et al. ***Ultra structure of isolated mouse ovarian follicles cultured in Vitro.*** Reprod Biol Endocrinol 2011; 9: 3.

2- Cecconi S. ***Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspectives.*** J Reprod Dev 2002; 48(5): 431-45.

3- Smitz JE, Cortvrindt RG. ***The earliest stages of Folliculogenesis in vitro.*** Reproduction 2002; 123(2): 185-202.

4- Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. ***Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences.*** J Anim Sci 2004; 82: E63-74

5- Carroll J, Gosden RG. ***Trans plantation of frozen-thawed mouse primordial follicles.*** Hum Reprod 1993; 8(8): 1163-67.

6- Chian RC, Lim JH, Tan SL. ***State of the ART in in vitro oocyte maturation.*** Curr Opin Obstet Gynecol 2004; 16(3): 211-19.

7- Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J. ***Oocyte maturation and embryonic failure.*** Hum Reprod Update 1998; 4(3): 223-36.

8- Trounson A, Anderiesz C, Jones G. ***Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence.*** Reproduction 2001; 121(1): 51-75.

9- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. ***Pregnancy after in vitro Fertilization of human***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-23]

follicular oocytes collected from nonstimulated cycles. Their Culture in vitro and their transfer in donor oocyte program. Fertil Steril 1991; 55(1): 109-13.

10- Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. ***A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries.***Obstet Gynecol 2002; 100(4): 665-70.

11- Spears N, Boland NI, Murray AA, Gosden RG. ***Mouse oocytes derived from in vitro-grown primary ovarian follicles are fertile.*** Hum Reprod 1994; 9(3): 527-32.

12- Picton HM, Houris SE, Muruvi W, Chambers EL. ***The in vitro growth and maturation of follicles.*** Reproduction 2008; 136(6): 703-15.

13- Johansson L, Klinth J, Holmqvist O, Ohlson S. ***Platelet lysate, a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture.*** Cytotechnol 2003; 42(2): 67-74.

14- Anitua E, Anidia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. ***Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration.*** Thromb Haemost 2004; 91(1): 4-15.

15- Mirabet V, Solves P, Minana MD, Encabo A, Carbonell Uberos F, Blanquer A, et al. ***Human platelet layset enhances the proliferative activity of cultured human fibroblast-like cells from different tissues.*** Cell Tissue Banking 2008; 9(1): 1-10.

16 -Balk SD. ***Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium.*** Proc Natl Acad Sci USA 1971; 8(2): 271-75.

17- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. ***A plateletdependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro.*** Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71(4): 1207-10.

18- Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. ***Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblast.*** Blood 1979; 53(6): 1043-52.

19- Ledent E, Wasteson A, Berlin G. ***Growth factor release during preparation and storage of platelet concentrates.*** Vox Sang 1995; 68(4): 205-9 .

20- Alden A. Gonzalez L, Persson A, Christensson K, Holmqvist O, Ohlson S. ***Porcine platelet layset as a supplement for animal Cell culture.*** Cytotechnol 2007; 55(1): 3-8.

21- Lohmann M, Walenda G, Hemeda H, Joussen S, Drescher W, Jockenhoevel S, et al. ***Donor age of human platelet lysate affects proliferation and ifferentiation of mesenchymal stem cells.*** PloS ONE 2012; 7(5): e37839.

22- Sun F, Betzendahl I, Shen Y, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. ***Reantral follicle culture as a novel in vitro assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes.*** Mutagenesis 2004; 19(1): 13-25.

23- Eppig JJ, Schroeder AC. ***Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro.*** Biol Reprod 1989; 41(2): 268-76.

24- Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. ***Effects of low O2 and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture.*** Hum Reprod 2001; 16(4): 737-48.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-23]

25- Hartshorne GM. ***In vitro culture of ovarian follicles***. Rev Reprod 1979; 2(2): 94-104.

26- Van den Hurk R, Bevers MM, Beckers JF. ***In vivo and in vitro development of preantral follicles.*** Theriogenol 1997; 47(1): 73-82.

27- Kurilo LF.***Oogenesis in antenatal development in man.*** Human Genetics 1981; 57(1): 86-92.

28- Sutton ML, Gilchrist B, Thompson G. ***Effects of in-vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus–oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity.*** Hum Reprod Update 2003; 9(1): 35-48.

29- Roberts R, Franks S, Hardy K. ***Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes.*** Hum Reprod 2002; 17(11): 2950-56.

30- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. ***Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development.*** Reproduction 2001; 121(5): 647-653.

31- Pedersen T, Peters H. ***Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary.*** J Reprod Fertil 1968; 17(3): 555-57.

32- Biebake K. ***platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures.*** Transfus Med Hemother 2013; 40(5): 326-35.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-23]

The Effect of Platelet Layset on Growth and Survival of Oocytes and Pre-Antral Follicles of Prepubertal NMRI Mouse

Pazoki H(MSc)*[*1], Eimani H(PhD)[2], Farokhi H(PhD)[3], Shahverdi AH(PhD)[4], Ebrahimi B(PhD)[5], Tahaei L(MSc)[6]

[1,4,5,6]*Department of Embryology, Center of Reproductive Biology, Royan Institute, Tehran, Iran*
[2]*Department of Anatomy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3]*Department of Biology, Urmia University, West Azarbaijan, Iran*

Received: 3 Sep 2013 ***Accepted:*** 22 May 2014

Abstract

Introduction: Elements present in the culture medium play important roles in cell culturing and vitro follicle culture. In recent years, a great deal of research has been focused to improve the culture medium. In this study, the effect of platelet layset extraction was investigated on growth and survival of oocyte and follicle .

Methods: Pre-antral follicles of prepubertal NMRI mouse were prepared with diameter of 100-130µm and cultured for 12 days in different culture mediums. Culture mediums in experimental groups were enriched by 5 and 10% PL, whereas those of two control groups were prepared by 5 and 10% FBS. Each culture medium was refreshed every other day. Eventually, survival rate and growth of follicles were evaluated by inverted microscope after one day and at the end of culturing.

Results: Oocytes in medium with PL had significant growth and reached to size of mature oocytes in medium with FBS ($p<0.05$). Oocytes diameter reached to 80.62±3.59 and 80.31±4.26 µm after 12 days in medium with 5 and 10%PL compared to those of oocytes in 5 and 10% FBS which were measured as 82.18± 2.56 and 82.12±2.58 µm respectively. The number of follicles had significant decrease in medium with10% FBS and experimental groups (5&10%PL) compared to 5% FBS ($p<0.05$). After 12 days, best survival rate belonged to 5%PL and the number of follicles declined significantly in control groups and 10%PL ($p<0.05$).

Discussion: platelet layset improved, oocyte growth and follicle survival and culture medium of follicle. Therefore, PL can be considered as an appropriate replacement for common serums such as FBS in the future.

Keywords: Fetal Bovine Serum (FBS); In vitro folliculogenesis; Platelet layset (PL); Pre-antral follicle

This paper should be cited as:
Pazoki H, Eimani H, Farokhi H, Shahverdi AH, Ebrahimi B, Tahaei L. ***The effect of platelet layset on growth and survival of oocytes and pre-antral follicles of prepubertal NMRI mouse***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(3): 1265-73.

****Corresponding author: Tel: +98 21 36032721, Email: hasan_fsh33@yahoo.com***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-23]