Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:36 +0330 on Monday September 25th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 17(93): 1-8

The Effective of Cord Blood Platelet Extraction (PL) on Meiosis Resumption and Maturation of Mouse Oocyte at Germinal Vesicle stage (GV)

Pazoki H[1]*, Iimani H[1], Farokhi F[2], Shahverdi A H[1], Tahaei LS[1]

1-Department of Embryology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
2- Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 7 Oct 2014, Accepted: 12 Nov 2014

Abstract

Background: Maturation of oocytes and fertilization in vitro can be considered as one of the most important steps to treat infertility. In this study maturation medium was enriched with Platelet extraction (PL) which has high concentration of growth factors. Meiosis resumption and maturation was monitored after 18 hours of maturation.

Materials and Methods: In this experimental study, oocytes at germinal vesicle stage were obtained from mature NMRI female mice. Maturation medium was αMEM and the control groups had 5-10% FBS and the medium in the experimental groups was enriched by 5, 10% PL and the combination of 5% PL and 5% FBS. Meiosis resumption and maturation were observed after 18 hours.

Results: The rate of matured oocytes in the experimental group 5% PL for both COC and DO group was significantly higher than the control groups ($P<0.05$). The maturation rate for 5% PL was 61% for the COC group and 72% for the DO group; while this rate for 5% FBS control group was 53% and 50% respectively.

Conclusion: PL had a significant effect on meiosis resumption and maturation of oocyte at germinal vesicle stage. Based on these results, PL could be used as a maturation promoting factor.

Keywords: Cumulus Oocyte Complex (COC), Denuded Oocyte (DO), Fetal Bovine Serum (FBS), Germinal Vesicle (GV), In Vitro Maturation (IVM), Platelet Layset (PL)

*Corresponding Author:
Address: Department of Embryology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
Email: hasan_fsh33@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:36 +0330 on Monday September 25th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۷، شماره۱۲ (شماره پیاپی۹۳)،اسفند ۱۳۹۳، ۸-۱

بررسی میزان اثر عصاره پلاکت های خون در شروع مجدد میوز و بلوغ در تخمک موش سوری در حالت ژرمینال ویزیکول

حسن پازکی[1*]، حسین ایمانی[2]، عبدالحسین شاهوردی[4]، فرح فرخی[3]، لیلا سادات طاهایی[1]

۱- کارشناس ارشد جنین شناسی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین شناسی، تهران، ایران

۲- استاد، گروه جنین شناسی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین شناسی، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴- دانشیار پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین شناسی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: بلوغ تخمک و لقاح در شرایط آزمایشگاهی از مهم‌ترین قدم‌ها در درمان ناباروری می‌باشد. در این مطالعه محیط‌های بلوغ با عصاره پلاکت خون که دارای غلظت بالایی از فاکتورهای رشد می‌باشد غنی گردید و میزان از سرگیری میوز و بلوغ تخمک‌ها بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی تخمک‌ها در حالت ژرمینال ویزیکول از موش سوری ماده بالغ نژاد NMRI جمع‌آوری گردیدند. محیط بلوغ αMEM بوده و محیط‌های کنترلی دارای ۵ و۱۰ درصد سرم گاوی بودند و محیط مورد آزمایش با ۵ و ۱۰ درصد عصاره پلاکت خون و ترکیب ۵ درصد عصاره پلاکت خون به همراه ۵ درصد سرم گاوی غنی گردیدند. میزان از سرگیری میوز و بلوغ بعد از ۱۸ ساعت در محیط‌های متفاوت بررسی گردید.

یافته‌ها: میزان تخمک‌های بالغ شده در محیط آزمایشی حاوی ۵ درصد عصاره پلاکت خون هم با سلول گرانولوزا و هم بدون سلول گرانولوزا نسبت به محیط‌های کنترل به شکل معنی‌دار بالاتر بودند($p<۰/۰۵$). میزان بلوغ تخمک‌ها در محیط حاوی ۵ درصد عصاره پلاکت خون برای گروه حاوی سلول گرانولوزا، ۶۱ درصد و ۷۲ درصد برای گروه بدون سلول گرانولوزا بوده است در حالی که این میزان برای گروه کنترلی ۵ درصد سرم گاوی به ترتیب ۵۳ و ۵۰ درصد بود.

نتیجه‌گیری: عصاره پلاکت خون تاثیر معنی‌داری بر از سرگیری میوز و بلوغ تخمک در حالت ژرمینال ویزیکول داشته است. بر اساس این نتایج، عصاره پلاکت خون می‌تواند به عنوان یک محرک بلوغ استفاده گردد.

واژگان کلیدی: تخمک با سلول‌های گرانولوزا، تخمک‌های دنود شده، سرم گاوی، ژرمینال ویزیکول، بلوغ آزمایشگاهی تخمک، عصاره پلاکت خون

* **نویسنده مسئول:** پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین شناسی

Email:hasan_fsh33@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:36 +0330 on Monday September 25th 2017

مقدمه

بلوغ آزمایشگاهی تخمک یکی از مهم‌ترین قدم‌ها در انجام لقاح و تکوین جنینی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. این تکنیک علاوه بر کمک به کسب تخمک‌های بالغ مورد استفاده در روش‌های کمک ناباروری مانند لقاح آزمایشگاهی و میکرو اینجکشن می‌تواند در بررسی‌های بیوتکنولوژیکی جنین مانند کلون کردن هم استفاده شود(۱، ۲). در بلوغ آزمایشگاهی تخمک، محیط کشت نه تنها تاثیر به سزایی در افزایش نرخ بلوغ دارد بلکه در افزایش موفقیت در لقاح و کسب جنین هم دارد(۳،۴).

در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی جهت بررسی جنبه‌های مختلف بلوغ آزمایشگاهی طراحی گردیده است و بیشتر تلاش‌ها بر بهبود محیط کشت با افزودن مواد مختلف استوار بوده است(۸-۵). مهم‌ترین مواد که در محیط بلوغ تخمک وجود دارد شامل؛ گنادوتروپین‌ها، سرم و فاکتورهای رشد می‌باشد(۹-۱۱). سرم‌ها به دلیل داشتن پروتئین، ویتامین، فاکتورهای رشد، هورمون و مواد غذایی مورد نیاز بلوغ تخمک از اهمیت خاصی در بلوغ آزمایشگاهی برخوردار هستند(۱۲ ،۱۳). امروزه تلاش‌های زیادی در جهت ارتقاء و بهبود محیط کشت انجام گردیده است. یکی از موادی که به تازگی مورد استفاده قرار گرفته عصاره پلاکت خون (Platelet Layset-PL) بوده است.

پلاکت‌ها در خون وجود دارند و در زمان جراحت در محل آسیب دیدگی جمع شده و مسئول ایجاد لخته و جلوگیری از خون‌ریزی می‌باشند. هم‌چنین بعد از ایجاد لخته با آزاد کردن فاکتورهای رشد باعث تسریع در بهبود زخم می‌شوند(۱۵ ،۱۶). عصاره پلاکت‌ها غنی از فاکتورهای رشد، پروتئین و ریزمولکول‌هایی هستند که در رشد و تکثیر سلولی نقش مهمی بازی می‌کنند(۱۶). در سال ۱۹۷۰ برای اولین بار ترکیب اولیه عصاره پلاکت خون شامل فیبرونکتین و فاکتورهای رشد مثل (Transforming growth factor beta)TGFβ، (Platelet- PDGF Derived Growth Factor) مشخص گردید و در سال‌های بعد مشخص گردید که پلاکت‌ها حاوی گرانول‌هایی هستند که حاوی دسته وسیعی از فاکتورهای رشد دیگر و ریزمغذی‌های می‌باشد(۱۷-۱۹). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی جهت استفاده از عصاره پلاکت خون در محیط کشت به عنوان سرم یا محرک رشد و تکثیر سلولی طراحی گردیده است. در این تحقیقات غنی شدن محیط کشت سلولی توسط PL اثرات قابل توجهی روی رشد و بقاء سلولی از جمله، محیط کشت سلول‌های تخمدان همستر چینی و سلول‌های مزانشیمی(۲۰) و یا محیط کشت فولیکول پره آنترال موش سوری داشته است(۲۱).

در معالعه حاضر محیط بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها در حالت ژرمینال ویزیکول با غلظت‌های مختلف عصاره پلاکت خون و سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum-FBS) غنی گردیده و میزان از سرگیری میوز و بلوغ در محیط‌های مختلف بلوغ آزمایشگاهی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری تخمک: در این مطالعه تجربی تخمک‌ها در حالت ژرمینال ویزیکول از موش سوری ماده بالغ نژاد NMRI تهیه گردید. موش‌ها در شرایط استاندارد از نظر غذا و نور نگهداری شده بودند. موش‌ها به روش قطع نخاع کشته شده و بعد از باز کردن حفره شکمی تخمدان‌ها جدا گردیده و به محیط جداسازی منتقل شدند. محیط جداسازی شامل αMEM (سیگما- آمریکا) بوده که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (گیبکو- آلمان) به همراه ۱۰۰ میلی واحد بر میلی‌لیتر پنی سیلین (سیگما- آمریکا) و ۱۰۰ میلی واحد بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (سیگما-آمریکا) بوده است. تخمک‌ها به روش مکانیکی و با کمک سر سرنگ (p-med, china) به دو شکل، با سلول‌های گرانولوزا (Cumulus-Oocyte Complex-COC) و بدون سلول‌های گرانولوزا (Denuded Oocytes-DO) جدا گردیدند.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها: محیط بلوغ αMEM حاوی ۱۰۰ میلی واحد بر میلی لیتر FSH (گیبکو-آلمان)،

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:36 +0330 on Monday September 25th 2017

۱/۵ واحد بر میلی‌لیتر LH، ۵ نانوگرم بر میلی لیتر فاکتور رشد اپیدرمال (Epidermal Growth Factor-EGF) (سیگما- آمریکا) بوده است. محیط‌های مورد آزمایش با ۵ و ۱۰ درصد عصاره پلاکت خون و ترکیب ۵ درصد PL بعلاوه ۵ درصد FBS غنی گردیدند و محیط‌های کنترلی دارای ۵ و ۱۰ درصد FBS بودند. تخمک‌های جمع‌آوری شده در محیط‌های جداگانه در قطرات ۲۵ میکرولیتر محیط بلوغ در زیر روغن (سیگما-آمریکا) قرار داده شدند و در انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 برای ۱۸ ساعت قرار داده شدند. در مجموع ۳۰۰ تخمک از ۱۶ موش مورد آزمایش قرار گرفت.

این مطالعه با شماره (۹۱/۱۹/۶۹۰۳۹/ص) در بخش جنین شناسی پژوهشکده رویان تهران انجام گردیده است. در پایان نتایج حاصل با استفاره از نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس یکرفه(ANOVA) با آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعداد تخمک‌های بالغ شده در محیط آزمایشی ۵ درصد PL هم با سلول‌های گرانولوزا و هم بدون سلول‌های گرانولوزا به شکل معنی‌دار بیشتر از تخمک‌های بالغ در محیط‌های کنترلی بودند($p<۰/۰۵$). با توجه به جدول ۱ میزان بلوغ در گروه DO و در گروه آزمایشی ۵ درصد PL ۷۲ درصد بوده است و این میزان برای گروه کنترلی ۵ درصدFBS ، ۵۳ درصد بوده که نشان از معنی‌دار بودن بلوغ در محیط حاوی ۵ درصد PL دارد. هم‌چنین با توجه به جدول ۲ میزان بلوغ در گروه COC، ۶۱ درصد در محیط ۵ درصد PL دیده شدند در حالی که این مقدار در گروه کنترل ۵ درصد FBS ، ۵۰ درصد می‌باشد. البته میزان بلوغ در محیط‌های حاوی ۱۰ درصد PL و ۱۰ درصد FBS هم در گروه DO (جدول ۱) وهم در COC (جدول ۲) کاهش معنی‌داری با گروه کنترل نشان دادند($p<۰/۰۵$).

جدول ۱. اطلاعات آماری مربوط به میزان بلوغ و میزان شروع میوز در تخمک‌ها در حالت ژرمینال ویزیکول بدون سلول‌های گرانولوزا (DO)

گرو ها	۱۸ ساعت بعد از قرار دادن تخمک ها در محیط بلوغ				
	تخمک باقی مانده در حالت ژرمینال ویزیکول (GV) (درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)	تخمک با ژرمینال ویزیکول در هم شکسته (GVBD) (درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)	تخمک بالغ (MII) (درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)	تخمک های از بین رفته (Degenerated oocyte) (درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)	تخمک باقی مانده در حالت ژرمینال ویزیکول (GV) (درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)
FBS ۵ درصد	۴۴	۶	۵۰	۰	۴۴
FBS ۱۰ درصد	۶۱ □	۸	۲۸	۳	۶۱ □
PL ۵ درصد	۱۴ □	۱۱	۷۲ □	۳ □	۱۴ □
PL ۱۰ درصد	۵۵	۱۴	۲۸ □	۳ □	۵۵
FBS ۵ درصد+ PL ۵ درصد	۴۴	۱۱ □	۴۲ □	۳ □	۴۴

FBS سرم گاوی ; PL ,عصاره پلاکت خون; GV , تخمک در حالت ژرمینال ویزیکول; GVBD, تخمک که ژمینال ویزیکول آن شکسته و میوز را آغاز کرده است; MII, تخمک بالغ با اولین جسم قطبی ; Degenerated Oocyte, تخمک هایی که از بین رفته اند.

□ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل ۵% FBS در حد ($p<۰/۰۵$)

□ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل ۵% FBS در حد ($p<۰/۰۱$)

میزان از سرگیری میوز (تخمک بالغ MII + تخمک‌هایی با ژرمینال وزیکول در هم شکسته GVBD) هم در محیط ۵ درصد PL نسبت به گروه کنترل در هر دو گروه به شکل معنی‌دار بالاتر بوده است. با توجه به جدول ۱ این میزان برای محیط حاوی ۵ درصد PL برای گروه DO ، ۸۳ درصد در مقایسه با گروه کنترل ۵ درصد FBS که میزان

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:36 +0330 on Monday September 25th 2017

از سرگیری میوز ۵۶ درصد بوده است که اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد(p<۰/۰۱). نتایج در جدول ۲ نشان می‌دهد که میزان از سرگیری میوز برای گروه COC در محیط ۵ درصد PL کمی کمتر از گروه DO در همین محیط بوده و ۶۶ درصد از تخمک‌ها میوز را از سرگرفته‌اند ولی باز هم در مقایسه با گروه کنترل ۵ درصد FBS با ۵۶ درصد از سرگیری میوز اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید(p<۰/۰۵). البته اختلاف معنی‌داری بین میزان بلوغ و از سر گیری میوز بین ۵ درصد PL بعلاوه ۵ درصد FBS و گروه کنترل ۵ درصد FBS مشاهده نگردید. در محیط‌های حاوی ۱۰ درصد PL و ۱۰ درصد FBS کاهش معنی‌داری در از سرگیری میوز و شکسته شدن ژرمینال ویزیکول نسبت به گروه کنترل ۵ درصد FBS مشاهده گردید(p<۰/۰۵).

نتایج آماری مربوط به از سر گیری میوز و بلوغ را در جدول یک برای گروه DO و جدول دو برای گروه COC می‌توان مشاهده نمود.

جدول ۲. اطلاعات آماری مربوط به میزان بلوغ و میزان شروع میوز در تخمک‌ها در حالت ژرمینال ویزیکول به همراه سلول‌های گرانولوزا (COC)

گروه ها	۱۸ ساعت بعد از قرار دادن تخمک ها در محیط بلوغ				
	تعداد تخمک	تخمک باقی مانده در حالت ژرمینال ویزیکول (GV) (درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)	تخمک با ژرمینال ویزیکول در هم شکسته (GVBD) (درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)	تخمک بالغ (MII) (درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)	تخمک های از بین رفته (Degenerated oocyte) (درصد از تخمک های در شروع آزمایش)
FBS ۵درصد	۳۶	۳۳	۳	۵۳	۱۱
FBS ۱۰درصد	۳۶	۵۲ □	۳	۴۲ □	۳ □
PL ۵درصد	۳۶	۲۵ □	۶ □	۶۱ □	۸ □
PL ۱۰درصد	۳۶	۴۵ □	۸ □	۳۳ □	۱۴ □
FBS ۵ درصد +PL ۵درصد	۳۶	۴۴ □	۶ □	۵۰	۰ □

سرم گاوی ; PL ,عصاره پلاکت خون; GV , تخمک در حالت ژرمینال ویزیکول; GVBD, تخمک که ژمینال ویزیکول آن شکسته و میوز را آغاز کرده است; MII,تخمک بالغ با اولین جسم قطبی ; Degenerated Oocyte, تخمک هایی که از بین رفته اند.

□ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل ۵٪ FBS در حد (p< ۰/۰۵)

□ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل ۵٪ FBS در حد (p< ۰/۰۱)

بحث

عصاره پلاکت خون با داشتن درصد بالایی از فاکتورهای رشد و ریزمغذی‌های لازم برای بلوغ تخمک تاثیر معنی‌داری در از سرگیری میوز و افزایش بلوغ تخمک نسبت به محیط‌های کنترلی نشان داده است(p<۰/۰۵). تحریک بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاهی از روش‌های متداول جهت انجام لقاح آزمایشگاهی در کلینیک‌های ناباروری می‌باشد(۱). بلوغ تخمک شامل بلوغ هسته و سیتوپلاسم می‌باشد. فرایند بلوغ هسته شامل از سرگیری مجدد تقسیم میوز و در هم شکستن ژرمینال ویزیکول و آزاد شدن اولین گویچه قطبی می‌باشد(۲۲ ،۲۳). تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که محیط کشت و ترکیبات آن نقش عمده‌ای در بلوغ و تکوین‌های بعدی دارند(۲۴). در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی شده تا با غنی کردن محیط‌های بلوغ، میزان بلوغ و در نتیجه میزان موفقیت در درمان ناباروری را افزایش دهند. عصاره پلاکت خون با داشتن میزان بالایی فاکتور رشد، پروتئین و عناصر مورد نیاز جهت بلوغ و تکوین تخمک می‌تواند تاثیر ویژه‌ای در افزایش درصد موفقیت درکسب تخمک بالغ داشته باشد(۲۵). در مطالعه حاظر تلاش بر این بوده است تا محیط بلوغ تخمک را با افزودن عصاره پلاکت خون غنی کرده و میزان از سرگیری میوز و بلوغ بررسی گردد.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:36 +0330 on Monday September 25th 2017

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که ترکیبات موجود در محیط کشت به ویژه پروتئین و فاکتورهای رشد روی بلوغ و تکوین جنینی موثر هستند(۲۴). سرم در محیط کشت و بلوغ مسئول تامین انرژی و دیگر عناصر مورد نیاز جهت بلوغ از جمله فاکتورهای رشد مانند EGF وIGF می‌باشد. در شرایط مناسب تخمک میوز خود را از سر گرفته و بالغ می‌شود(۲۵-۲۷). در سال‌های اخیر تحقیقات نشان داده‌اند که PL به دلیل غنی بودن از پروتئین و فاکتورهای رشد(۲۸) می‌تواند به عنوان جایگذین مناسبی برای سرم‌های معمول باشد. آلدن و همکاران عصاره پلاکت خون را به محیط کشت سلول‌های تخمدان همستر چینی اضافه نمودند که میزان رشد و بقاء سلولی قابل توجه بودند. لومن و همکاران نیز تاثیر عصاره پلاکت خون را روی سلول‌های مزانشیمی بررسی نمود که میزان رشد و تکثیر معنی‌دار بوده است(۲۰). تحقیقات پازکی و همکاران روی فولیکول‌های پره آنترال موش نابالغ علاوه بر تایید نتایج تحقیقات گذشته نشان داد که عصاره پلاکت خون روی رشد تخمک‌ها هم تاثیر قابل تاملی دارد(۲۱). در مطالعه حاضر با توجه به اثر PL روی رشد و بقاء تخمک در تحقیقات گذشته(۲۱) تلاش گردید تا میزان تاثیر این ماده در بلوغ تخمک نیز بررسی گردد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که PL که غنی از پروتئین و فاکتورهای رشد می‌باشد تاثیر معنی‌داری در از سر گیری میوز داشته است($p<۰/۰۵$). بر اساس نتایج جدول ۱ و ۲ میزان از سر گیری میوز (تخمک بالغ MII + تخمک‌هایی با ژرمینال وزیکول در هم شکسته GVBD) در گروه آزمایشی ۵ درصد PL حدود۸۳ درصد برای گروه DO و برای گروه COC این میزان ۶۶ درصد بوده است در حالی که میزان از سر گیری میوز برای گروه کنترلی ۵۶ درصد برای هر دو گروه DO و COC بوده است که نشان از تاثیر معنی‌دار عصاره پلاکت خون در از سر گیری میوز دارد.

هم‌چنین میزان تخمک بالغ شده در گروه آزمایشی ۵ درصد PL درمقایسه با گروه کنترلی هم بسیار معنی‌دار بوده است که ۷۲ درصد از تخمک‌های گروه DO و ۶۱ درصد از تخمک‌های گروه COC میوز یک را کامل کرده و اولین گویچه قطبی آزاد شده‌اند($p<۰/۰۵$). البته فقدان سلول‌های گرانولوزا در گروه DO و نبودن فاکتورهای متوقف کننده میوز که از سلول گرانولوزا ترشح می‌شود(۲۹، ۳۰) می‌تواند در بالاتر بودن میزان بلوغ در گروه DO موثر باشد ولی با توجه به بالاتر بودن بلوغ در هر دو گروه مورد آزمایش تاثیر مثبت عصاره پلاکت خون کاملا قابل مشاهده است. البته میزان بلوغ در دیگر گروه ها مثل ۱۰ درصد PL و ۱۰ درصد FBS نسبت به گروه کنترل کمتر بوده است که نشان از اهمیت غلظت سرم در محیط بلوغ دارد زیرا این کاهش هم در محیط دارای عصاره پلاکت خون و هم در محیط حاوی سرم گاوی دیده شده است.

نتیجه گیری

در پایان، مطالعه حاضر نشان داد که PL می‌تواند اثر قابل توجهی رو بلوغ تخمک‌ها داشته باشد و با توجه به نتایج این مطالعه و تحقیقات گذشته به نظر می‌رسد می‌توان از عصاره پلاکت خون به عنوان جایگذین سرم‌های معمول استفاده نمود و حتی می‌توان به عنوان محرک بلوغ در محیط‌های بلوغ استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از مسئولان و کارکنان بخش جنین‌شناسی و بخش حیوان خانه پژوهشگاه رویان تهران

منابع

1. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Lin Tan S. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. Fertility and sterility. 2001;76(5):936-42.
2. Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q, et al. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. Developmental biology. 2006;293(2):439-48.
3. Madan M, Chauhan M, Singla S, Manik R. Pregnancies established from water buffalo (Bubalus bubalis) blastocysts derived from in

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:36 +0330 on Monday September 25th 2017

vitro matured, in vitro fertilized oocytes and co-cultured with cumulus and oviductal cells. Theriogenology. 1994;42(4):591-600.
4. Tajik P, Esfandabadi NS. In vitro maturation of caprine oocytes in different culture media. Small Ruminant Research. 2003;47(2):155-8.
5. Rao B, Naidu K, Amarnath D, Vagdevi R, Rao A, Brahmaiah K, et al. In vitro maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. Small Ruminant Research. 2002;43(1):31-6.
6. Kharche S, Taru Sharma G, Majumdar A. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. Small Ruminant Research. 2005;57(1):81-4.
7. Leibfried-Rutledge M, Dominko T, Critser E, Critser J. Tissue maturation in vivo and in vitro: gamete and early embryo ontogeny. Karow, AK, Critser, JK, Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles Academic Press, San Diego. 1997:23-138.
8. Gardner DK. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. Theriogenology. 1998; 49(1):83-102.
9. Fukushima M, Fukui Y. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in vitro. Animal reproduction science. 1985;9(4):323-32.
10. Brackett B, Younis A, Fayrer-Hosken R. Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentrations of luteinizing hormone. Fertility and sterility. 1989;52(2):319-24.
11. Choi Y, Carnevale E, Seidel Jr G, Squires E. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. Theriogenology. 2001; 56(4): 661-70.
12. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. CAB International Wallingford. 1994.p.30-142.
13. Holm P, Booth P, Schmidt M, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology. 1999; 52(4):683-700.
14. Chanson A, Nocera D, Senn A, De Grandi P, Germond M. Animal Experience: Development of a Well-Defined Medium for the In Vitro Maturation of Immature Bovine Cumulus–Oocyte Complexes. Journal of assisted reproduction and genetics. 2001; 18(2): 97-105.
15. Ross R, Raines EW. Platelet-derived growth factor and cell proliferation. In: Growth Factors: From Genes to Applications, Raven Press, New York. 1998.p.193-200.
16. Sporn MB, Roberts AB. Transforming Growth Factor-β: Multiple actions and potential clinical applications. Jama. 1989; 262(7):938-41.
17. Mirabet V, Solves P, Miñana MD, Encabo A, Carbonell-Uberos F, Blanquer A, et al. Human platelet lysate enhances the proliferative activity of cultured human fibroblast-like cells from different tissues. Cell and tissue banking. 2008;9(1):1-10.
18. Balk SD. Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1971;68(2):271-5.
19. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1974;71(4):1207-10.
20. Lohmann M, Walenda G, Hemeda H, Joussen S, Drescher W, Jockenhoevel S, et al. Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. PloS one. 2012; 7(5): e37839-40.
21. Pazoki H, Imani H, Farokhi F, Shahverdi A, Ebrahimi B, Tahaei L. XML Considering the effective of Blood Platelet Extraction (Platelet layset) on growth and survival of oocytes from prepubertal NMRI mouse pre-antral follicles. JSSU. 2014;22(3):1265-73.
22. Motlik J. Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. Journal of reproduction and fertility Supplement. 1988; 38:17-25.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:36 +0330 on Monday September 25th 2017

23. Combelles C, Cekleniak N, Racowsky C, Albertini D. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. Human Reproduction. 2002; 17(4): 1006-16.
24. Rose TA, Bavister BD. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. Molecular reproduction and development. 1992;31(1):72-7.
25. Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. Cytotherapy. 2012;14(5):540-54.
26. Ben-Yosef D, Yovel I, Schwartz T, Azem F, Lessing JB, Amit A. Increasing synthetic serum substitute (SSS) concentrations in P1 glucose/phosphate-free medium improves implantation rate: a comparative study. Journal of assisted reproduction and genetics. 2001; 18(11):588-92.
27. Singh B, Rutledge JM, Armstrong DT. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. Molecular reproduction and development. 1995;40(4):391-9.
28. Spicer L, Stewart R. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. Biology of reproduction. 1996; 54(1):255-63.
29. Müller AM, Davenport M, Verrier S, Droeser R, Alini M, Bocelli-Tyndall C, et al. Platelet lysate as a serum substitute for 2D static and 3D perfusion culture of stromal vascular fraction cells from human adipose tissue. Tissue Engineering Part A. 2009; 15(4):869-75.
30. Zhang M, Su Y-Q, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. Science. 2010; 330(6002):366-9.
31. Tsafriri A, Pomerantz S, editors. Regulation of the development of meiotic competence and of the resumption of oocyte maturation in the rat. Symposia of the Society for Experimental Biology.1984; 38:25-43.