

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

Pazoki H^{1*}, Iimani H¹, Farokhi F², Shahverdi A H¹, Tahaei LS¹

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 α MEM 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

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

حسن پازکی^{۱*}، حسین ایمانی^۲، عبدالحسین شاهوردی^۳، فرح فرخی^۴، لیلا سادات طاهایی^۱

- 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 مهم ترین قدم ها در درمان ناباروری می باشد. در این مطالعه محیط های بلوغ با عصاره پلاکت خون که دارای غلظت بالایی از فاکتورهای رشد می باشد غنی گردید و میزان از سرگیری میوز و بلوغ تخمک ها بررسی گردید.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی تخمک ها در حالت ژرمینال ویزیکول از موش سوری ماده بالغ نژاد NMRI جمع آوری گردیدند. محیط بلوغ α MEM بوده و محیط های کنترل دارای ۵ و ۱۰ 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 محیط های متفاوت بررسی گردید.

یافته ها: میزان تخمک های بالغ شده در محیط آزمایشی حاوی ۵ درصد عصاره پلاکت خون هم با سلول گرانولوزا و هم بدون سلول گرانولوزا نسبت به محیط های کنترل به شکل معنی دار بالاتر بودند ($p < 0.05$). میزان بلوغ تخمک ها 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.

نتیجه گیری: عصاره پلاکت خون تاثیر معنی داری بر از سرگیری میوز و بلوغ تخمک در حالت ژرمینال ویزیکول داشته است. بر اساس این نتایج، عصاره پلاکت خون می تواند به عنوان یک محرک بلوغ استفاده گردد.

واژگان کلیدی: تخمک با سلول های گرانولوزا، تخمک های 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

مقدمه

بلوغ آزمایشگاهی تخمک یکی از مهم ترین قدم ها در انجام لقاح و تکوین جنینی در شرایط آزمایشگاهی می باشد. این تکنیک علاوه بر کمک به کسب تخمک های بالغ مورد استفاده در روش های کمک ناباروری مانند لقاح آزمایشگاهی و میکرو اینجکشن می تواند در بررسی های بیوتکنولوژیکی جنین مانند کلون کردن هم استفاده شود (۱). 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 سال های اخیر تحقیقات زیادی جهت بررسی جنبه های مختلف بلوغ آزمایشگاهی طراحی گردیده است و بیشتر تلاش ها بر بهبود محیط کشت با افزودن مواد مختلف استوار بوده است (۸-۵). مهم ترین مواد که در محیط بلوغ تخمک وجود دارد شامل؛ گنادوتروپین ها، سرم و فاکتورهای رشد می باشد (۹-۱۱). سرم ها 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 تلاش های 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 Lysate-PL) بوده است.

پلاکت ها در خون وجود دارند و در زمان جراحی در محل آسیب دیدگی جمع شده و مسئول ایجاد لخته و جلوگیری از خون ریزی می باشند. هم چنین بعد از ایجاد لخته با آزاد کردن فاکتورهای رشد باعث تسریع در بهبود زخم می شوند (۱۵، ۱۶). عصاره پلاکت ها غنی از فاکتورهای رشد، پروتئین و ریزمولکول هایی هستند که در رشد و تکثیر سلولی نقش مهمی بازی می کنند (۱۶). در سال ۱۹۷۰ برای اولین بار ترکیب اولیه عصاره پلاکت خون شامل فیبرونکتین و فاکتورهای رشد مثل (Transforming Growth Factor- β) (TGF β) (Platelet-Derived Growth Factor) (PDGF, growth factor beta) (Platelet-Derived Growth Factor) مشخص گردید و در سال های بعد مشخص گردید که پلاکت ها حاوی

گرانول هایی هستند که حاوی دسته وسیعی از فاکتورهای رشد دیگر و ریزمغذی های می باشد (۱۷-۱۹). در سال های 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 بقا سلولی از جمله، محیط کشت سلول های تخمدان همستر چینی و سلول های مزانشیمی (۲۰) و یا محیط کشت فولیکول پره آنترال موش سوری داشته است (۲۱).

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

مواد و روش ها

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

بلوغ آزمایشگاهی تخمک ها: محیط بلوغ α MEM حاوی ۱۰۰ میلی واحد بر میلی لیتر FSH (گیبو-آلمان)،

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 ($p < 0/05$). 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 درصد FBS، 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) و هم در COC (جدول ۲) کاهش معنی‌داری با گروه کنترل نشان دادند ($p < 0/05$).

۱/۵ واحد بر میلی‌لیتر LH، ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر 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 سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ 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 جنین‌شناسی پژوهشکده رویان تهران انجام گردیده است. در پایان نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

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

۱۸ ساعت بعد از قرار دادن تخمک‌ها در محیط بلوغ					گروه‌ها
تخمک باقی مانده در حالت ژرمینال و بیژیکول (GV)	تخمک باقی مانده در حالت ژرمینال و بیژیکول (GVBD)	تخمک بالغ (MII)	تخمک‌های از بین رفته (Degenerated oocyte)	تخمک باقی مانده در حالت ژرمینال و بیژیکول (GV)	
(درصد از تخمک‌ها در شروع آزمایش)	(درصد از تخمک‌ها در شروع آزمایش)	(درصد از تخمک‌ها در شروع آزمایش)	(درصد از تخمک‌ها در شروع آزمایش)	(درصد از تخمک‌ها در شروع آزمایش)	
۴۴	۶	۵۰	۰	۴۴	FBS ۵ درصد
۶۱ □	۸	۲۸	۳	۶۱ □	FBS ۱۰ درصد
۱۴ □	۱۱	۷۲ □	۳ □	۱۴ □	PL ۵ درصد
۵۵	۱۴	۲۸ □	۳ □	۵۵	PL ۱۰ درصد
۴۴	۱۱ □	۴۲ □	۳ □	۴۴	۵ درصد FBS + PL

FBS سرم گاوی؛ PL؛ عصاره پلاکت خون؛ GV، تخمک در حالت ژرمینال و بیژیکول؛ GVBD، تخمک که ژرمینال و بیژیکول آن شکسته و میوز را آغاز کرده است؛ MII، تخمک بالغ یا اولین جسم قطبی؛ Degenerated Oocyte، تخمک‌هایی که از بین رفته‌اند.

□ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ۵٪ FBS در حد ($p < 0/05$)
 □ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ۵٪ FBS در حد ($p < 0/01$)

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

میزان از سرگیری میوز (تخمک بالغ MII + تخمک‌هایی با ژرمینال و بیژیکول در هم شکسته GVBD) هم در محیط ۵ درصد PL نسبت به گروه کنترل در هر دو

از سرگیری میوز بین ۵ درصد PL بعلاوه ۵ درصد FBS و گروه کنترل ۵ درصد FBS مشاهده نگردید. در محیط های حاوی ۱۰ درصد PL و ۱۰ درصد FBS کاهش معنی داری در از سرگیری میوز و شکسته شدن ژرمینال ویزیکول نسبت به گروه کنترل ۵ درصد FBS مشاهده گردید ($p < 0.05$). نتایج آماری مربوط به از سرگیری میوز و بلوغ را در جدول یک برای گروه DO و جدول دو برای گروه COC می توان مشاهده نمود.

از سرگیری میوز ۵۶ درصد بوده است که اختلاف معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.01$). نتایج در جدول ۲ نشان می دهد 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 تخمک ها میوز را از سر گرفته اند ولی باز هم در مقایسه با گروه کنترل ۵ درصد FBS با ۵۶ درصد از سرگیری میوز اختلاف معنی دار مشاهده گردید ($p < 0.05$). البته اختلاف معنی داری بین میزان بلوغ و

جدول ۲. اطلاعات آماری مربوط به میزان بلوغ و میزان شروع میوز در تخمک ها در حالت ژرمینال ویزیکول به همراه سلول های گرانولوزا (COC)

گروه ها	تعداد تخمک	تخمک باقی مانده در حالت ژرمینال ویزیکول (GV)	تخمک با ژرمینال ویزیکول در هم شکسته (GVBD)	تخمک بالغ (MII)	تخمک های از بین رفته (Degenerated oocyte)
	(درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)	(درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)	(درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)	(درصد از تخمک ها در شروع آزمایش)	(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 ۵درصد	۳۶	۴۴	۶	۵۰	۰
PL+ ۵درصد					

سرم گاوی ؛ PL ، عصاره پلاکت خون ؛ GV ، تخمک در حالت ژرمینال ویزیکول ؛ GVBD ، تخمک که ژرمینال 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 ($p < 0.05$)
- اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل ۵٪ FBS در حد ($p < 0.01$)

بحث

نشان داده اند که محیط کشت و ترکیبات آن نقش عمده ای در بلوغ و تکوین های بعدی دارند (۲۴). در سال های اخیر تلاش های زیادی شده تا با غنی کردن محیط های بلوغ، میزان بلوغ و در نتیجه میزان موفقیت در درمان ناباروری را افزایش دهند. عصاره پلاکت خون با داشتن میزان بالای فاکتور رشد، پروتئین و عناصر مورد نیاز جهت بلوغ و تکوین تخمک می تواند تاثیر ویژه ای در افزایش درصد موفقیت در کسب تخمک بالغ داشته باشد (۲۵). در مطالعه حاضر 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.

عصاره پلاکت خون با داشتن درصد بالایی از فاکتورهای رشد و ریزمغذی های لازم برای بلوغ تخمک تاثیر معنی داری در از سرگیری میوز و افزایش بلوغ تخمک نسبت به محیط های کنترلی نشان داده است ($p < 0.05$). تحریک بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاهی از روش های متداول جهت انجام لقاح آزمایشگاهی در کلینیک های ناباروری می باشد (۱). بلوغ تخمک شامل بلوغ هسته و سیتوپلاسم می باشد. فرایند بلوغ هسته شامل از سرگیری مجدد تقسیم میوز و در هم شکستن ژرمینال ویزیکول و آزاد شدن اولین گویچه قطبی می باشد (۲۲، ۲۳). تحقیقات زیادی

کرده و اولین گویچه قطبی آزاد شده اند ($p < 0.05$). البته فقدان سلول های گرانولوزا در گروه DO و نبودن فاکتورهای متوقف کننده میوز که از سلول گرانولوزا ترشح می شود (۲۹، ۳۰) می تواند 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 می تواند اثر قابل توجهی رو بلوغ تخمک ها داشته باشد و با توجه به نتایج این مطالعه و تحقیقات گذشته به نظر می رسد می توان از عصاره پلاکت خون به عنوان جایگزین سرم های معمول استفاده نمود و حتی می توان به عنوان محرک بلوغ در محیط های بلوغ استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

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

منابع

- 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.
- 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.
- Madan M, Chauhan M, Singla S, Manik R. Pregnancies established from water buffalo (*Bubalus bubalis*) blastocysts derived from in

مطالعات بسیاری نشان داده اند 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 و IGF می باشد. در شرایط مناسب تخمک میوز خود را از سر گرفته و بالغ می شود (۲۵-۲۷). در سال های اخیر تحقیقات نشان داده اند که PL به دلیل غنی بودن از پروتئین و فاکتورهای رشد (۲۸) می تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای سرم های معمول باشد. آلدن و همکاران عصاره پلاکت خون را به محیط کشت سلول های تخمدان همستر چینی اضافه نمودند که میزان رشد و بقاء سلولی قابل توجه بودند. لومن و همکاران نیز تاثیر عصاره پلاکت خون را روی سلول های مزانشیمی بررسی نمود که میزان رشد و تکثیر معنی دار بوده است (۲۰). تحقیقات پازکی و همکاران روی فولیکول های پره آنترال موش نابالغ علاوه بر تایید نتایج تحقیقات گذشته نشان داد که عصاره پلاکت خون روی رشد تخمک ها 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 می باشد تاثیر معنی داری در از سر گیری میوز داشته است ($p < 0.05$). بر اساس نتایج جدول ۱ و ۲ میزان از سر گیری میوز (تخمک بالغ + تخمک های با ژرمینال وزیکول در هم شکسته GVBD) در گروه آزمایشی ۵ درصد PL حدود ۸۳ 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 معنی دار عصاره پلاکت خون در از سر گیری میوز دارد. هم چنین میزان تخمک بالغ شده در گروه آزمایشی ۵ درصد PL در مقایسه با گروه کنترلی هم بسیار معنی دار بوده است که ۷۲ درصد از تخمک های گروه DO و ۶۱ درصد از تخمک های گروه COC میوز یک را کامل

- 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, Fayer-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, Jousen 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.

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, Drosier 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. Tsafiriri 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.