

تأثیر فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1) در حضور و عدم حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی مونولایر بر تکوین فولیکول‌های تخمدانی موش سوری

علی محمدعینی، Ph.D Student، احمدعلی محمدپور، *Ph.D، عباس پرهام، Ph.D.

- دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، مشهد، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mohammadpoor@um.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۲

چکیده

هدف: در این مطالعه تجربی تکوین فولیکول‌های تخمدانی با استفاده از فاکتور رشد شبه انسولینی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان ران ۲۰ سر موش سوری استخراج و تعداد ۱۰۰ جفت تخمدان موش سوری به مدت هفت روز با هم‌کشتی فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1) در غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم)، در حضور و عدم حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شدند سپس بررسی و شمارش انواع فولیکول‌های تخمدانی با رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین-ائوزین، ماسون‌تری کروم و پاس انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون T جفت شده با $p < 0.05$ صورت گرفت.

نتایج: در مقایسه فولیکول‌های تخمدانی گروه کنترل و گروه‌های مورد آزمایش در اغلب گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد به طوری که این تفاوت در تعداد فولیکول‌های پری‌آنترال گروه تیمار هم‌کشتی غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل مشهودتر بود و تعداد فولیکول‌ها در گروه کنترل از $1/25 \pm 1/03$ به ترتیب به $13/75 \pm 2/71$ و $10/75 \pm 1/28$ در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم رسیده بود. لایه‌های تکا و گرانولوزا در گروه کنترل و تحت تیمار تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند.

نتیجه‌گیری: این روش در رشد و تکوین فولیکول‌های بالغ موثر می‌باشد و هم‌چنین میزان آپوپتوزیس سلولی را به حداقل می‌رساند. بدیهی است استفاده از کشت بافت تخمدان و متعاقب آن به دست آوردن تخمک‌های با کیفیت، بسیاری از مشکلات نازایی و ژنتیکی را در آینده برطرف خواهد کرد.

واژگان کلیدی: تخمدان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کشت بافت، موش سوری، IGF-1

مقدمه

پس از کشف سلول‌های بنیادین رویانی و کشت اولیه آن‌ها در سال ۱۹۸۱، تلاش‌های متعددی جهت دستیابی و بهینه‌سازی روش‌های کشت سلول‌های بنیادین با هدف رسیدن به یک منبع مطمئن برای جایگزینی سلول‌ها و بافت‌های ازدست‌رفته در اثر کهولت سن و یا بیماری صورت گرفته است. دستیابی به این اهداف همواره با چند دغدغه خاص همراه بوده است. نخستین دغدغه، منبع جداسازی سلول‌های بنیادین است و پاسخ به این پرسش که آیا این استفاده از این منبع، صرف‌نظر از توانایی‌های فنی و آزمایشگاهی که رسیدن به سلول‌های بنیادین برای استفاده‌های درمانی را ممکن می‌کند، با الگوهای اخلاق پزشکی نیز سازگار هست یا خیر. دغدغه بعدی چگونگی استفاده درمانی از این سلول‌ها و یافتن بیماران هدف برای استفاده درمانی از آن‌ها می‌باشد. از طرف دیگر شناسایی و برطرف کردن عوارض ناشی از این فناوری نوین زیستی در درمان بیماری‌ها نیز بایستی مورد توجه قرار گیرد (۱). باروری و داشتن فرزند در جامعه بشری از اهمیت زیادی برخوردار است و در مقابل آن ناباروری یک مشکل بالینی جدی در زمینه تولیدمثل می‌باشد که شیوع بالای این بیماری در جامعه امروزی، اهمیت آن را دوچندان می‌نماید. این عارضه استرس زیادی را بر زوج‌های نابارور وارد می‌کند و سلامت روانی زوجین را تهدید می‌نماید (۲).

کشت اندام به معنی جداسازی و رشد دادن اندام در شرایط آزمایشگاهی است به طوری که ارتباط آناتومیکی و عمل کردی آن در محیط کشت نیز حفظ شد و اندام جدا شده دقیقاً شبیه اندامی است که در محیط طبیعی (*In vivo*) است (۳، ۴). در کشت اندام بافت‌های وابسته به هورمون، هم‌چنان حساس و پاسخ دهنده به هورمون باقی می‌مانند و ارگان‌های آندوکراین هم‌چنان به ترشح هورمون‌های خاص ادامه می‌دهند. اندام‌های آندوکراین مانند تخمدان در محیط آزمایشگاه (*In vitro*) هورمون‌های اختصاصی تولید می‌کنند. بنابراین در کشت اندام می‌توان اطلاعات پایه در مورد رشد و نمو و تاثیر عوامل مختلف بر بافت را به دست آورد. این نتایج در *In vitro* سریع‌تر از *In vivo* به دست می‌آیند و نیز از نظر کمی آسان‌تر مطالعه می‌شود. در داخل بدن تفسیر نتایج به دلیل وجود فاکتورهای شیمیایی مختلف پیچیده‌تر و مشکل‌تر است (۵).

تحقیقات مختلف نشان داده است که با استفاده از فاکتور و هورمون‌های رشد می‌توان بلوغ آزمایشگاهی و در ادامه باروری را در موجودات زنده بهبود بخشید. بررسی‌های زیادی در طی سال‌ها در این زمینه انجام شده که توانسته‌اند اثر مثبت این هورمون‌ها را نشان دهند. یکی از این فاکتورهای رشد که در روند بلوغ تخمک، رشد و لقاح آن در یک سیکل طبیعی نقش مهمی دارد، فاکتور رشد شبه انسولینی یک یا IGF-1 می‌باشد. در بررسی‌هایی که در زمینه بلوغ آزمایشگاهی (IVM) و لقاح آزمایشگاهی (IVF) صورت گرفته است به نقش فاکتور و هورمون‌های رشد در ارتباط با تخمک‌گذاری اشاره شده است (۶، ۷).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که اضافه کردن هورمون رشد (GH) و IGF-1 به محیط کشت باعث افزایش میزان تقسیم شدن تخمک‌های گاوی و همچنین پیشرفت بیش‌تر جنین‌ها به سمت مرحله بلاستوسیست‌ها می‌شود (۸).

تکنیک هم‌کشتی جز برنامه‌های بی‌شماری است که در زیست‌شناسی برای مطالعه تعاملات طبیعی یا سنتتیک جمعیت‌های سلولی به کار می‌رود. چنین تکنیکی دارای اهمیت بسیار زیادی بوده و به عنوان کنسرسیوم سلول‌های چندین گونه و دیگر سیستم‌های محیط زیست طبیعی و سنتتیک به طور گسترده‌ای مشاهده می‌شود و در طیف زیادی از تحقیقات بنیادی به کار می‌رود. سیستم‌های هم‌کشتی به مدت طولانی در مطالعه انفعالات بین سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند و علاقه‌مندی زیست‌شناسان برای مطالعه و مهندسی سیستم‌های سنتتیک چند سلولی رو به افزایش است. در سطح پایه، سیستم هم‌کشتی

به‌عنوان روش کشت سلولی محسوب می‌شود که در آن دو یا چند جمعیت مختلف سلولی دارای درجه‌ای از ارتباط در آن هستند (۹ و ۱۰).

بسیاری از محققان با استفاده از تکنیک‌های کشت اندام برای روشن کردن عوامل هورمونی لازم برای تمایز ساختاری و فعالیت‌های عمل‌کردی بافت تخمدان تلاش می‌کنند. امروزه ناباروری به‌علت بیماری‌های مختلف شایع شده و از طرف‌دیگر بایستی به‌دنبال راه‌کارهایی بود تا بتوان عوارض تکنولوژی کمک باروری (ART) را کاهش داد. یکی از فاکتورهای رشد که نقش مهمی در رشد و بلوغ تخمک دارد فاکتور رشد شبه انسولینی یک یا IGF-1 می‌باشد که سبب تنظیم نمودن موارد تمایز، تکثیر و مسیر مهاجرت سلول‌ها می‌شد (۱۱) لذا با توجه به نقش مهم این فاکتور، در این مطالعه در غلظت‌های مختلف تأثیر آن بر روند تکوین فولیکول‌های تخمدانی موش آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق می‌تواند به‌محققین در زمینه‌های مختلف از جمله تولیدمثل و باروری کمک موثری نماید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی، از ۱۲۰ سر موش نژاد NMRI با سن تقریبی ۴ تا ۶ هفته استفاده شد. تمام مراحل انجام این طرح طبق موازین اخلاقی کمیته حمایت از حیوانات دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت (کد کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیستی IR.UM.REC.1400.091).

استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان ران موش: جهت این کار از ۲۰ سر موش نژاد NMRI

با سن تقریبی ۴ تا ۶ هفته استفاده شد که با روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته و سپس با استفاده از الکل ۷۰

درجه ضدعفونی شدند. سپس استخوان ران جدا و در محلول استریل نمکی بافر فسفات Phosphate-buffered saline (PBS) تحت شست‌وشو قرار گرفت. سپس، تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار کلاس II مغز استخوان با استفاده از

نیدل و محیط کشت (DMEM) Dulbecco's Modified Eagle Medium به‌همراه Fetal bovine

serum (FBS) ۱۰ درصد تخلیه و در فلاسک‌های کشت انکوبه شد. در ادامه کار سوسپانسیون در لوله‌های فالکون ۱۵

میلی‌لیتری به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰ سانتریفوژ شده و مایع رویی تخلیه شد. به‌رسوب سلولی حاصله ۵ میلی‌لیتر

محیط کشت DMEM+10% FBS افزوده شد و جهت تجزیه گلبول‌های قرمز موجود در رسوب سلولی، محلول بافر لیز

کننده دارای کلرید آمونیم (Merck)، بی‌کربنات پتاسیم (Merck) و EDTA (Merck) استفاده شد. پس از ۱۰ دقیقه هم

حجم بافر لیزکننده، ۵ میلی‌لیتر DMEM + 10% FBS اضافه شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با دور rpm ۱۴۰۰

انجام شد و پس از فیلتر کردن با فیلتر دارای منافذ با قطر ۲۰۰ میکرومتر مجدداً با همان شرایط سلول‌ها سانتریفوژ شد.

در مرحله پایانی سلول‌ها در فلاسک ۲۵ سانتی‌مترمربع در محیط کشت 1penicillin/streptomycin % +

DMEM+10% FBS در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO₂ ۵ درصد و رطوبت نسبی کشت داده شد.

پس از گذشت چند ساعت سلول‌های تک هسته‌ای شروع به چسبیدن به کف فلاسک کردند. با تعویض محیط بعد از ۲۴

ساعت سلول‌های اضافی تخلیه شد. بدین ترتیب کشت اولیه سلول‌های جدا شده آغاز شد. پس از ۴ تا ۵ روز سلول‌ها تکثیر

یافته و سطح فلاسک را اشغال نمودند.

نمونه‌گیری و کشت تخمدان: تعداد ۱۰۰ جفت تخمدان از ۱۰۰ سر موش سوری جنس ماده ۵ هفته‌ای جدا و پس از جدا

کردن چربی از آن‌ها و ۲ بار شست‌وشو در محلول نمکی بالانس شده هنکس (HBSS) یکی از تخمدان‌ها به‌ظروف مخصوص

کشت اندام، منتقل و یکی دیگر جهت بررسی نمونه کنترل در محلول بوئن فیکس شد. در فاز بین محیط کشت مایع حاوی

(DMEM, FBS ۱۰ درصد، BSA ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین) و هوا، درون انکوباتور

CO₂ دار ۵ درصد و ۹۵ درصد هوا در دمای ۳۷±۰/۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز انکوبه شد. محیط کشت در هر روز یکبار تعویض شد.

گروه بندی حیوانات: پس از آماده‌سازی مقدمات طرح که شامل استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی و استحصال تخمدان بود. حیوانات جهت بررسی به ۱۴ گروه مورد مطالعه به شرح زیر تقسیم بندی شدند:

۴ گروه کنترل با حروف a,b,c,d که به ترتیب شامل ابتدای دوره، هم‌کشتی، بدون هم‌کشتی و انتهای دوره می‌باشند.
۵ گروه تیمار با حروف e,f,g,h,i که به ترتیب با غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۵ و ۱۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد شبه انسولین همراه می‌باشند.

۵ گروه تیمار هم‌کشتی با حروف j,k,l,m,n که به ترتیب با غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۵ و ۱۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد شبه انسولین به همراه هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت مونولایر می‌باشند.

مطالعات بافت شناسی: پس از پایان دوره (روز هفتم) تخمدان‌های هر گروه در محلول فیکساتیو بوئن قرار داده شدند و سپس با دستگاه آماده‌سازی بافت از محلول‌های مختلف عبور داده شدند و در نهایت از آن‌ها بلوک‌های پارافینه تهیه شد. سپس از هر تخمدان مقاطع بافتی پشت‌سرهم (Serial section) به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. ارزیابی میکروسکوپی سلول‌های تکا، گرانولوزا و شمارش فولیکول‌های سالم و آسیب‌دیده تخمدان، تحت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، ماسون‌تری کروم و پاس در بین گروه‌ها انجام شد.

تحلیل آماری

اطلاعات به دست آمده از این تحقیق با نرم‌افزار آماری SPSS (ویراست ۱۹) تجزیه و تحلیل شد. تمام داده‌ها به صورت Mean±SD بیان شدند و از آزمون T جفت شده برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد. در مورد کلیه یافته‌ها اختلاف در سطح $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار تلقی شد.

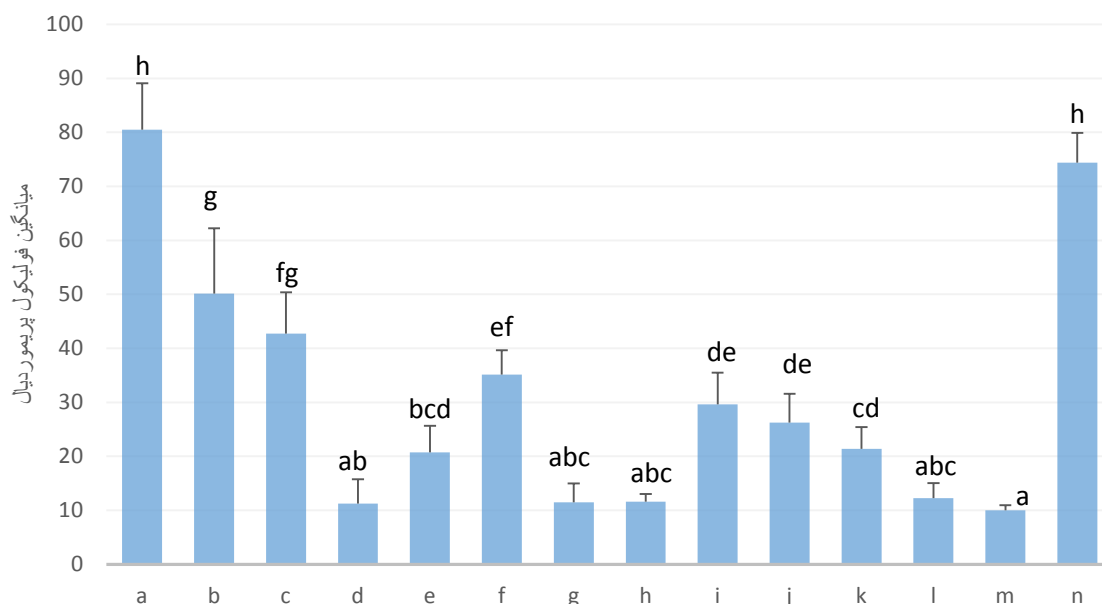
نتایج

پس از بررسی میکروسکوپی بافت تخمدان در گروه‌های کنترل و تیمار کشت داده شده نتایج نشان دادند که در مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های ابتدایی (پریموردیال) بین گروه کنترل و گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$) (نمودار ۱). براساس نتایج به دست آمده میانگین تعداد فولیکول‌های پریموردیال در گروه کنترل درون‌تنی در ابتدای دوره و انتهای دوره تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در گروه‌های هم‌کشتی با غلظت‌های مختلف مشخص شد که در میانگین فولیکول‌های پریموردیال در گروه هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی همراه با یک میکروگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در مقایسه با گروه کنترل بدون هم‌کشتی برون‌تنی تغییرات کمی ولی معنی‌دار مشاهده می‌شود. در مقایسه بقیه گروه‌ها با گروه‌های کنترل درون و برون‌تنی نیز تفاوت‌های معنی‌داری مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده تبدیل فولیکول‌های پریموردیال به انواع فولیکول‌های مرحله بعدی می‌باشد که اثر هم‌کشتی و فاکتور رشد شبه انسولین را بر تکوین فولیکول‌های پریموردیال را نشان می‌دهد.

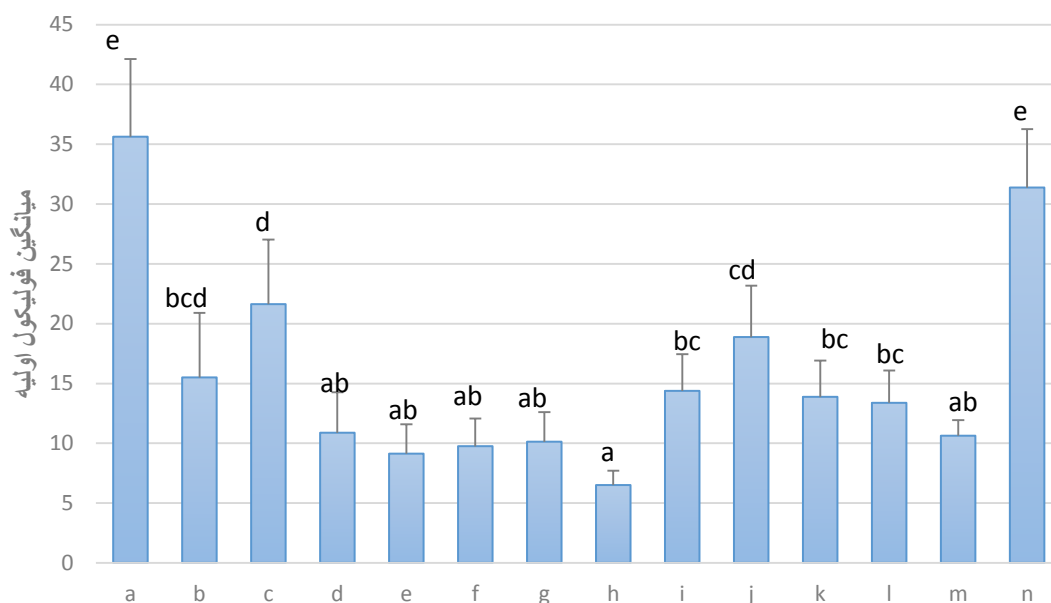
میانگین تعداد فولیکول‌های اولیه بین گروه کنترل و گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان دادند براساس نتایج به دست آمده میانگین تعداد فولیکول‌های اولیه در گروه کنترل درون‌تنی در ابتدای دوره و انتهای دوره تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($p < 0/05$) (نمودار ۲).

براساس نتایج به دست آمده میانگین تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه کنترل درون‌تنی در ابتدای دوره و انتهای دوره تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$). در گروه‌های هم‌کشتی با غلظت‌های مختلف مشخص شد که میانگین فولیکول‌های ثانویه در گروه هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی به همراه گروه هم‌کشتی با 10 ug/ml IGF در مقایسه با گروه کنترل بدون هم‌کشتی برون‌تنی تغییرات رشد شبه انسولین-1 و گروه بدون هم‌کشتی با 10 ug/ml IGF در مقایسه با گروه کنترل بدون هم‌کشتی برون‌تنی تفاوت‌های معنی‌داری مشاهده می‌شود (نمودار ۳). پس از بررسی میکروسکوپی بافت‌های گروه‌های کنترل و تیمار کشت داده شده میانگین تعداد فولیکول‌های پری‌آنترال بین گروه کنترل و گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند مگر در گروه‌های گروه هم‌کشتی با 10 ug/ml IGF ، 5 ug/ml IGF و 1 ug/ml IGF تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$). میانگین تعداد فولیکول‌های پری‌آنترال نشان داده شده است. (نمودار ۴). هم‌چنین براساس نتایج به دست آمده میانگین تعداد فولیکول‌های پری‌آنترال در گروه کنترل درون‌تنی در ابتدای دوره و انتهای دوره تفاوت معنی‌داری وجود دارد که به دلیل اثرات هورمون‌های آندوکراینی مترشحه در بدن می‌باشد. هم‌چنین این تعداد در گروه‌های مورد مطالعه با اثر هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و غلظت‌های 5 و 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد شبه انسولین به تعداد مطلوب رسیده است که این حاکی از اثرات مثبت فاکتورهای مورد مطالعه بر تکوین فولیکول‌ها از پریموردیال به پری‌آنترال می‌باشد و می‌تواند جایگزین مناسبی برای هورمون‌های دخیل در تکوین فولیکول‌ها می‌باشد.

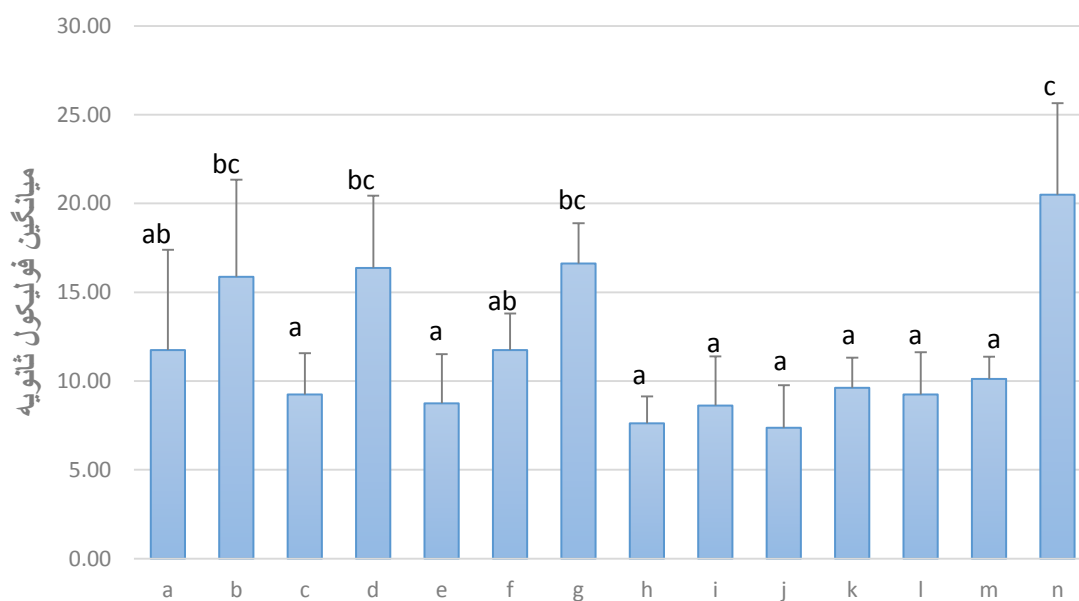
باتوجه به این‌که لایه‌های تک‌داخلی و تک‌خارجی از یک‌دیگر به خوبی قابل تمیز نبودند لذا اندازه مجموع لایه‌های تک داخلی و خارجی با یک‌دیگر محاسبه شده است. در بررسی گروه‌های کنترل اندازه لایه‌های تک در مقایسه با گروه تحت تیمار با فاکتور رشد شبه انسولین تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ($p < 0.05$) (نمودار ۵). شکل شماره ۱ مقطع بافتی تخمدان را همراه با فولیکول‌های تخمدانی در رنگ‌آمیزی‌های مختلف نشان می‌دهد.



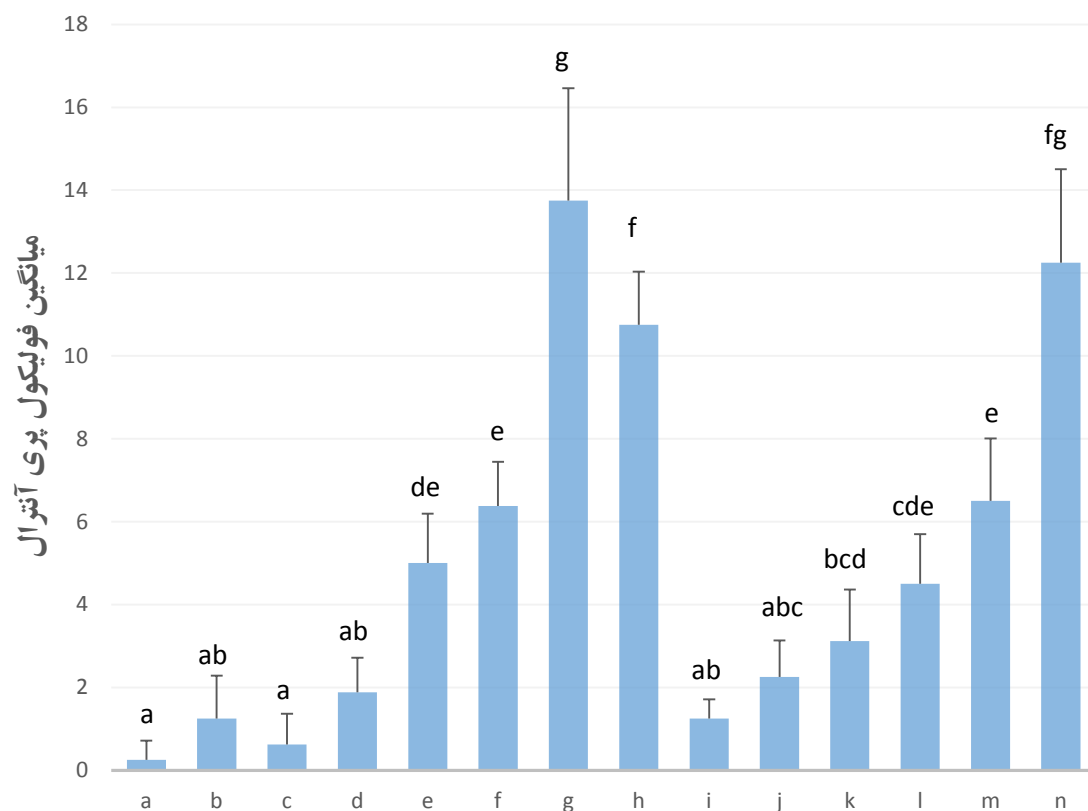
نمودار ۱: میانگین و انحراف معیار تعداد فولیکول‌های پریموردیال در گروه‌های مورد مطالعه
* حروف هم‌نام به معنای عدم تفاوت معنی‌دار و حروف غیرهم‌نام به معنای وجود تفاوت معنی‌دار است.



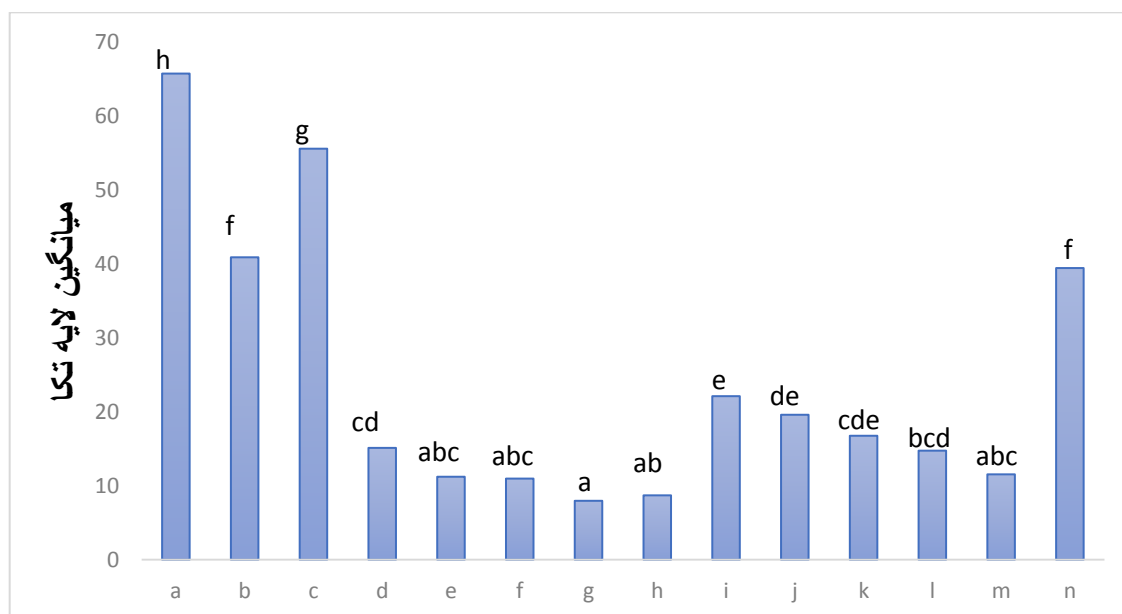
نمودار ۲: میانگین و انحراف معیار تعداد فولیکول‌های اولیه در گروه‌های مورد مطالعه
* حروف هم‌نام به معنای عدم تفاوت معنی‌دار و حروف غیرهم‌نام به معنای وجود تفاوت معنی‌دار است.



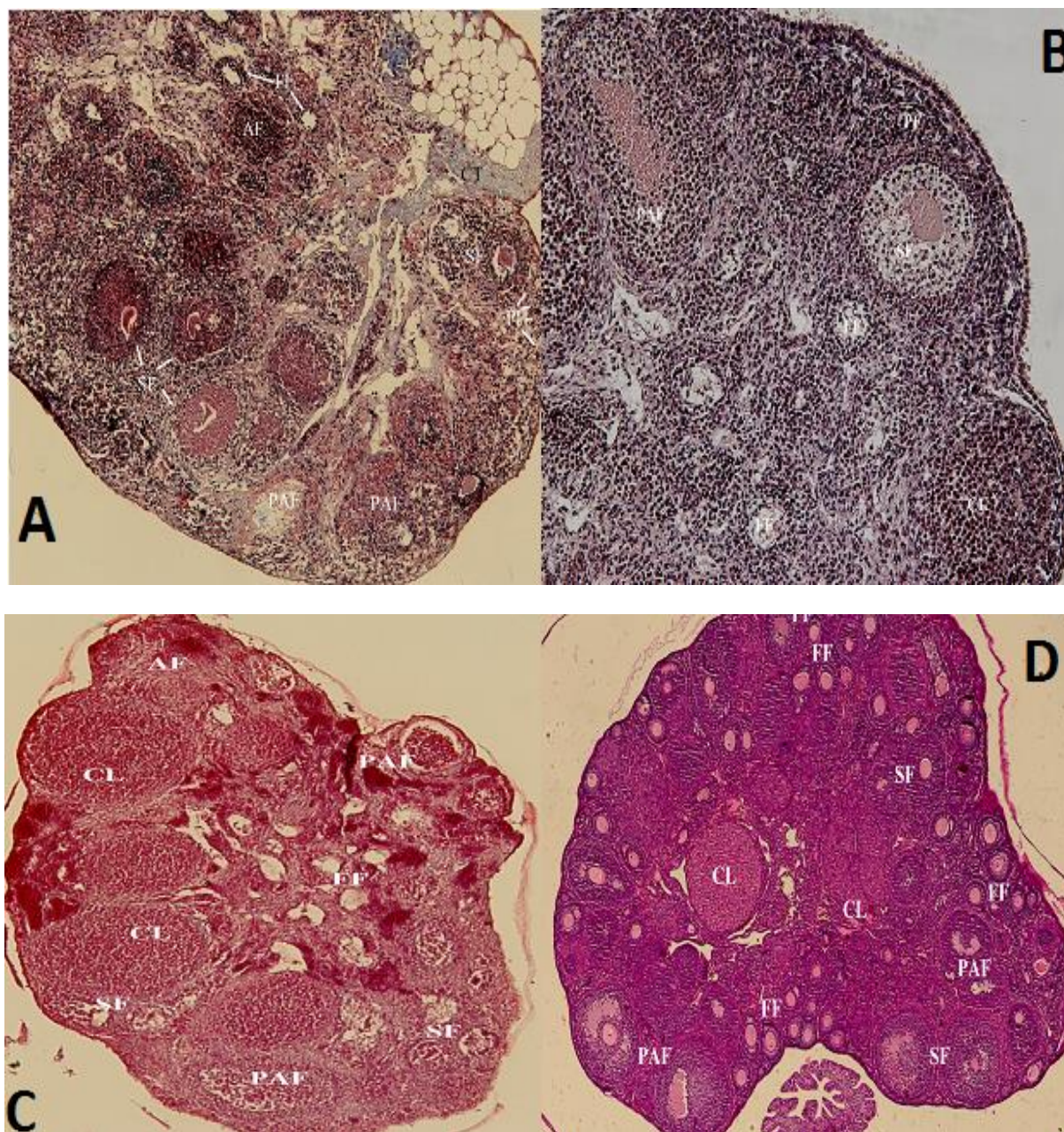
نمودار ۳: میانگین و انحراف معیار تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه‌های مورد مطالعه
* حروف هم‌نام به معنای عدم تفاوت معنی‌دار و حروف غیرهم‌نام به معنای وجود تفاوت معنی‌دار است.



نمودار ۴: میانگین و انحراف معیار تعداد فولیکول‌های پری آنترال در گروه‌های مورد مطالعه
* حروف هم‌نام به معنای عدم تفاوت معنی‌دار و حروف غیرهم‌نام به معنای وجود تفاوت معنی‌دار است



نمودار ۵: میانگین و انحراف معیار اندازه لایه تکا در گروه‌های مورد مطالعه بر حسب میکرون
* حروف هم‌نام به معنای عدم تفاوت معنی‌دار و حروف غیرهم‌نام به معنای وجود تفاوت معنی‌دار است.



شکل ۱: مقطع بافتی تخمدان همراه با فولیکول‌های تخمدانی. اشکال A, B رنگ آمیزی ماسون تری کروم. بزرگ نمایی $\times 100$ ، شکل C رنگ آمیزی PAS بزرگ نمایی $\times 40$ ، شکل D رنگ آمیزی H&E بزرگ نمایی $\times 40$.

PF: فولیکول پرموردیال، FF: فولیکول اولیه، SF: فولیکول ثانویه، PAF: فولیکول پری آنترال، AF: فولیکول آنتریک، CL: جسم زرد.

بحث

طبق تحقیقات انجام شده شواهد زیادی وجود دارد که فاکتورهای رشد شبه انسولینی در شرایط برون تنی و درون تنی سبب تحریک تخمدان می‌شوند که در نهایت به تکامل فولیکول‌های تخمدانی منجر می‌شود. یکی از این فاکتورها که نقش مهمی در تکثیر و تفریق سلول‌های گرانولوزای تخمدان دارد فاکتور رشد شبه انسولینی شماره ۱ است که نقش کلیدی را در این زمینه به عهده دارد (۱۲).

رامش و همکاران (۱۳) مطالعه‌ای را به صورت هم‌کشتی فولیکول‌های پری آنترال با سلول‌های گرانولوزا و کومولوسی در تخمدان‌های بوفالو انجام دادند که نتایج آنان حاکی از افزایش قطر فولیکول‌های پری آنترال در تخمدان‌های بوفالو بود. هم‌چنین

تعداد فولیکول‌های سالم در سیستم‌های هم‌کشتی با سلول‌های کومولوسی افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل داشته است. هم‌چنین در چند پژوهش دیگر نیز این نتایج تکرار شده اند (۱۴). در مطالعه ما تعداد فولیکول‌ها مورد بررسی قرار گرفت و تمامی فولیکول‌پری‌آنترال‌ها سالم بودند و فولیکول‌نکروزه‌ای وجود نداشت در هر صورت تناقض گزارش‌های مورد بررسی با مطالعه ما می‌تواند به دلیل گونه مورد بررسی و هم‌چنین نوع سلول‌های هم‌کشتی در پژوهش می‌باشد.

گو و همکاران (۱۵) در سال ۲۰۱۳ اثرات سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در کاهش آپوپتوزیس سلول‌های گرانولوزا با سیسپلاتین (Cisplatin) مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنان حاکی از کاهش معنی‌داری از آپوپتوزیس سلول‌های گرانولوزا در هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی بود. هم‌چنین آن‌ها در شرایط *In vivo* نیز میزان آپوپتوزیس سلول‌های گرانولوزا را با پری‌منوپاس (Perimenopause) را با تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد که بعد از یک ماه و سه ماه تیمار میزان آپوپتوزیس سلولی در گروه تیمار با سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌طور معنی‌داری کاهش داشته است.

در مطالعه ما نیز اگر چه بررسی میزان آپوپتوزیس سلولی صورت نگرفته است ولیکن با توجه به کوتاه بودن مدت تیمار و هم‌چنین بررسی تکوین فولیکول‌ها نیز می‌توان به‌زنده‌مانی بافت تخمدان و نیز رشد فولیکول‌های بالغ در گروه تحت تیمار و توقف آپوپتوزیس سلولی پی‌برد. که احتمالاً این اثر مربوط به حذف رادیکال‌های آزاد مترشحه از سلول‌های بنیادی و IGF-1 هم‌چنین محرک‌های رشد مترشحه از این دو متغییر می‌باشد.

لینگ و همکاران (۱۶) رشد فولیکول‌ها و هم‌چنین بلوغ تخمک‌های موش را در هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد بررسی قرار دادند. طبق گزارش آنان محیط‌های کشت بهینه شده مورد استفاده در بلوغ فولیکول و اووسیت‌ها با سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌طور معنی‌داری قطر فولیکول‌ها را افزایش داده بود و هم‌چنین به‌صورت معنی‌داری بلوغ اووسیت‌های حاصله و متعاقب آن لقاح آن‌ها را افزایش داده بود. در مطالعه ما نیز رشد فولیکول‌های اولیه و ثانویه و هم‌چنین تکوین فولیکول‌های بالغ در گروه هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشاهده شده است که با مطالعه مورد بررسی هم‌سو می‌باشد که احتمالاً این نتایج حاصله به دلیل سیگنال‌های آزاد شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و اثر بر سلول‌های مجاور می‌باشد. هم‌چنین فاکتور رشد شبه انسولین با کمک به تکوین فولیکول‌ها وابسته به دوز و وجود سرم جنین گاوی و هم‌چنین آلبومین سرم گاوی نیز در محیط بی‌تأثیر نیست چرا که میزان قابل توجهی از نیازات سلولی و بافت تخمدان را برطرف می‌کند.

تاگلر و همکاران (۱۷) پس از ۱۴ روز کشت فولیکول‌های تخمدان موش در محیط کشت سه‌بعدی به‌همراه سلول‌های بنیادی تمایز یافته در سال ۲۰۱۲ دریافتند که تمام فولیکول‌های مورد کشت بین روز ۱۰-۶ دچار دژنراسیون شدند و از بین رفتند و تا روز ششم نیز قطر فولیکول‌های اولیه و ثانویه و هم‌چنین قطر فولیکول‌های بالغ نیز افزایش یافته بود که آن نیز موجب افزایش قطر بافت مورد کشت شده بود.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ دارای پتانسیل رشد و تمایز هستند و هم‌چنین مطالعات قبلی به‌روشنی نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث مهار پاسخ ایمنی سلولی می‌شوند. بنابراین آن‌ها به‌عنوان کاندیدهای ایده‌آلی برای هم‌کشتی به‌حساب می‌آیند (۱۸). در این مطالعه نیز با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد که هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی و IGF-1 به‌طور معنی‌داری تعداد فولیکول‌های پری‌آنترال را در گروه هم‌کشتی وابسته به دوز افزایش داده است.

طغرایبی و همکاران (۱۹) گزارش نمودند که در شرایط درون‌تنی تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بافت‌های تخمدان سرطانی شده، سبب افزایش تقسیم میوز و القای تخمک‌گذاری می‌شد که احتمالاً به دلیل القای مهار پاسخ ایمنی و هم‌چنین

جلوگیری از رشد بی‌رویه بافت تخمدانی بوده است. درنتایج به‌دست آمده در این تحقیق در شرایط آزمایشگاهی نیز افزایش تعداد فولیکول‌های پری‌آنترال را که متعاقب آن تخمک‌گذاری صورت می‌گیرد را تصدیق می‌کند.

حیدری و همکاران (۲۰) فولیکول‌های پری‌آنترال موش را در سیستم هم‌کشتی با سلول‌های فیبروبلاست مورد بررسی قرار دادند که نتایج آن‌ها نشان داد که قطر فولیکول‌های کشت داده شده در روزهای دوم، چهارم و ششم افزایش معنی‌داری را داشته است. هم‌چنین میزان بقای فولیکول‌ها نیز در سیستم هم‌کشتی به‌طور کامل حفظ شده بود که حاکی از موثر بودن سیستم هم‌کشتی فیبروبلاستی در حفظ و رشد بافت تخمدان و فولیکول‌های پری‌آنترال می‌باشد. در مطالعه حاضر نیز ما افزایش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌های پری‌آنترال داشته‌ایم که تصدیق‌کننده اثر بخش بودن هر دو مطالعه در سیستم‌های هم‌کشتی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نیز فقط تا هفت روز بافت‌های تخمدان مورد کشت قرار گرفتند که منبع خوبی برای مدت کشت بافت در محیط هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده است و هم‌چنین با توجه به این‌که مطالعه مورد بررسی با استفاده از سلول‌های بنیادی تمایز یافته به فیبروبلاستی بوده اثربخشی مناسبی را بر آپوپتوزیس سلولی نداشته است چرا که در مطالعاتی میزان مدت کشت با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مراتب بیشتر بوده است و حتی با تیماری‌های القای آپوپتوزیس مورد بررسی قرار گرفته است. در نهایت بهترین مدت کشت برای بررسی کشت بافت‌ها از جمله بافت‌هایی که نیاز به مواد و هورمون‌های فراوانی جهت بقا می‌باشد شش تا هشت روز گزارش شده است که در این مطالعه مدت کشت بافت‌های تخمدان به مدت هفت روز به طول انجامید.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر مستخرج از طرح پژوهشی مصوب شماره ۴۷۲۵۷ مورخه ۱۳۹۷/۴/۲۴ دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد که بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تشکر و قدردانی می‌شد.

منابع

1. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001; 19(3): 193–204.
2. Esteves SC, Roque M, Bedoschi GM, Conforti A, et al. Defining low prognosis patients undergoing assisted reproductive technology: POSEIDON criteria-the why. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9: 461.
3. Decherney AH. Principles & practice of assisted reproductive technology (3 Vols). Vol 1: Infertility: JP Medical Ltd; London. 2013.
4. Ali A, Sirard, MA. The effect of in vitro maturation in the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*. 2002; 66(4): 901-905.
5. Jin SY, Lei L, Shikanov A, Shea LD, et al. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. *Fertil Steril*. 2010; 93(8): 2633-2639.
6. Park JY, Su YQ, Ariga M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004; 303(5658):682–4.

7. Dekel N, Sherizly I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* 1985; 116 (1): 406–9.
8. Lonergan P, Carolon C, Langendonck AV, Donway I, et al. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and pre-implantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* 1996; 54(6): 1420–9.
9. Chiarini-Garcia H, Russell LD. High- resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod*. 2001; 65(4): 1170-8.
10. Demeestere I, Gervy C, Centner J, Devreker F, et al. "Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice." *Biol Reprod*. 2004; 70(6): 1664-1669.
11. Talia C, Connolly L, Fowle PA. The insulin-like growth factor system: A target for endocrine disruptors. *Environment International*. 2021; 147: 106311
12. Mazerbourg S, Monget P. Insulin-like growth factor binding proteins and IGFBP proteases: A dynamic system regulating the ovarian folliculogenesis. *Front. Endocrinol*. 2018; 9: 1-10.
13. Ramesh HS, Gupta PSP, Nandi S, Manjunatha BM. In vitro development of buffalo preantral follicles in co-culture with cumulus or granulosa cells/cumulus or granulosa cells. *Vet Arhiv*. 2010; 80 (1), 41-50,
14. Verma V, Gautam SK, Singh B, Manik RS, et al. Isolation and Characterization of Embryonic Stem Cell-Like Cells From In Vitro-Produced Buffalo(*Bubalus bubalis*) Embryos. *Mol Reprod Dev*. 2007; 74(4): 520–529.
15. Guo J, Wu W, Dong H, Fu Y, et al. BMSCs reduce rat granulosa cell apoptosis induced by cisplatin and perimenopause. *BMC cell biology*. 2013; 14(18):1-9.
16. Ling B, Feng DQ, Zhou Y, Gao T, et al. Effect of conditioned medium of mesenchymal stem cells on the in vitro maturation and subsequent development of mouse oocyte. *Braz J med Biol Res* 2008; 41(11): 978-985.
17. Togler D, Tu T, Smith RM, Anderson N, et al. Embryonic fibroblast enable the culture of primary ovarian follicles within alginate hydrogels. *Tissue engineering*. 2012; Part A: 1-10
18. Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005; 305(1):33-41.
19. Toghraie FS, Chenari N, Gholipour MA, Faghih Z, et al. Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in Rabbit. *Knee* 2011; 18(2): 71-5.
20. Heidari M, Karimpour Malekshah A, Parivar K, Khanbabaei R, et al. Effect of fibroblast co-culture on in vitro maturation and fertilization of mouse preantral follicles. *Int J Fertil Steril*. 2011; 5(1): 1–8.

The effect of insulin-like growth factor (IGF-1) in the presence and absence of monolayer mesenchymal stem cell on the development of ovarian follicles in mice

Mohammadeini A Ph.D. Student., Mohammadpour AA* Ph.D., Parham A Ph.D.

- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

* Email corresponding author: mohammadpour@um.ac.ir

Received: 3 Aug. 2021

Accepted: 19 Sep. 2021

Abstract

Aim: In this experimental study, ovarian follicle development was studied using insulin-like growth factor and mesenchymal stem cells.

Material and Methods: In this study, mesenchymal stem cells were extracted from the femur bone marrow of 20 mice and 100 pairs of ovaries of mice were co-cultured with insulin-like growth factor (IGF-1) at different concentrations (0.1, 0.5, 1, 5, 10 μ g) for seven days. Then ovarian follicles were examined and counted by Hematoxylin-eosin, Mason trichrome and PAS staining. Statistical analysis was performed using SPSS software and paired t-test with $P < 0.05$.

Results: Comparison of ovarian follicles in the control group and the experimental groups in most groups showed a significant difference between the follicles ($P < 0.05$). This difference was more evident in the number of preantral follicles in the experimental groups of 5 and 10 μ g / ml IGF-1 in the presence and absence of mesenchymal stem cells than in the control group. The number of follicles in the control group was 1.25 ± 1.03 and 13.75 ± 2.71 ; 10.75 ± 1.28 at concentrations of 5 and 10 μ g, respectively. Theca and granulosa layers did not show a significant difference in the control and treated groups.

Conclusion: This method is effective in the growth and development of adult follicles and also minimizes the rate of cellular apoptosis. Obviously, the use of ovarian tissue culture and subsequent production of quality eggs will solve many infertility and genetic problems in the future.

Keywords: Ovary, Mesenchymal Stem Cells, Tissue Culture, Mice, IGF-1