فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۰ ص. ۱۸-۱۱

مقاله پژوهشی

مقایسه کیفیت تخمک‌های حاصل از موش طبیعی و موش القایی سندرم تخمدان پلی کیستیک به دنبال بررسی ژن *GDF-9*

فاطمه کوشه و فاطمه قاسمیان*

دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): ghasemian@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۰

چکیده

سندروم‌تخمدان‌پلی‌کیستیک (Polycystic ovarian syndrome : PCOS) یکی از شایع‌ترین علل ناباروری است. یکی از روش‌های کمک باروری برای بیماران PCOS استفاده از روش بلوغ آزمایشگاهی (in-vitro maturation : IVM) است. از نشانه‌های کیفیت تخمک بیان مناسب ژن *GDF-9* است. این مطالعه به بررسی تفاوت کیفیت تخمک/فولیکول‌هایPCOS با تخمک/فولیکول‌های طبیعی در جریان IVM می‌پردازد. القاء PCOS در موش‌های نژاد NMRI (تعداد= ۱۰) از طریق تزریق ۴ میلی‌گرم‌برکیلوگرم استرادیول والرات حل شده در ۰/۲ میلی‌گرم روغن کنجد به صورت یک بار در روز و به مدت ۶۰ روز انجام شد. تخمک‌ها و فولیکول‌ها در گروه‌های کنترل و PCOS جمع‌آوری شدند و در محیط -MEM غنی شده با ۱۰% سرم جنین گاوی به مدت ۴۸-۲۴ ساعت کشت داده شدند. ارزیابی میزان بلوغ آزمایشگاهی و بیان ژن GDF-9 (روشReal-Time PCR) در گروه‌های مختلف انجام شد. آنالیز آماری با روش ANOVA یک‌طرفه انجام شد. در گروه PCOS، کاهش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌های اولیه، پری‌آنترال، آنترال و جسم زرد مشاهده شد. همچنین فولیکول‌های کیستیک و فولیکول‌هایی با لایه گرانولوزای دژنره‌شده بالا مشاهده شد. ۵۲٪ تخمک‌ها و ۵۰ % فولیکول‌ها در گروه PCOS بالغ شدند. در گروه کنترل، ۸۳/۳۳ درصد تخمک‌ها و ۷۵ درصد فولیکول‌ها بالغ شدند ($P<0.05$). بیان ژن *GDF-9* در تخمک‌ها و فولیکول‌های طبیعی به ترتیب ۱/۰۰±۰/۰۸ و ۱/۲۴±۰/۲ ($P<0.01$) و در تخمک‌ها و فولیکول‌های PCOS به ترتیب ۰/۶۶±۰/۰۲ و ۰/۳۷±۰/۰۲ ($P<0.001$) بود. کیفیت تخمک‌ها و به ویژه فولیکول‌های PCOS (بیان ژن *GDF-9*) به دنبال IVM کاهش یافت. بنابراین، استفاده از تخمک‌های PCOS برای IVM پیشنهاد می شود.

کلیدواژه‌ها: سندروم تخمدان پلی کیستیک، بلوغ تخمک، GDF-9، کیفیت تخمک.

مقدمه

سندروم تخمدان پلی کیستیک (Polycystic ovarian syndrome: PCOS) از شایع ترین اختلالات اندوکرینی در سنین باروری زنان است و تقریبا ۲۸ درصد از زنان مبتلا به آن هستند [۱]. در سال ۱۸۴۴برای اولین بار، chercau این سندروم را به عنوان تغییر مورفولوژیک تخمدان مطرح کرد و بعدها ضوابط تشخیصی آن در سال ۲۰۰۳ توسط دو انجمن ESHRE و ASRM بر پایه مطالعات گسترده روی اصول اولیه Rotterdam[۱] تدوین گردید (۲). داشتن حداقل دو علامت از سه علامت تخمدان پلی کیستیک، کاهش و یا عدم تخمک‌گذاری و هیپرآندروژنسیم بالینی در اولتراسونوگرافی مبنای تشخیص این سندروم است (۳). نشانه‌های بالینی معمول در PCOS عبارتند از: چرخه‌هایی با عدم تخمک گذاری، وجود تخمدان‌های پلی کیستیک در اولترا سونوگرافی و هیپرآندروژنیسم است. همچنین بسیاری از زنان دارای افزایش وزن و/یا چاقی بوده که خطر بالایی از ایجاد سندروم‌های متابولیک را برای آنان در طول زندگی در پی دارد. چرخه‌های عدم تخمک گذاری اغلب به صورت اولیگومنوره، آمنوره ثانویه و/یا خونریزی غیر طبیعی رحمی مشاهده می شوند. البته حتی داشتن سیکل‌های قاعدگی منظم نمی تواند عدم تخمک کذاری مزمن را رد کند، به ویژه اگر فرد علائم بالینی هیپرآندروژنیسم را نشان دهد. وجود تخمدان پلی کیستیک منحصرا در PCOS وجود ندارد، زیرا تخمدان پلی کیستیک ممکن است طی تکوین دوره بلوغ در بیماران با آمنوره هیپوتالامیک و هیپرپرولاکتینمی نیز مشاهده شود. معیار تشخیص PCOS حضور ۱۲ عدد یا تعداد بیشتری فولیکول با قطر ۲-۹ میلی‌متر و یا وجود حجم تخمدانی بالاتر از ۱۰میلی لیتر در فاز فولیکولی بوده و یا افزایش در بافت استرومال همراه است (۴). بیماران مبتلا به این سندروم کاندید درمان ناباروری با استفاده از روش‌های کمک باروری مانند بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاهی هستند. بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاهی فرآیندی است که در طی آن تخمک‌های پوشیده شده با سلول‌های کومولوس، در محیط‌های کشت مخصوص به منظور رسیدن به بلوغ قرار داده می‌شوند [۵].

ژن فاکتور تمایز رشد-۹ (Growth differentiation factor-9: *GDF-9*) یکی از اعضای خانواده TGF-β است که با بررسی میزان بیان این ژن در تخمک‌ها و فولیکول‌ها می توان کیفیت تخمک را بررسی کرد. همچنین این ژن عامل موثر جهت تکثیر و بلوغ تخمک‌ها و فولیکول‌ها است [۶]. بیان این ژن در تخمک و فولیکول‌هایی که تحت روش‌های کمک باروری Assisted reproductive technique: ART) قرار می گیرند نشان از فعال سازی فرایند بلوغ است [۷] و نقش اصلی در پیشرفت و تبدیل فولیکول‌های اولیه به ثانویه و رشد آنها تا مرحله آنترال دارد [۸]. لیگاند-کیت یکی از عوامل تنظیم کننده رشد در بسیاری از سلول‌ها است و در مراحل اولیه رشد فولیکول نیز نقش دارد. بنابراین ارتباط مستقیم بین *GDF-9* و مسیر لیگاند-کیت نقش این ژن را در ارتباط با مراحل رشد فولیکول تصدیق می‌کند. [۹]. بررسی‌های مولکولی در موش‌های آزمایشگاهی که*GDF-9* knock out بودند نشان داد که تخمک‌های این موش توانایی شروع میوز در شرایط *in vitro* را نداشته و نابارور هستند. همچین اندامک‌های موجود در تخمک‌های این موش غیرطبیعی بودند. این موضوع بیانگر اهمیت ویژه بیان این ژن در مراحل اولیه رشد فولیکول و تخمک است [۱۰]. بررسی‌ها نشان داده است که ژن *GDF-9* در سلول‌های گرانولوزای موش‌های آزمایشگاهی تولید پروژسترون و استرادیول پایه را تحریک می کند [۱۱]. در مطالعه‌ای که بر روی همسترهای تیمار شده با ژن *GDF-9* انجام شد، گزارش شده است که بیان این ژن سبب تحریک فعال سازی رشد فولیکول‌ها در تخمدان‌های همستر شده است [۱۲]. همچنین مطالعات نشان می‌دهند که بیان بیش

[۱] اخیراً راهنما و ضوابط بین‌المللی مبتنی بر شواهدی برای ارزیابی و مدیریت سندروم تخمدان پلی‌کیستیک منتشر شده است. در سال ۲۰۱۸، استفاده از ضوابط روتردام برای زنان بالغ را به رسمیت شناخته است. براساس این ضوابط برای تشخیص PCOS با استفاده از معیارهای روتردام، زنان باید حداقل دو مورد از موارد زیر را جهت تشخیص سندروم داشته باشند: اختلالات تخمک‌گذاری، هایپرآندروژنیسم (بالینی یا بیوشیمیایی یا هر دو) یا مورفولوژی تخمدان پلی‌کیستیک. پزشکان باید قبل از تشخیص نهایی چندین اختلال دیگر با تظاهرات مشابه را رد کنند.

از حد *GDF-9* موجب بلوغ زودرس تخمک و رشد سریعتر فولیکول‌ها می شود [۱۳]. با توجه به اینکه تخمک‌ها و فولیکول‌های PCOS قبل از بلوغ دچار آترزی می شوند، روش بلوغ آزمایشگاهی (*In-vitro* maturation: IVM) روش مناسب برای بلوغ تخمک/فولیکول‌های PCOS مطرح می شود. پیش از این برای استفاده از تخمک/فولیکول‌ها جهت ورود به چرخه‌های کمک باروری به بررسی تفاوت کیفیت تخمک/ فولیکول‌های طبیعی با تخمک/فولیکول‌های PCOS پرداخته نشده است. لذا هنوز مشخص نیست آیا کیفیت تخمک و فولیکول‌های PCOS که در شرایط آزمایشگاهی بالغ می‌شوند با تخمک و فولیکول‌های طبیعی بالغ شده در شرایط آزمایشگاهی متفاوت است؟ لذا در این مطالعه تفاوت کیفیت تخمک‌های طبیعی با تخمک‌هایPCOS در شرایط بلوغ آزمایشگاهی و ارتباط آن با میزان IVM و کیفیت تخمک/فولیکول با توجه به میزان بیان ژن *GDF-9* مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی: این مطالعه تجربی در دانشگاه گیلان صورت گرفته است و از ۲۰ موش ماده بالغ MRI با وزن ۳۵-۳۰ گرم و ۸-۷ هفته ای برای مطالعه استفاده شد. حیوانات در اتاق مراقبت از حیوانات و در یک محیط کنترل شده با دمای ۳ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، ۴۵-۵۵ درصد رطوبت و ۱۲ساعت چرخه روشن/تاریکی نگهداری شدند. همه موش‌ها در قفس نگهداری و با رژیم غذایی استاندارد و دسترسی به آب به صورت آزادانه تغذیه شدند. کلیه تحقیقات مطابق با اصول اخلاقی تحقیق بوده و توسط کمیته اخلاق تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی گیلان تأیید شده است (IR.GUMS.REC.1399.255). این موش‌ها به دو گروه، به عنوان گروه کنترل (۱۰عدد) و گروه PCOS (۱۰عدد) تقسیم بندی شدند.

القای سندروم تخمدان پلی کیستیک در موش: تزریق عضلانی تمام حیوانات آزمایشی به جز گروه کنترل با استرادیول والرات (شرکت ابوریحان) با دوز ۴ میلی گرم بر کیلوگرم حل شده در ۰/۲ درصدروغن کنجد یک بار در روز و به مدت ۶۰ روز انجام شد. به منظور بررسی صحت القا، تخمدان‌های هر دو گروه (طبیعی و PCOS) برداشته شد و در محلول الکلی بوین فیکس شدند. پس از مرحله آبگیری، تخمدان‌ها را به صورت سری‌های ۵ میکرومتری برش داده شدند و با هماتوکسیلین و ائوزین(MERCK) رنگ‌آمیزی شدند و مورد ارزیابی هیستولوژیکی قرار گرفتند.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک و فولیکول ها: پس از تأیید القای PCOS، برای جداسازی بافت تخمدان، ابتدا موش‌های آزمایشگاهی را با روش جا به جایی مهره گردنی کشته و سپس تخمدان‌ها جدا گردید. پس از دایسکت بافت تخمدان، تخمک و فولیکول‌های هر دو گروه (طبیعی و PCOS) برداشته شد. یک روز قبل از انجام مراحل بلوغ آزمایشگاهی تخمک، محیط کشت لازم برای انجام آزمایش تهیه و در انکوباتور(Irankhodsaz co.) با ۵% CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. برای کشت تخمک/ فولیکول‌ها از محیط‌کشت MEM-α (Minimum Essential Medium-alpha; Cinnagen) با ۱۰% سرم جنین گاوی (Cinnagen) استفاده شد. برای هر کدام از گروهها، پتری دیش‌های مجزا در نظر گرفته شد و درون هر دیش چندین قطره به حجم ۱۰۰ میکرولیتری از محیط‌کشت تهیه شده قطره گذاری شد و روی تمام آنها با روغن معدنی (Cinnagen) پوشانده شد. تخمک‌ها و فولیکول‌های جمع آوری شده از تخمدان‌های گروه کنترل و گروه PCOS به چهار گروه تقسیم شدند که عبارتند از: تخمک‌های گروه کنترل (۱۸عدد)، فولیکول‌های گروه کنترل (۱۶عدد)، تخمک‌های گروه PCOS (۲۵عدد) و فولیکول‌های گروه PCOS (۱۸ عدد). سپس این پلیت‌ها به انکوباتور CO_2دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انتقال داده شد و میزان بلوغ آنها پس از ۴۸-۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

Real Time PCR: پس از بلوغ آزمایشگاهی، تخمک‌ها و فولیکول‌های بالغ شده در هر دو گروه (طبیعی و PCOS) جمع آوری شدند. RNA با استفاده ازRNeasy Mini Kit (Thermo science co.) استخراج و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. به منظور تعیین کیفیت RNA از دستگاه نانودرآپ استفاده شد. جهت انجام سنجش کیفیت ابتدا دستگاه به وسیله محلول شاهد کالیبره شد. در مرحله‌ی بعد ۲ میکرولیتر از نمونه RNA در دستگاه نانودرآپ

(Thermo scientific) قرار داده شد. این دستگاه مقدار غلظت RNA (ng/μ) و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ را در اختیار قرار میدهد. در صورتی که نسبت ۲۶۰/۲۸۰ در محدوده ۲-۱/۸ قرار گیرد RNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار است. پس از سنجش کمی و کیفی RNA استخراج شده، با توجه به غلظت‌های به دست آمده سنتز cDNA و Real Time PCR انجام شد. به منظور یافتن بهترین دمای اتصال پرایمر به ژن مورد نظر Gradient PCR صورت پذیرفت. محصولات تکثیر ژن *GDF-9* در بازه دمایی ۵۷ تا ۸۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از ژل ۲% در دستگاه الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت. با مناسب بودن شرایط PCR، قطعه ای به طول ۱۳۴ جفت باز از ژن *GDF-9* تکثیر شد.

cDNA با استفاده از کیت cDNA در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه سنتز شد و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. از Real Time PCR (BIO-RAD) برای تعیین میزان بیان ژن *GDF-9* استفاده شد. توالی پرایمرهای آغازگرها در جدول ۱ نشان داده شده است. گلیسرآلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) به عنوان ژن خانگی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل بیان ژن، از سیکل‌های حرارتی استفاده شد. رنگ SYBR Green (Cinnagen) برای نشانه گذاری ژن‌ها استفاده گردید. تکثیر ژن‌های هدف برای هر نمونه انجام شد. بیان نسبی برای ژن‌های هدف با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ انجام شد.

تحلیل آماری: تمام آزمایش‌ها پنج بار تکرار شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و با روش ANOVA یک طرفه انجام شد. $P<0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تغییرات هیستولوژیکی بافت تخمدان موش پس از القاء PCOS: در گروه PCOS مشاهدات با استفاده از میکروسکوپ نوری بر روی لام رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین انجام گرفت و در مقایسه با حالت طبیعی یک کاهش چشمگیر در تعداد فولیکول‌های اولیه، پری آنترال، آنترال و جسم زرد مشاهده شد. همچنین فولیکول‌های بزرگ با هسته پیکنوتیک و لایه گرانولوزای دژنره به صورت قابل توجهی مشاهده شد. علاوه بر این، فولیکول‌های کیستیک بزرگ با لایه گرانولوزای نازک و لایه تکای ضخیم دیده شد که در مقایسه با تخمدان طبیعی نشان از صحت القای PCOS داشت.

میزان بلوغ تخمک‌های گروه کنترل و PCOS: در گروه کنترل ۱۸ تخمک و در گروه PCOS ۲۵ تخمک مورد بررسی و شمارش قرار گرفت. پس از ۴۸-۲۴ ساعت از کشت، نتایج نشان داد که ۸۳/۳۳% از تخمک‌ها در گروه کنترل و ۵۲% از تخمک‌ها در گروه PCOS دارای اولین جسم قطبی بودند. میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه تخمک‌های کنترل به صورت معناداری بیشتر از گروه PCOS بود ($P< 0.05$). ۱۶ فولیکول از گروه کنترل و ۱۸ فولیکول از گروه PCOS مورد بررسی قرار گرفت. ۷۵% از فولیکول‌های نابالغ در گروه کنترل و ۵۰% از فولیکول‌های نابالغ در گروه PCOS دارای اولین جسم قطبی بودند. میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه فولیکول‌های کنترل به صورت معناداری بیشتر از گروه PCOS بود ($P< 0.05$). ارزیابی آماری نشان داد که میزان بلوغ تخمک‌های گروه کنترل نسبت به بلوغ فولیکول‌های گروه کنترل بیشتر بوده است،

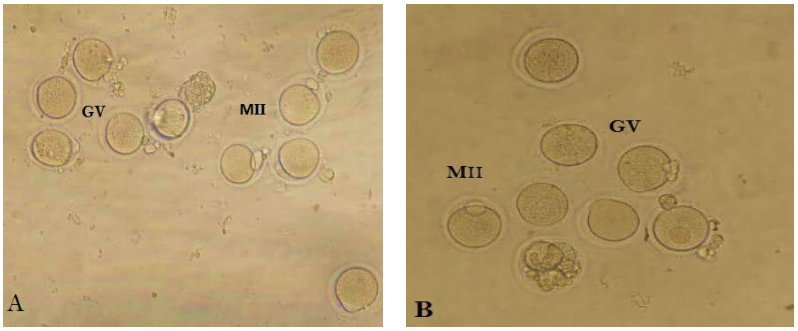
جدول ۱) مشخصات پرایمرهای طراحی شده‌ی ژن‌های *GDF-9* و *GAPDH*

ژن‌ها	توالی (5'-3')	TM (℃)	طول (bp)
GDF-9	F 5' CACCGTACTCATTCACCCT 3'	۵۷/۵	۱۹
	R 5' CACCTGGTCTTTTGTGCAT 3'	۵۷	۱۹
GAPDH	F 5' CAAGGTCATCCATGACAACTTTG 3'	۶۱/۳	۲۳
	R 5' GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'	۵۹/۶	۲۲

همچنین میزان بلوغ تخمک‌های گروه PCOS نسبت به بلوغ فولیکول‌های گروه PCOS نیز بیشتر بوده است (شکل ۱). همچنین میزان بلوغ تخمک‌های گروه کنترل در مقایسه با تخمک‌های گروه PCOS تفاوت معناداری وجود داشت و به میزان قابل توجهی بیشتر بود. میزان بلوغ در فولیکول‌های گروه کنترل نیز نسبت به فولیکول‌های گروه PCOS افزایش قابل ملاحظه ای داشت ($P< 0.05$).

بیان نسبی ژن *GDF-9* در گروه کنترل و PCOS: در این پژوهش به بررسی بیان ژن مربوط به کیفیت تخمک (*GDF-9*) به روش Real Time PCR در چهار گروه شامل تخمک کنترل، فولیکول کنترل، تخمک PCOS و فولیکول PCOS پرداخته شد. نتایج حاصل از آن بیانگر افزایش بیان ژن *GDF-9* در گروه کنترل نسبت به گروه PCOS است. میانگین بیان ژن *GDF-9* در گروه تخمک‌های طبیعی و گروه فولیکول‌های طبیعی به ترتیب ۱/۰۰±۰/۰۸ و ۱/۲۴±۰/۲ بود. در حالیکه، میانگین بیان ژن *GDF-9* در گروه تخمک‌های PCOS و گروه فولیکول‌های PCOS به ترتیب ۰/۶۶±۰/۰۲ و ۰/۳۷±۰/۰۲ بود. تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان داد که با توجه به اینکه اختلاف معنی داری در میزان بیان این ژن بین گروه تخمک‌های طبیعی و تخمک‌های PCOS وجود داشت ($P<0.01$)، تخمک‌های طبیعی به میزان قابل توجهی از کیفیت بالاتری برخوردار هستند. همچنین اختلاف معناداری در میزان بیان این ژن در گروه فولیکول‌های طبیعی و فولیکول‌های PCOS مشاهده شد ($P< 0.001$) که نشان میدهد فولیکول‌های طبیعی کیفیت مطلوب تری دارند(شکل۲). با توجه به میزان بیان این ژن، مشاهده شد که درگروه کنترل فولیکول‌ها کیفیت بهتری داشتند اگرچه در طی بلوغ آزمایشگاهی عملکرد ضعیفتری از تخمک‌های طبیعی نشان دادند. اما در گروه PCOS فولیکول‌ها هم از لحاظ موفقیت در میزان بلوغ آزمایشگاهی و هم کیفیت ضعیف‌تر از تخمک‌ها عمل کردند (جدول ۲).

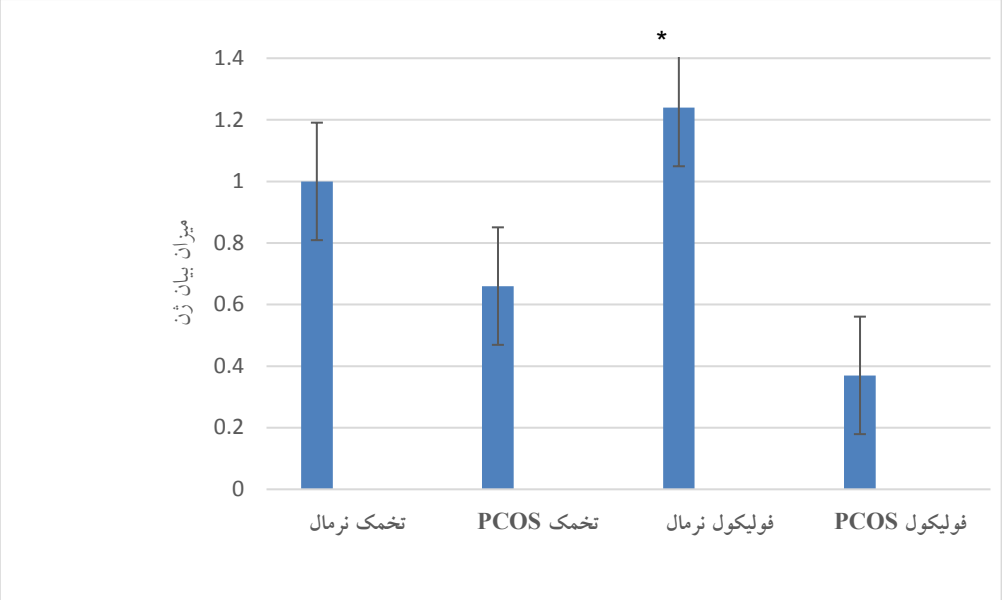
تفاوت معناداری در میزان بلوغ و بیان ژن بین گروه کنترل و PCOS وجود دارد: گروه کنترل میزان بلوغ و کیفیت بالاتری را نشان داده است($0.001>$***) (,$0.01>$**,$0.05>$*.



شکل۱) تخمک‌های قرار گرفته تحت IVM از گروه کنترل(A) و گروهPCOS (B):GV: تخمک نابالغ، MII: تخمک بالغ

جدول ۲) مقایسه میزان بلوغ و کیفیت تخمک و فولیکول‌های طبیعی و PCOS

گروه ها	GV	MII	درصد بلوغ آزمایشگاهی	میزان بیان ژن *GDF-9*
تخمک کنترل	۱۸	۱۵	۸۳/۳۳	۱/۰۰±۰/۰۸
فولیکول کنترل	۱۶	۱۲	۷۵	۱/۲۴±۰/۲
تخمک PCOS	۲۵	۱۳	*۵۲	**۰/۶۶±۰/۰۲
فولیکول PCOS	۱۸	۹	*۵۰	***۰/۳۷±۰/۰۲



شکل ۲) بیان نسبی ژن GDF-9 در گروه کنترل و PCOS: *فولیکول نرمال بالاترین کیفیت را در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان داد.

بحث

سندروم تخمدان پلی کیستیک به عنوان شایع ترین اختلال اندوکرینی در سنین باروری شناخته شده است و بیماری ژنتیکی پیچیده ای است که حدود ۲۸% از زنان در این سنین با آن درگیر هستند. با توجه به عوارض ناشی از اختلالات متابولیکی و تولید مثلی مانند ناباروری و همچنین تبعات سایکولوژیک آن، امروزه این سندروم فراتر از یک بیماری موضعی ساده معرفی شده است و به عنوان اختلالات سیستمیک مزمن و خطری جدی در حوزه سلامت زنان محسوب می شود. بنابراین شناخت کامل تعاملات متابولیکی این سندروم به منظور فراهم نمودن راهکارهای درمانی مناسب تر و تضمین بهبود کیفیت زندگی زنان مبتلا دارای اهمیت به سزایی است (۲). یکی از روش‌های فعلی برای افرادی که دچار مشکلات ناباروری هستند مانند افراد مبتلا به PCOS، استفاده از روش بلوغ آزمایشگاهی تخمک است. Trounson در سال ۱۹۹۴ با به دست آوردن ۴۰۳ تخمک نابالغ از بیماران PCOS سعی در به بلوغ رساندن آن‌ها و افزایش میزان باروری در این بیماران نمود. وی موفق شد ۴۶/۴% از تخمک‌ها را به مرحله متافاز میوز II برساند. در مطالعه دیگری Carson در سال ۱۹۹۵، ۳۶ تخمک نابالغ بیماران PCOS را به دست آورد و توانست ۶۳/۸% آنها را به مرحله متافاز میوز II برساند. همچنین Russell در سال ۱۹۹۵ با به دست آوردن۱۶۲۱ تخمک نابالغ از بیماران مبتلا به PCOS و کشت آنها در طی بلوغ آزمایشگاهی، ۵۰/۹ % آنها را به مرحله متافاز II رساند [۱۴]. در این مطالعه نیز طی بلوغ آزمایشگاهی، میزان به بلوغ رسیدن تخمک و فولیکول‌های PCOS در مقایسه با تخمک و فولیکول‌های گروه کنترل کاهش چشم گیری داشت. در این پژوهش نشان داده شد که درصد بلوغ در تخمک و فولیکول‌های گروه کنترل دارای افزایش معناداری نسبت به گروه‌های PCOS است. همینطور میزان بلوغ در تخمک‌های گروه کنترل نسبت به فولیکول‌های این گروه بیشتر بود و مورفولوژی بهتری را نشان میداد، اما این میزان مابین تخمک و فولیکول‌های گروه PCOS تفاوت معنی داری نداشت.

ژن *GDF-9* سبب افزایش میزان تخمک گذاری گشته و نشان دهنده کیفیت مطلوب تخمک است. جهش در ژن *GDF-9* با جایگزینی فنیل آلانین به جای سرین در موقعیت اسیدآمینه شماره ۷۷ در زنجیره پلی پپتیدی این ژن همراه است [۱۵]. پژوهش‌ها نشان داده اند که وجود ژن *GDF-9* در موش‌ها [۱۶] و وجود همزمان دو ژن *GDF-9* و *BMP15* در گوسفند، از فاکتورهای ضروری برای تکمیل رشد فولیکول‌ها هستند و در صورت جهش در این ژن‌ها فولیکول‌ها قادر به تکمیل فولیکولوژنز نخواهند بود و حداکثر رشد آنها تا مرحله فولیکول ثانویه است (۱۷). خنثی سازی

GDF-9 بر فعالیت جسم زرد نیز تاثیر گذار است (۱۸). ما در این پژوهش به بررسی بیان ژن *GDF-9* در تخمک و فولیکول‌های دو گروه کنترل و PCOS پرداختیم و کیفیت تخمک و فولیکول‌ها را با میزان بلوغ آزمایشگاهی در این دو گروه مقایسه نمودیم. طبق نتیجه Real Time PCR و آنالیزهای آماری نشان داده شد که میزان بیان ژن *GDF-9* بعد از بلوغ آزمایشگاهی در گروه تخمک و فولیکول‌های کنترل نسبت به گروه تخمک و فولیکول‌های PCOS بیشتر بود که نشان از کیفیت بهتر تخمک‌های گروه کنترل مورد مطالعه می باشد. همانطور که پیشتر گفته شد تخمدان‌های مبتلا به PCOS حاوی فولیکول‌های کمتری هستند و همچین با توجه به آترزی فولیکول‌ها در این گروه و همینطور وجود تخمک و فولیکول‌هایی که دارای لایه تکا و گرانولوزای ضعیف هستند، بدیهی است که تخمک و فولیکول‌های این گروه در مقایسه با حالت طبیعی توانایی بلوغ کمتری دارند و کیفیت پایین تری را نیز از خود نشان دهند. لازم به ذکر است که با توجه به میزان بیان ژن، درگروه کنترل فولیکول‌ها کیفیت بهتری از خود نشان دادند. اگرچه در طی بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های کنترل عملکرد بهتری داشتند. اما در ارتباط با گروه PCOS، فولیکول‌های به میزان قابل توجهی هم از لحاظ کیفیت و هم از لحاظ موفقیت در میزان بلوغ آزمایشگاهی ضعیف تر از تخمک‌های این گروه بودند.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های حاصل از این تحقیق، می توان نتیجه گیری کرد که در مورد گروه PCOS، تخمک‌های این گروه کیفیت بالاتری نسبت به فولیکول‌های همین گروه داشته و در IVM نیز موفق تر عمل کردند و گزینه بهتری جهت بلوغ آزمایشگاهی هستند. البته با توجه به ضعف گروه PCOS در مقایسه با گروه طبیعی برای رسیدن به بلوغ در شرایط آزمایشگاهی، باید انتظار کیفیت پایینتری از تخمک و فولیکول‌های PCOS در مقایسه با تخمک/فولیکول‌های طبیعی داشت. لازم به ذکر است که در مجموع با توجه به نتایج گزارش شده برای انجام بلوغ در شرایط آزمایشگاهی بهتر است از در نمونه‌های طبیعی از فولیکول و در نمونه‌های PCOS از تخمک به دلیل ارائه بالاترین کیفیت استفاده نمود.

منابع

[1] Crasto WR, Gleeson H. "The effect of metformin on reproduction." *Endocrional diabetes obsity* . 2014 (2): 1083.
[2] Zuo T, Zhu M, Xu W.. "Roles of oxidative stress in polycystic ovary syndrom and cancers." *Oxidative medicine cellurar longevity* 2016 (8529): 318.
[3] Ting W, Yanyan Q, Jian H, Kegin H, Dean M.. "The relationship between insulin resistance on cpg island methylation of LMNA in PCOS." *Cell biochem biophys* 2013 (67): 1041-1047.
[4] Deleo V, Musacchino MC, Cappelli V, Petraglia F.. "Genetic, Hormonal and metabolical aspects of PCOS." *Reproductive biology endocrinology* 2016 (14): 380.
[5] Tavana S, Azarnia A, Shahverdi P.. "Effects of saffron aqueous extract on in vitro maturation, fertilization and embryo development of mouse oocyte." *Cell journal (yakhte)* 2012 (13): 259-264.
[6] Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, et al.. "The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance." *Development* 2004 (131): 933–942.
[7] Tomic D, Brodie SG, Deng C, et al.."Smad 3 may regulate follicular growth in the mouse ovary. " *Biol Reprod* 2002 (66): 917–923.
[8] Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang YF, Kotsuji F, et al.. "Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage." *Mol Endocrinol* 2006 (20): 2456–2468.
[9] Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ.. "Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles." *Endocrinology* 1999 (140): 1236–1244.
[10] Kang MK, Han SJ.. "Post-transcriptional and posttranslational regulation during mouse oocyte maturation." *BMB Rep* 2011 (44): 147–157.
[11] Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ.. "In vivo treatment with GDF-9

stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats." *Endocrinology* 2000 (141): 3814–3820.

[12] Wang J, Roy SK.. "Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone." *Biol Reprod* 2004 (70):577–585.

[13] Carabatsos M, Elvin J, Matzuk M, Albertini D.. "Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-de fi cient mice." *Dev Biol* 1998 (204(2)): 373–384.

[14] Cobo Ana C, Requena A.. "Maturation in vitro of human oocytes from unstimulated cycles: Selection of the optimal day for ovum retrieval based on follicular size." *Hum Reprod* 1999 (14(7)): 1864-1868.

[15] Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, et al.. "Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cam-bridge and Belclare sheep (Ovis aries)." *Biol Reprod* 2004 (70):900–909.

[16] Yan C, Wang P, DeMayo J, Demay FJ, Elvin JA, Carino C, et al.. "Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differ- entiation factor 9 in ovarian function." *Mol Endocrinol* 2001 (15): 854– 866.

[17] Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, et al. "Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep." *Biol Reprod* 2002 (67): 1777–1789.

[18] Juengel JL, Hudson NL, Whiting L, McNatty KP. "Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes." *Biol reprod* 2004 (70): 557–561.