Journal of Animal Biology, Summer 2024; 16(4):123-136

Research Article

Comparison of the Effects of GHRP-6, Ghrelin Hormone Agonist, on human immature oocyte in Culture Medium in 48 Hours

Caspian Ostadian[1], Nasim Hayati Roudbari[1*], Ziba Zahiri Sorouri[2], Ahmad Hosseini[3]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Obstetrics and Gynecology, Reproductive Health Research Center, Alzahra Hospital, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
3. Mehr Fertility Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
*Corresponding Author: nasimhayati@yahoo.com

Received: 17 February 2024 Accepted: 2 May 2024

DOI: 10.60833/ascij.2024.1092476

Abstract

In vitro maturation (IVM) is a method by which immature oocytes mature in a culture medium and laboratory conditions. Therefore, the culture medium plays a crucial role in the final result of the IVF outcome. This study investigates the impact of six different doses of the Ghrelin hormone agonist GHRP-6 in a synthetic culture medium containing human tubal fluid with serum albumin (HTF+HSA) on the maturation rate of human immature oocytes (GV) within 24 and 48 hours. The oocytes were collected from women under 35 years old, referring to Mehr Infertility Center/ Rasht /Iran, due to non-female factor infertility, and immature oocytes, unsuitable for oocytes cytoplasmic injection, were donated to this project. 30 immature oocytes were used in all 6 experimental and control groups. The criterion of cell maturity and progress of meiosis was the formation of the first polar body after 24 and 48 hours. Fisher's exact test was used to examine statistically significant differences between the groups. The addition of 75 ng/ml of GHRP-6 to the HTF culture medium led to a maturation of 70% of GVs after 24 hours which was statistically significant in comparison with other groups ($p < 0.05$), but not significant at 48h which was 80% ($p > 0.05$). There was no significant difference between the 50 ng/ml and 25ng/ml groups and the control group. On the other hand, it was observed that increasing the dose of GHRP-6 in the culture medium led to stop growth and cell death. The results indicated that the Ghrelin hormone agonist with a concentration of 75 ng/ml in the culture medium of human tubule fluid containing human serum can accelerate the meiosis process and better development of oocytes.

Keywords: Immature oocytes, Intra cytoplasmic sperm injection, *In vitro* maturation, Ghrelin hormone, GHRP-6

زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۳۶-۱۲۳

مقاله پژوهشی

مقایسه تاثیر GHRP-6 و اگونیست هورمون گرالین روی بلوغ تخمک‌های نابالغ انسان در محیط کشت طی ۴۸ ساعت

کاسپین استادیان[۱]، نسیم حیاتی رودباری[۱*]، زیبا ظهیری سروری[۲]، احمد حسینی[۳]

۱- گروه علوم شناختی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات بهداشت باروری، بیمارستان الزهرا (س)، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۳- مرکز تحقیقات باروری مهر، رشت، گیلان، ایران

*مسئول مکاتبات: nasimhayati@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۳

DOI: 10.60833/ascij.2024.1092476

چکیده

بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها روشیست که طی آن تخمک‌های نابالغ درمحیط کشت و در شرایط آزمایشگاهی بالغ می‌شوند. درنتیجه محیط کشت می‌تواند در نتیجه نهایی IVF تاثیرزیادی داشته باشد.دراین مطالعه به بررسی تاثیر شش دوز مختلف اگونیست هورمون گرالین GHRP-6 در محیط کشت سنتزی حاوی مایع توبولی سرم‌دار انسان (HTF+HSA) بر میزان بلوغ تخمک‌های نابالغ انسان (GV) طی ۲۴ و ۴۸ ساعت پرداخته شد. تخمک‌ها از زنان زیر ۳۵ سال مراجعه کننده به مرکز ناباروری مهررشت با دلیل ناباروری غیرزنانه جمع‌آوری شدند و تخمک‌های نابالغ، نامناسب جهت تزریق سیتوپلاسمی تخمک, به این طرح اهدا شدند. در هر ۶ گروه ازمایشی و کنترل تعداد ۳۰ تخمک نابالغ استفاده شد. ملاک بلوغ سلولی و پیشرفت میوز تشکیل جسم قطبی اول بعد از۲۴ و ۴۸ ساعت بود.برای بررسی سطح معنی‌داری اختلاف بین گروه‌ها از روش آماری ازمون دقیق فیشر استفاده شد. افزودن ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر از GHRP-6 به محیط کشت حاوی HTF سرم دارمنجر به بالغ شدن ۷۰ درصد از تخمک‌های نابالغ بعد از ۲۴ ساعت و۸۰ درصد بعد از ۴۸ ساعت در این گروه شد که این میزان درمقایسه با گروه‌های دیگر و گروه کنترل در ۲۴ ساعت معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) و در ۴۸ ساعت معنی‌دار نبود ($p > ۰/۰۵$). این در حالیست که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های ۵۰ نانوگرم/میلی‌لیتر و ۲۵ نانوگرم/میلی‌لیتر با گروه کنترل ملاحظه نشد.از طرف دیگرمشاهده شد افزایش دوز GHRP-6 در محیط کشت می‌تواند منجر به توقف رشد و مرگ سلول شود. نتایج نشان داد که اگونیست هورمون گرالین با غلظت ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر در محیط کشت مایع توبولی سرم دار انسان می‌تواند باعث افزایش سرعت فرایند میوز و تکوین بهتر تخمک‌ها شود.

کلمات کلیدی: تخمک نابالغ، تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم، بلوغ آزمایشگاهی، هورمون گرالین، GHRP-6.

مقدمه

بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) یک متد مناسب برای کمک به بیمارانیست که چالش‌های مختلفی را در باروری تجربه می‌کنند. یکی از مهمترین خصوصیات این روش استفاده حداقل از گنادوتروپین‌هاست. این خصوصیت ریسک سندرم تحریک بالای تخمدان (OHSS) را بسیار پایین آورده

و بسیار مناسب برای بیمارانی است که از سندرم تخمدان پلی‌کیستیک رنج می‌برند (۳). همچنین این روش نیاز به دنبال کردن پی در پی اندازه فولیکول‌های تخمدانی با روش اولتراسونوگرافی را ندارد (۱۳). از طرف یگر بیمارانی که نسبت به تاثیر گنادوتروپین‌ها مقاومت دارند و یا با تناقضات و مشکلاتی در تحریک تخمدانی مواجه هستند نیز می‌توانند از این روش سود ببرند (۱٤). از طرف دیگر بلوغ آزمایشگاه تخمک‌های نابالغ در حفظ باروری افراد نیز می‌تواند موثر عمل کند (۵، ۱٤). با این حال از ان جایی که درصد موفقیت IVM تخمک پایین است، میزان تخمک‌هایی که در محیط آزمایشگاه بالغ می‌شوند، میزان جنین بلاستوسیست حاصل از آنها و متعاقباً بارداری حاصل از این جنین‌ها در مقایسه با روش لقاح آزمایشگاهی مرسوم رضایت‌بخش نیست (۳). یکی از عوامل تاثیرگذار بر بلوغ آزمایشگاهی محیط کشت است از این‌رو بهینه ساختن سیستم کشت تخمک‌های نابالغ در بلوغ آزمایشگاهی و ساختن بهترین ترکیب بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۳). گرالین یک هورمون ۲۸ اسید امینه است که به طور عمده درسلول‌های معده انسان و جوندگان ترشح می‌شود. این هورمون جذب غذا و کنترل وزن بدن را به عهده دارد از این رو به ان هورمون گرسنگی گفته می‌شود (۲٤). گرالین در سال ۱۹۹۹ به عنوان یک لیگاند درون‌زا (endogenous) برای رسپتور تحریک کننده ترشح هورمون رشد (GHSR-1a) معرفی شد(۱۱).ژن گرالین یک پروتین اولیه را با ۱۱۷ اسید امینه که به ان پره پروگرالین گفته می‌شود می‌سازد که این پپتید اولیه تحت مراحل مختلف بلوغ و فعال سازی قرار گرفته (۱۲) و ابتدا به یک محصولی به نام پروگرالین شکسته می‌شود. در مرحله بعد پروگرالین در ناحیه c ترمینالش توسط آنزیم تبدیل کننده پرو هورمون ۳/۱ شکسته شده وپپتید بالغ گرالین را می‌سازد (۲۸). همچنین گرالین می‌تواند در ناحیه سوم سرین خود استیله شده و تبدیل به اسیل گرالین که فرم فعال گرالین بوده (۱، ۲۷) تبدیل شده و به گیرنده اختصاصی گرالین (GHSR-1a) در بافت‌ها متصل شود. این تغییرات توسط آنزیمی به نام گرالین–او–اسیل ترنسفراز (GOAT) که یک آنزیم حیاتی جهت فعال سازی گرالین می‌باشد کاتالیز می‌شود. بعد از ۲۰ سال مطالعه مشخص شد که گرالین نقش های زیادی دارد. mRNA و پپتید این هورمون در بافت های زیادی بیان می‌شود، مانند هیپوتالاموس و هیپوفیز (٤، ۲۵) بیضه‌ها (۱۵، ۲۵)، تخمدان‌ها (۹، ۲۵) و رحم (۱۸) همچنین در اسپرم (۱٦) تخمک، جنین و رویان (۷). اضافه کردن گرالین در کشت سلول‌های تکا و گرانولوزا باعث افزایش تقسیم سلولی و بیان پروتین در خوکچه شده است (۱۹). همچنین در کشت سلول‌های گرانولوزای مرغ با دوز های مختلف این هورمون نیز مشاهده شد که علاوه بر تاثیر مشابه با خوکچه، تعدیل‌کننده شاخص‌های اپوپتوزیس (caspas-3، bax، bcl-2، tunnel positive cells) نیز می‌باشد (۲۳). تزریق ٦ روزه گرالین به رت باعث کم شدن میانگین قطر تخمک و زونا پلوسیدا شد و همچنین یک سری تغییرات درون سلولی را باعث شد که نشان‌دهنده اپوپتوزیس و مرگ سلول بود (۱۰). مشابه این تحقیق روی ماهی انجام شد و نشان داد که قطر تخمک ماهی تزریق شده با گرالین کم می‌شود (۱۷). در حالی که بعضی نویسندگان این کم شدن قطر را نشانه کم شدن میزان بلوغ می‌دانند، بعضی دیگر به بلوغ تحریک شده فولیکول‌های تخمدانی مشکوک هستند (۱۷). در عین حال یکسری مشاهداتی عنوان شد که بر اساس آنها هیچ تغییری در هسته تخمک در رابطه با بلوغ در نتیجه تیمار با گرالین گزارش نشد (۲۰) .از طرف دیگر انکوبه کردن کمپلکس تخمک و کومولوس (COC) به مدت ۲٤

ساعت با دوز ۸۰۰ پیکوگرم در یک میلی‌لیتر باعث بلوغ پیشرفته تخمک‌ها شد (٦). در حالی که دوز ۲۰-۶۰ پیکومول باعث افزایش مرگ سلول‌های کومولوس، اپوپتوزیس و آسیب DNA شد (۲۰). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۲ روی تخمک‌های نابالغ گوسفند انجام گرفت دوز های مختف هورمون گرالین به محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها جهت پیدا کردن تاثیر احتمالی این هورمون روی بلوغ و تعین غلظت بهینه انجام شد، مشخص شد که گرالین روی بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها و میزان تشکیل بلاستوسیست تاثیر مثبت از خود نشان می‌دهد (۲٦).

ازمایشات بیشتری که غلظت بهینه گرالین را در محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ مشخص کند جهت تعیین نقش و تاثیر اندوژنوس گرالین مورد نیاز می‌باشد. نقش گرالین در تنظیمات سیستم تولید مثلی در بین موجودات مختلف متفاوت است (۲٦). علی‌رغم تحقیقات مختلف روی تاثیرات بیولوژیکی و آزمایشگاهی گرالین روی بلوغ تخمک‌های نابالغ موجودات مختلف، مطالعات کمی روی تخمک‌های نابالغ انسان انجام شده و تاثیرات این هورمون روی بلوغ این تخمک‌ها نامشخص می‌باشد. در این تحقیق به بررسی شش دوز مختلف اگونیست هورمون گرالین (GHRP-6) بر بلوغ تخمک‌های نابالغ انسان جهت تاثیر احتمالی و تعیین دوز بهینه ان پرداخته و با دو محیط کشتی که به طور معمول در ایران در مراحل مختلف لقاح آزمایشگاهی (IVF) استفاده می‌شود، مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

تخمک‌ها از زنان زیر ۳۵ سال مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری مهر رشت در استان گیلان که با دلایل ناباروری غیرزنانه طی عمل تخمک‌گیری با روش پانکچر جمع‌آوری شد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه ازاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران با شناسه IR.IAU.SRB.REC.1402.155 مصوب گردید. تمامی تخمک‌هایی که بالغ بودند جهت تزریق داخل سلولی اسپرم استفاده شدند و فقط تخمک‌هایی که از نظر مرحله سلولی عقب بوده (Germinal vesicule) وبرای تزریق داخل سلولی و تشکیل جنین مناسب نبودند به این طرح اهدا شدند. این تخمک‌ها به صورت معمول در مراکز درمان ناباروری از روند درمانی بیمار خارج شده و بلا استفاده می‌باشند.

جمع‌آوری تخمک: بیماران کاندید لقاح آزمایشگاهی (IVF) ابتدا تحت تحریک کنترل شده تخمدان‌ها قرار می‌گیرند و زمانی که حداقل ۳ فولیکول بالای ۱۲ میلی‌متر با دستگاه سونوگرافی دیده شد، HCG تزیق شده و ۳۸-۴۰ ساعت بعد از تزریق عمل تخمک‌گیری زیر سونوگرافی توسط سوزن پانکچر صورت گرفت و فولیکول‌های با قطر بالای ۱۲ میلیمتر ساکشن شدند. محتوی فولیکول حین عمل تخمک‌گیری به آزمایشگاه جنین شناسی انتقال داده شد.کمپلکس‌های تخمک و کومولوس (COC) زیر میکروسکوپ شناسایی و توسط پیپت پاستور شیشه‌ای جمع‌آوری و به محیط کشت انتقال داده شدند. محیط کشتی که جهت جمع‌آوری تخمک استفاده شد محیط کشت سنتزی توبولی انسان (HTF) (راون سازه/ایران) به علاوه آلبومین سرم انسان (HSA) (راون سازه/ایران) می‌باشد که از روز قبل این ترکیب به صورت قطرات ۲۵ میکرولیتری که با روغن امرسیون سبک(راون سازه/ایران)پوشیده شده، اماده شد و در انکوباتور CO_2 دار ۵ درصد قرار گرفت.

جداکردن تخمک از کمپلکس تخمک- کومولوس: پس از شستشوی کمپلکس‌های تخمک و کومولوس و زدودن خون از انها توسط عمل پیپتاژ در همان محیط کشت جمع‌آوری تخمک، آنها را به دیش

دیگری که محتوی همان محیط کشت بوده و به همان صورت اماده شده، جهت دنوده کردن و جداکردن اووسیت از کمپلکس تخمک کومولوس منتقل می‌شوند.پس از پیپتاژ کمپلکس به مدت ۳۰ ثانیه در آنزیم هیالورانیداز (شرکت راون سازان/ایران) تخمک‌ها از آنزیم خارج شده و طی پیپتاژ مکرر به صورت مکانیکی و بدون کمک آنزیم سلول‌های گرانولوزای باقیمانده و تاج شعاعی تخمک تا حد امکان زدوده می‌شود.

تفکیک تخمک‌ها از نظر مرحله سلولی: در مرحله بعد تخمک‌های آماده شده جهت شناسایی مرحله سلولیشان انالیز می‌شوند. تخمک‌های که در ابتدای مرحله متافاز میوز دو هستند جهت تزریق درون سلولی اسپرم و تشکیل جنین و تخمک‌هایی که در انتهای متافاز میوز اول هستند جهت بلوغ آزمایشگاهی و پس از ان تزریق درون سلولی و تشکیل جنین استفاده می‌شوند. تخمک‌های وزیکول جرمینال (GV)، آنهایی که در مرحله پروفاز میوز اول هستند روزانه جمع‌آوری شده و در ٦ گروه آزمایشی که حاوی غلظت‌های مختلف اگونیست هورمون گرالین (GHRP-6) (UK پپتید/انگلستان)، و یک گروه کنترل (9 CC HTF + 1CC HSA) تقسیم می‌شوند.

محیط کشت کنترل: محیط کشت سنتزی HTF حاوی مایع توبولی انسان بوده که بعد از اضافه شدن البومین سرم انسان، به صورت روتین برای جمع‌آوری کمپلکس‌های تخمک کومولوس و محیط کشت‌های آماده‌سازی تخمک جهت تزریق درون سلولی اسپرم و همچنین جهت کشت مراحل اولیه تکوین جنین تا ۳ روز بعد از تزریق اسپرم، (مرحله ۸ سلولی)، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

IVM: تخمک‌های نابالغ (GV) جمع‌آوری شده در هر روز ازمایش به صورت رندوم بین محیط‌های کشت آزمایشی و گروه کنترل تقسیم شدند. در طی ازمایش همیشه از GV تازه استفاده شد. درکل تعداد ۲۱۰ تخمک GV بین گروه‌ها تقسیم شدند. شش گروه ازمایشی شامل ٦ غلظت مختلف از GHRP-6 به ترتیب زیر بودند: ۰ (کنترل)، ۲۵، ۵۰ ، ۷۵ ، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر (۱، ۲).

غلظت‌های ازمایشی GHRP-6 به به محیط کشت HTF+10%HSA اضافه شد.سپس تعداد تخمک‌های متافاز ۲ بعد از ٢٤ و ٤٨ ساعت شمرده و گزارش شد. شاخص مرحله متافاز میوز ۲ ظهور اولین جسم قطبی و مشاهده آن زیر میکروسکوپ استریو بود.

تحلیل آماری: داده‌های طبقه‌بندی شده به صورت اعداد و درصد نشان داده شد. آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار SPSS انجام شد و معنی‌داری آماری با ازمون دقیق فیشر و به صورت $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

تغییرات تخمک‌ها بعد از ٢٤ ساعت: جدول ۱ مقایسه میزان تغییرات در تخمک‌های نابالغ انسان بعد از ٢٤ ساعت کشت در انکوباتور CO2 دار در گروه‌های آزمایشی و گروه کنترل نشان می‌دهد. بیشترین نسبت تخمک‌های بالغ (متافاز ۲) در مقایسه با گروه کنترل و بقیه گروه‌های ازمایشی در گروه ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر مشاهده شد. سطح معنی‌داری ازمون دقیق فیشر برای اثبات اختلاف بین غلظت ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر با گروه کنترل برابر با ۰/۰۲۰ بود ($p < ۰/۰۵$) که معنی‌دار بود. نمودار ۱ میزان رشد و بلوغ را در گروه‌های مورد بررسی و گروه‌های کنترل نشان می‌دهد.کمترین عدم پاسخ گویی به کشت نیز در گروه ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر دیده شد که تنها یک عدد از تخمک‌های نابالغ کشت داده شده بعد از ٢٤ ساعت بدون تغییر باقی ماند.

تغییرات تخمک‌ها بعد از ٤٨ ساعت: جدول ۲ میزان تغییرات تخمک‌ها را بعد از ٤٨ ساعت کشت در

محیط‌های کشت ازمایشی و محیط کشت کنترل نشان می‌دهد. در روز آخر کشت نشان داده شد که با افزایش غلظت GHRP-6 و افزایش ساعات کشت، مرگ سلول‌های تخمک اتفاق می‌افتد. ۱۰ درصد از تخمک‌های نابالغ در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر دژنره شده و از بین رفتند که این اتفاق در غلظت‌های دیگر و گروه کنترل دیده نشد.همچنان غلظت ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر میزان بلوغ بیشتری را نسب به غلظت‌های دیگر و گروه کنترل از خود نشان داد (۸۰ درصد). این میزان در گروه‌های ۲۵ و ۵۰ ٦٦ درصد و در گروه‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر به ترتیب ۵۳، ٤٠ و ٤٣ درصد بود. با وجود این که نسبت به ٢٤ ساعت اول در گروه‌های آزمایشی و کنترل تخمک‌های نابالغ کمتری دیده شد، کمترین میزان عدم رشد تخمک‌های نابالغ همچنان متعلق به گروه ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر بود. نتایج ازمون دقیق فیشر در مقایسه بین ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر و گروه کنترل بعد از ٤٨ ساعت نشان دهنده این است که اختلاف معنی‌داری بین این دوگروه وجود ندارد (p = ۰/۳۱۳). نمودار ۲ میزان رشد و بلوغ نهایی را در روز اخر کشت بیان می‌کند.

جدول ۱- آمار توصیفی رابطه تخمک در گروه مراحل بلوغ تخمک و گروه کنترل بعد از ٢٤ ساعت

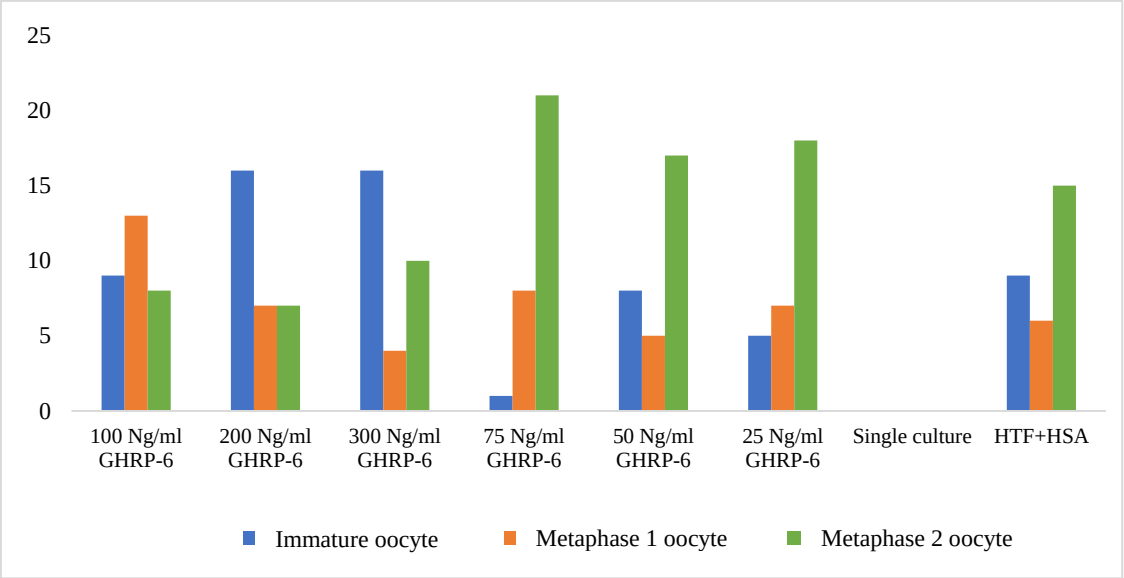
Table 1. Discriptive statistics of relation between oocyte in oocyte maturation stage group and control group after 24 hours. According to fisher test there is a significant difference between 75ng/ml and control group ($p < 0.05$)

Oocyte type	100 ng/ml GHRP-6	200 ng/ml GHRP-6	300 ng/ml GHRP-6	75 ng/ml GHRP-6	50 ng/ml GHRP-6	25 ng/ml GHRP-6	HTF+HSA
Immature Oocyte	9	16	16	1	8	5	9
	30.0%	53.3%	53.3%	3.3%	26.7%	16.7%	30.0%
Metaphase 1 Oocyte	13	7	4	8	5	7	6
	43.3%	23.3%	13.3%	26.7%	16.7%	23.3%	20.0%
Metaphase 2 Oocyte	8	7	10	21	17	18	15
	26.7%	23.3%	33.3%	70.0%	56.7%	60.0%	50.0%
Total	30	30	30	30	30	30	30
	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

جدول ۲- آمار توصیفی رابطه تخمک با گروه در مرحله بلوغ تخمک بعد از ٤٨ ساعت

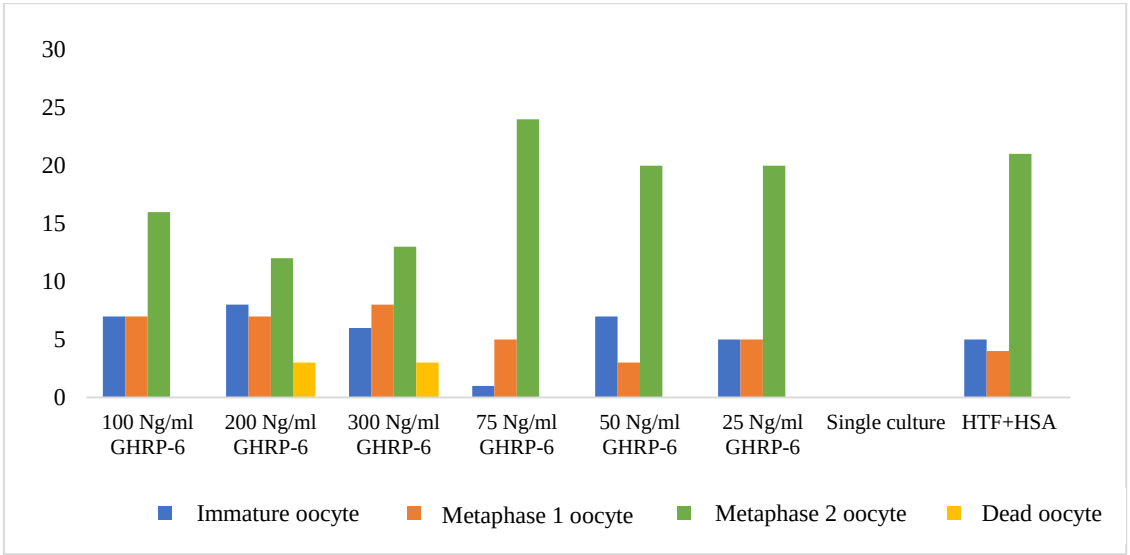
Table 2. Descriptive statistics of relations between oocyte and oocyte maturation stage group after 48 hours. According to fisher test there is no significant difference between 75ng/ml and control group.

Oocyte type	100 ng/ml GHRP-6	200 ng/ml GHRP-6	300 ng/ml GHRP-6	75 ng/ml GHRP-6	50 ng/ml GHRP-6	25 ng/ml GHRP-6	HTF+HSA
Immature Oocyte	7	8	6	1	7	5	5
	23.3%	26.7%	20.0%	3.3%	23.3%	16.7%	16.7%
Metaphase 1 Oocyte	7	7	8	5	3	5	4
	23.3%	23.3%	26.7%	16.7%	10.0%	16.7%	13.3%
Metaphase 2 Oocyte	16	12	13	24	20	20	21
	53.3%	40.0%	43.3%	80.0%	66.7%	66.7%	70.0%
Dead Oocyte	0	3	3	0	0	0	0
	0.0%	10/0%	10.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Total	30	30	30	30	30	30	30
	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%



نمودار ۱- تعداد تخمک‌های متافاز ۲ (رنگ سبز) به طور قابل توجهی در گروه ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر در مقایسه با بقیه گروه‌ها بیشتر است. تعداد تخمک‌های نابالغ نیز در این گروه به طور قابل توجهی بعد از ۲٤ ساعت کشت کمتر می‌باشد (رنگ آبی). بیشترین میزان تخمک نابالغ و بدون تغییر در گروه‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر بود. همچنین غلظت ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر میزان تخمک‌های متافاز یک بیشتری را نسبت به گروه کنترل نشان داده است (رنگ نارنجی). تخمک متافاز یک در غلظت ۱۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر در روز اول کشت بیشتر از گروه‌های دیگر بود.

Fig 1. The number of metaphase 2 oocytes (green color) is significantly higher in the 75 ng/ml group compared to the other groups. The number of immature oocytes in this group is significantly less after 24 hours of cultivation (blue color). The highest amount of immature and unchanged oocyte was in 200 and 300 ng/ml groups. Also, the concentration of 75 ng/ml has shown more metaphase one oocytes than the control group (orange color). Metaphase one oocytes with a concentration of 100 ng/ml on the first day of culture were more than other groups.



نمودار ۲- تعداد تخمک‌های متافاز ۲ (رنگ سبز) در گروه ۷۵ ng/ml نسبت به سایر گروه‌ها بالاتر و تعداد تخمک‌های بدون تغییر و نابالغ (رنگ آبی) نسبت به بقیه گروه‌ها و گروه کنترل در روز دوم کشت کمتر است. تخمک‌های مرده فقط در غلظت‌های بالا دیده شد (رنگ زرد).

Fig 2. The number of metaphase 2 oocytes (green color) in the 75 ng/ml group is higher than the other groups, and the number of unchanged and immature oocytes (blue color) is lower than the other groups and the control group on the second day of cultivation. Dead oocytes were seen only in the upper layers (yellow color).

بحث

باستفاده از روش کلینیکی IVM یا بلوغ آزمایشگاهی به دلیل نتایج ضعیفی که در بلوغ تخمک و متعاقبا باروری آن و در نهایت بارداری دارد، بسیار کم می‌باشد. ساختن یک سیستم کشت مناسب که درصد موفقیت بالایی داشته باشد و همچنین اضافه کردن مواد و تشکیل‌دهنده‌هایی که این موفقیت را بالا تر ببرد،اهمیت کلینیکی زیادی دارد. در این مطالعه به تاثیر احتمالی GHRP-6 (اگونیست هورمون گرالین) در بهبود بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ انسان طی ٤٨ ساعت پرداخته شد و غلظت بهینه ان در محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک، پیشنهاد داده شد. تا کنون تحقیقات زیادی روی تاثیر احتمالی هورمون گرالین بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ موجودات مختلف انجام شده. طی مطالعه‌ای که بیشتر اشاره شد، این هورمون در غلظت ۲۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر میزان بلوغ تخمک را در گوسفند طی ۲۲ ساعت کشت بالا برده و روی تشکیل جنین و تکوین اولیه آن تاثیر مثبت قابل توجهی دارد (٢٦). همین طور طی مطالعه‌ای که تاثیر این هورمون بر تخمک‌های نابالغ گاو بررسی میکرد ،مشخص شد که دوز ۸۰۰ پیکوگرم/میلی‌لیتر از گرالین باعث پیشبرد بلوغ تخمک شده و میزان تشکیل بلاستوسیست را بالا می‌برد (٦). در مطالعه حاضر طی بررسی ٦ دوز مختلف GHRP-6 در محیط کشت پایه نشان داده شد که تخمک‌های نابالغ کشت داده شده طی ٢٤ ساعت در غلظت ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر از این پپتید میزان بلوغ بیشتری داشتند. همچنین نشان داده شد که با بالا رفتن غلظت پپتید این میزان کمتر می‌شود.از ان جایی که هرچه کمتر قرار گرفتن تخمک بارور نشده در محیط کشت از اهمیت بالایی برخوردار است، جهت بررسی مقایسه ای بهتر این پپتید در بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ انسان، کشت را تا روز دوم بعد از تخمک‌گیری ادامه داده شد و نتیجه به این صورت بود که بلوغ تخمک‌ها در غلظت ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر سریعتر از گروه کنترل و دیگر غلظت‌های پایین این پپتید اتفاق می‌افتد. پیشتر وجود گیرنده گرالین (GHSR-1a) روی تخمک‌های گاو گزارش شده است (۲۱). همچنین در مقایسه‌ای که در سال ۲۰۰٦ بین گرالین و GHRP-6 روی سلول‌های گرانولوزای مرغ انجام شده بود، مشخص شد که این دو پپتید تاثیر یکسانی در میزان تکثیر سلولی، اپوپتوزیس و تحریک ترشحات دارند. نتیجه‌ای که در این تحقیق گرفته شد این بود که این دو پپتید به گیرنده یکسانی روی سلول‌ها (GHSR-1a) متصل می‌شوند (۲۲). دراین مطالعه میزان بلوغ در گروه کنترل برابر ۵۰ درصد بود که این میزان نزدیک به گزارشاتی است که در مطالعات اشاره شده است (۸). همچنین در بررسی حاضر مشخص شد که حضور GHRP-6 در غلظت ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر در محیط کشت پایه، در روز اول کشت، میزان ظهور جسم قطبی اول را تا ۷۰ درصد بالا می‌برد که مشابه میزان هورمون رشد با غلظت ۲۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر در محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک انسان بعد از ٢٤ ساعت است. همچنین هورمون رشد در غلظت عنوان شده تاثیر مثبت روی تشکیل 2PN و میزان تشکیل بلاستوسیست دارد (۱۳). این تشابه در میزان بلوغ بین این دو هورمون می‌تواند گواه تاثیر یکسان این دو روی بلوغ تخمک‌ها و شاید تشکیل 2PN و تکوین جنین از آنها باشد.

نتیجه‌گیری

نتیجه این که بالابودن درصد تخمک‌های متافاز یک و متافاز دو طی ٢٤ ساعت در غلظت‌های پایین این پپتید به خصوص ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر نشان دهنده

این است که این هورمون در سرعت بخشیدن به بلوغ هسته تاثیر گزار است. به طور کلی نشان داده شد که اگونیست هورمون گرالین (GHRP-6) با غلظت ۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر می‌تواند روی بلوغ تخمک‌های انسان که پاسخ ضعیفی به گنادوتروپین‌ها قبل از عمل تخمک‌گیری داده‌اند، در محیط کشت تاثیر مثبت داشته باشد.

منابع

1. Bednarek M.A., Feighner S.D., Pong S.S., McKee K.K., Hreniuk D.L., Silva M.V., Heck J.V. 2000. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(23):4370-4376.

2. Cekleniak N.A., Combelles C.M., Ganz D.A., Fung J., Albertini D.F., Racowsky C. 2001. A novel system for in vitro maturation of human oocytes. *Fertility and Sterility*, 75(6):1185-1193.

3. Chian R.C., Li J.H., Lim J.H., Yoshida H. 2023. IVM of human immature oocytes for infertility treatment and fertility preservation. *Reproductive Medicine and Biology*, 22(1):e12524.

4. Cowley M.A., Smith R.G., Diano S., Tschöp M., Pronchuk N., Grove K. L, Horvath T.L. 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 37(4):649-661.

5. De Vos M., Grynberg M., Ho T.M., Yuan Y., Albertini D.F., Gilchrist R.B. 2021. Perspectives on the development and future of oocyte IVM in clinical practice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(6):1265-1280.

6. Dovolou E., Messinis I. E., Periquesta E., Dafopoulos K., Gutierrez-Adan A., Amiridis G.S. 2014. Ghrelin accelerates in vitro maturation of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4):665-672.

7. Du C., Li H., Cao G., Wang X.C., Li C. 2010. Expression of the orexigenic peptide ghrelin and the type 1a growth hormone secretagogue receptor in sheep oocytes and pre-implantation embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(1):92-98.

8. Fesahat F., Dehghani Firouzabadi R., Faramarzi A., Khalili M.A. 2017. The effects of different types of media on in vitro maturation outcomes of human germinal vesicle oocytes retrieved in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 44(2):79-84.

9. Gaytan F., Barreiro M. L., Chopin L. K., Herington A.C., Morales C., Pinilla L. Tena-Sempere M. 2003. Immuno localization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(2):879-887.

10. Kheradmand A., Roshangar L., Taati M., Sirotkin A.V. 2009. Morphometrical and intracellular changes in rat ovaries following chronic administration of ghrelin. *Tissue Cell*, 41(5):311-317.

11. Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402(6762):656-660.

12. Kojima M., Kangawa K. 2005. Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews*, 85(2):495-522.

13. Li Y., Liu H., Yu Q., Liu H., Huang T., Zhao S., Zhao H. 2019. Growth Hormone Promotes in vitro Maturation of Human Oocytes. *Frontiers in Endocrinology*, 10:485.

14. Li Y., Pan P., Yuan P., Qiu Q., Yang D. 2016. Successful live birth in a woman with resistant ovary syndrome following in vitro maturation of oocytes. *Journal of Ovarian Research*, 9(1):54.

15. Lim C.T., Kola B., Grossman A., Korbonits M. 2011. The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues. *Endocrine Journal*, 58(8):707-710.

16. Łukaszyk A., Rafińska L., Sawiński P., Kasprzak A., Olejniczak K., Ruciński M., Sowiński J. 2009. Immunohistochemical and hybridocytochemical study on ghrelin signalling in the rat seminiferous epithelium. Folia *Histochemistry and Cytobiology*, 47(3):415-423.

17. Mabudi H., Jamili S., Majd N.E., Vosoughi G., Fatemi, M.R., Rashed S. 2011. The effects of ghrelin on ovary histology in Barbus sharpeyi. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95(5):599-602.

18. O'Brien M., Earley P., Morrison J.J., Smith T.J. 2010. Ghrelin in the human myometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(55):1-11.

19. Rak A., Gregoraszczuk E.L. 2008. Modulatory effect of ghrelin in prepubertal porcine ovarian follicles. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(4):781-793.

20. Sirini M.A., Anchordoquy J.M., Anchordoquy J.P., Pascua A.M., Nikoloff N., Carranza A, Furnus C.C. 2017. The presence of acylated ghrelin during in vitro maturation of bovine oocytes induces cumulus cell DNA damage and apoptosis, and impairs early embryo development. *Zygote*, 25(5):601-611.

21. Sirini M.A., Anchordoquy J.P., Quintana S., Furnus C., Relling A.E., Anchordoquy J.M. 2019. Expression of Ghrelin and Its Receptor mRNA in Bovine Oocyte and Cumulus Cells. *International Journal of Fertility and Sterility*, 12(4):335-338.

22. Sirotkin A.V., Grossmann R. 2008. Effects of ghrelin and its analogues on chicken ovarian granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 34(2):125-134.

23. Sirotkin A.V., Grossmann R., María-Peon M.T., Roa J., Tena-Sempere M., Klein S. 2006. Novel expression and functional role of ghrelin in chicken ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 257-258:15-25.

24. Stengel A., Taché Y. 2012. Ghrelin - a pleiotropic hormone secreted from endocrine x/a-like cells of the stomach. *Frontiers in Neuroscience*, 6(24):1-16.

25. Ueberberg B., Unger N., Saeger W., Mann K., Petersenn S. 2009. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Hormone and Metabolic Research*, 41(11):814-821.

26. Wang D., Yang Y., Song Y., Fu S., He X., Wang B, Cao G. 2022. The effect of ghrelin on the maturation of sheep oocytes and early embryonic development in vitro. *Animals*, 12(9):1158-1173.

27. Yang J., Brown M.S., Liang G., Grishin N., Goldstein J.L. 2008. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*, 132(3):387-396.

28. Zhu X., Cao Y., Voogd K., Steiner D.F. 2006. On the processing of proghrelin to ghrelin. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50):38867-38870.