مقاله پژوهشی

مقایسه کشت ۲۴ و ۴۸ ساعت بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک با استفاده از سکرتوم سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی در تخمدان پلی‌کیستیک

هیلدا رستگاری[۱]، نسیم حیاتی رودباری[۱*]، سمیه کاظم‌نژاد[۲]، سهیلا انصاری‌پور[۲]

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

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی، ابن سینا، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: hayati@srbiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۲

DOI: 10.22034/ascij.2023.1995987.1533

چکیده

کاربرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی روشی نوین درپزشکی بازساختی و ناباروری می‌باشد. اخیرا غنی سازی بوسیله سکرتوم حاصل از این سلول‌ها، همچنین زمان بهینه جهت کشت، در راستای بهبود نتایج بلوغ ازمایشگاهی تخمک (IVM) بویژه در زنان دارای تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه مقایسه اثر زمان‌های کشت ۲۴ و ۴۸ ساعت بر IVM با استفاده از سکرتوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی (MenSCs) همراه با مایع فولیکولی و ملاتونین در زنان PCOS می‌باشد. ۴۰۰ تخمک نابالغ ژرمینال وزیکول از ۱۰۰ بیمار PCOS، بعنوان بهترین کاندید جهت انجام IVM، جمع‌آوری و به طور تصادفی در چهار گروه کنترل، سکروتوم، مایع فولیکولی و ملاتونین تقسیم شدند. بلوغ تخمک در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تاثیر سن بیماران بر نتیجه مطالعه در رده‌های سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ سال در هر دو بازه زمانی مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بلوغ تخمک در زمان ۲۴ ساعت در گروه غنی شده با سکرتوم نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < ۰/۰۵$). همچنین در ۴۸ ساعت افزایش بلوغ تخمک در گروه غنی شده با ملاتونین، بعنوان یک آنتی‌اکسیدانت موثر، نسبت به کنترل معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۰۱$). یعلاوه طبق یافته‌های این پژوهش سن خانم تاثیر قابل توجهی در میزان بلوغ تخمک در کشت ۲۴ ساعت نداشت در حالیکه در ۴۸ ساعت در گروه سنی جوان‌تر میزان بلوغ تخمک در گروه سکرتوم و گروه ملاوتونین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. در نتیجه زمان کشت ۲۴ ساعت بهمراه محیط IVM غنی شده توسط سکرتوم زمانی بهینه در راستای افزایش بلوغ تخمک در زنان PCOS می‌باشد. همچنین استفاده از ملاتونین استراتژی موثری برای بهبود بلوغ تخمک در زمان‌های کشت طولانی‌تر به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: سکرتوم، سلول‌های بنیادی خون قاعدگی، بلوغ آزمایشگاهی تخمک، ملاتونین، مایع فولیکولی، تخمدان پلی‌کیستیک.

مقدمه

یکی از تکنیک‌های کمک‌باروری بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) می‌باشد که نیاز به استفاده از تحریک کنترل شده تخمک‌گذاری را برای انجام لقاح آزمایشگاهی (IVF) مرتفع می‌سازد. زنان درگیر تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) همواره چالشی پیش روی پزشکان حوزه ناباروری قرار می‌دهند. این افراد که پاسخ‌های گوناگونی به تحریک گنادوتروپینی داده و درمعرض خطر سندرم تحریک بیش از حد تخمدان

(OHSS) می‌باشند، بواسطه تعداد تخمک‌های زیاد و نابالغ بهترین کاندید IVM در تحقیقات محسوب می‌شوند (۱۷، ۱۹). جهت افزایش شایستگی تخمک‌های بالغ شده حاصل از IVM سیستم‌های کشت مناسب مورد نیاز است که حمایت کننده بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک‌ها باشد (۹). تاکنون محیط‌های کشت حاوی مواد مختلف در مطالعات انسانی و حیوانی مورد بررسی قرار گرفته است که از جمله آن می‌توان به ترکیباتی همچون فاکتورهای رشد و هورمون‌های مختلف اشاره کرد. با ظهور پزشکی بازساختی و استفاده از سلول‌های بنیادی و کشف اثرات مفید ترکیبات مترشحه از آنها، محققان اثر انواعی از این محیط‌ها همچون محیط کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان و جنینی و بند ناف را بعنوان غنی کننده بر بلوغ ازمایشگاهی تخمک مورد بررسی قرار دادند که نتایج رضایت‌بخشی درافزایش میزان بلوغ تخمک، لقاح و تشکیل جنین حاصل شد (۲، ۸، ۱۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمی علاوه بر خاصیت خودنوزایی و ویژگی‌های تکثیری و تمایزی ویژه می‌توانند انواعی از فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و ترکیبات فعال بیولوژیکی را تولید کنند و بواسطه اثرات پاراکراینی بلوغ ازمایشگاهی تخمک را بهبود ببخشند. یکی از منابع سلول‌های بنیادی که اخیرا بخصوص در پزشکی بازساختی بسیار مورد توجه قرار گرفته است سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی (MenSCs) می‌باشد که علاوه بر خواص ذکر شده به علت روش جمع اوری اسان و غیرتهاجمی یکی از منابع سلولی پیشرو محسوب شده و در درمان بسیاری از بیماری‌ها اثرات مثبت قابل توجهی نشان داده است (۳). همچنین اثر استفاده از ترکیبات مغذی همچون مایع فولیکولی نیز بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک مورد بررسی قرار گرفته است (۱٤). از آنجایی که محیط کشت تخمک و نیز مدت زمانی که تخمک در ان قرار داده می‌شود سبب تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود ایده افزودن آنتی‌اکسیدانت‌ها در راستای رسیدن به محیطی مناسب‌تر جهت کشت تخمک توسط عده‌ای از محققین به بوته ازمایش گذاشته شد. نیکمرد و همکاران و Li و همکاران در۲۰۱٦ و ۲۰۱۷ اثر افزودن ملاتونین با غلظت‌های مختلف به محیط بلوغ تخمک به ترتیب در مدل‌های موشی PCO و انسان را مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که برخی غلظت‌های استفاده شده از ملاتونین پتانسیل القای بلوغ هسته‌ای و تضمین لقاح را دارد (۱۰، ۱٦).

از دیگر فاکتورهای موثر در میزان موفقیت در بلوغ ازمایشگاهی تخمک فاکتور زمان می‌باشد. در یک سری از مطالعات زمان ۲٤ ساعت برای بلوغ تخمک گزارش شده اما اغلب مطالعات اظهار میکنند که نتایج در کشت ٤۸ ساعته قابل قبول تر خواهد بود (۱۳).

هدف از تحقیق حاضر بررسی افزایش تدریجی میزان بلوغ تخمک با تلفیق محیط کشت سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی و مایع فولیکولی و ملاتونین در زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت در بیماران PCOSمی‌باشد. همچنین با توجه به بازه سنی انتخاب شده میزان اثر بخش این روش‌ها در دو گروه سنی زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی بر روی ۱۰۰ بیمار زن ۲۰ تا ٤۰ ساله مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) از مرکز ناباروری ابن سینا (تهران، ایران) طی یک سال انجام شد. تشخیص سندرم تخمدان پلی‌کیستیک بر اساس معیارهای انجمن تولیدمثل انسان و جنین-شناسی اروپایی روتردام/انجمن پزشکی تولیدمثل آمریکا در سال ۲۰۰۳ (تخمدان پلی‌کیستیک، اولیگو- یا عدم تخمک‌گذاری و شواهد بالینی یا بیوشیمیایی

هیپرآندروژنیسم) بود. معیارهای واجد شرایط بودن زنان PCOS با سن کمتر از ٤٠ ≤ سال، حداقل چهار تخمک ژرمینال وزیکول (GV) و سطح هورمون آنتی-مولرین (AMH) بالاتر از ۱.۳ نانوگرم در میلی‌لیتر بود. معیارهای خروج شامل اندومتریوز، کروموزوم-های غیرطبیعی، پاسخ ضعیف تخمدانی، عدم تخمک-گذاری و بیماری مزمن عفونی بود. ساخت سلول با تایید سازمان غذا و داروی ایران در STERCO (ایران، تهران) در اتاق تمیز GMP تکمیل شد. همه شرکت-کنندگان قبل از شروع مطالعه پس از توضیح دقیق شرایط، رضایت کتبی آگاهانه ارائه کردند. همه شرکت‌کنندگان پروتکل تحریک تخمدان مشابهی را با محرک آگونیست دریافت کردند (واریوپپتیل ۰/۱ ، ایران). پس از تحریک هورمونی، تخمک‌های بالغ متافاز دو و نابالغ متافاز یک و (GV) که از طریق عمل تخمک‌گیری حاصل شدند بررسی شده. تخمک‌های بالغ برای سیکل درمانی بیماران استفاده شدند. تخمک‌های نابالغ که کیفیت قابل قبولی داشتند بصورت مضربی از چهار برای توزیع بین گروه‌های آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند و حداقل ٤ تخمک (GV) از هر بیمار بطور تصادفی به چهار گروه IVM اختصاص داده شدند. سپس درصد تخمک‌های بالغ بین گروه‌های IVM در دو زمان ٢٤ و ٤٨ ساعت مقایسه شد. طراحی مطالعه در شکل ۱ به تصویر کشیده شده است (شکل ۱).

تهیه سکرتوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی: سلول‌های بنیادی خون قاعدگی طبق روش مورد استفاده توسط ظفردوست و همکاران در سال ۲۰۲۰ کشت داده شدند (۲۲). این سلول‌ها از بانک سلولی که ازخون قاعدگی حداقل ۵ زن سالم جمع‌آوری شده و از نظرعدم الودگی باکتریایی و قارچی مورد تایید بود، تهیه شدند. سکرتوم سلولی طبق پروتکل قبلی ما تهیه شد (۵). سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی که فریز شده بودند ذوب شده و کشت داده شدند تا به غلظت ۷۰ درصد در محیط (DMEM-F12) حاوی Dulbecco's platelet lysate برسند (شکل ۲) . محیط اضافی دور ریخته شده و سلول‌ها در محیط (DMEM-F12) فاقد فنول در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ٤٨ تا ٧٢ ساعت انکوبه شدند. پس از آن، مایع رویی قبل از سانتریفیوژ شدن با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، از طریق فیلتر سرنگ ۰/۲ میکرومتری فیلتر شد. سپس، مایع رویی برای به دست آوردن بخش محلول آسپیره شد ودر میکروتیوب‌های ۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی و ذخیره شد.

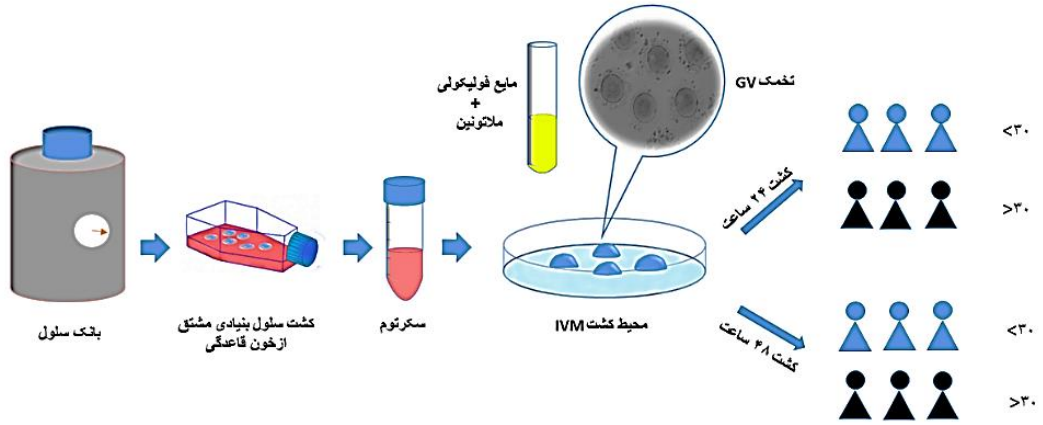
آماده‌سازی مایع فولیکولی: نمونه‌های مایع فولیکولی (FF) از ده خانم زیر ۳۵ سال سالم و بدون سندرم تخمدان پلی‌کیستیک یا ناباروری با عامل زنانه که وارد سیکل IVF شده بودند جمع‌آوری شد. FF در ۱۰۰۰× گرم و٤ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی در یک لوله تمیز و جدید جمع‌آوری شد و از طریق فیلترهای۰/۲۲ میکرومتر (فیلتر سرنگ محلول غشایی، ایالات متحده آمریکا) فیلتر شد. سپس FF جدا شد و در −۲۰ درجه سانتیگراد برای استفاده بعدی نگهداری شد.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM): ٣٦ تا ٣٨ ساعت پس از تحریک، فولیکول‌ها تحت هدایت سونوگرافی خارج شدند. پس از آن برای برهنه کردن تخمک‌ها آنزیم هیالورونیداز ۸۰ U/ML (SAGE، Copper Surgical، آمریکا) به مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد. سپس تخمک‌های آماده شده برای بررسی بیشتر به یک ظرف حاوی محیط کشت پایه آزمایشگاه که در شرایط عادی بعنوان محیط کشت بلوغ تخمک استفاده می‌شود (CLEAV، ORIGIO، دانمارک) منتقل شدند. مرحله بلوغ میوزی هر تخمک GV، MI یا MII در زیر میکروسکوپ مشخص شد. تخمک‌های GV

نامناسب از نظر شکل و کیفیت از مطالعه خارج شدند. تخمک‌های GV تازه به‌دست‌آمده که کیفیت قابل قبولی داشتند به‌طور تصادفی به چهار گروه مداخله مجزا تقسیم شدند: ۱- ۴۰ درصد سکرتوم +۶۰ درصد محیط کلیو (گروه سکرتوم)، ۲- ۴۰ درصد سکرتوم + ۵۰ درصد محیط کلیو + ۱۰ درصد مایع فولیکولی(گروه مایع فولیکولی)، ۳- ۴۰ درصد سکرتوم +۵۰ درصد محیط کلیوحاوی ملاتونین با غلظت 10^{-8} + ۱۰ درصد مایع فولیکولی (گروه ملاتونین) و ۴- گروه کنترل (محیط کلیو که محیط روتین و پایه آزمایشگاه برای کشت و بلوغ تخمک می‌باشد). غلظت‌های انتخابی جهت سکرتوم، مایع فولیکولی و ملاتونین بر اساس نتایج رضایتبخش حاصل از مطالعات صورت گرفت (۸، ۱۰، ۱۴).

کشت تخمک‌ها در شرایط ۶ درصد CO2 و (۲۰ درصد اکسیژن) در یک محیط مرطوب برای دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. ظهور گویچه قطبی که نشان‌دهنده بلوغ هسته‌ای تخمک و مرحله متافاز دو می‌باشد، پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از طریق استریومیکروسکوپ (Nikon، SMZ800N، ژاپن) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مقایسه نتایج بر اساس سن شرکت‌کننده‌ها در رده‌های سنی زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال در هر دو بازه زمانی ذکر شده انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: با استفاده از SPSS نسخه ۱۸ و رسم نمودارها بوسیله نرم‌افزار Graphpad PRISM 9.4.1 انجام شد.



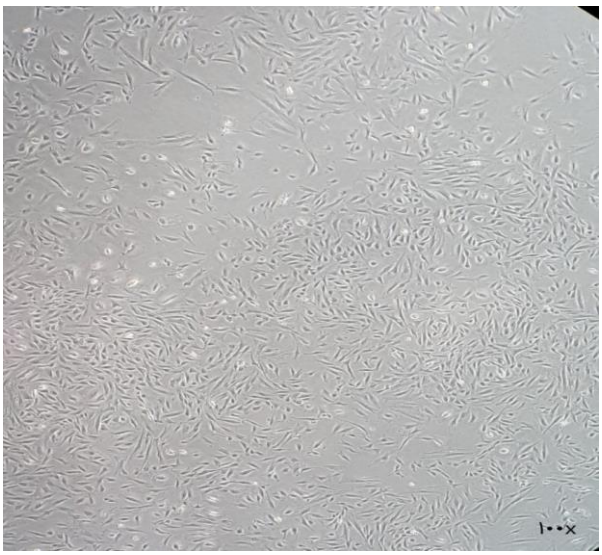
شکل ۱- طراحی مطالعه. سلول‌ها از بانک سلول بنیادی تهیه شدند. پس از کشت سلول و جداسازی سکرتوم سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی، افزودن ترکیبات مغذی از جمله سکرتوم، مایع فولیکولی و ملاتونین به محیط بلوغ آزمایشگاهی تخمک صورت گرفته و با کشت در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان بلوغ تخمک در سنین مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

نتایج میزان بلوغ تخمک در گروه‌های مداخله: همانطور که در جدول ۱ و نمودار ۱ نشان داده شده است، در هر سه گروه مداخله در مقایسه با گروه کنترل، میزان بلوغ تخمک بعد از۲۴ ساعت بهبود یافت. اما این تفاوت تنها در گروه تحت درمان با سکرتوم سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (۵۱ درصد در مقابل ۳۶ درصد، $p = ۰/۰۳$)، میزان بلوغ تخم در گروه ملاتونین ۴۹ درصد بود که در مقایسه با گروه کنترل نزدیک به معنی‌داری بود ($p =۰/۰۶$) و درگروه مایع فولیکولی ۴۶ درصد بود که در مقایسه باکنترل معنی-دار نبود ($p = ۰/۱۵$). علیرغم بهبود در تمامی

گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری در میزان بلوغ در بین گروه‌های مداخله بصورت مقایسه دو به دو مشاهده نشد. در بازه زمانی ٤٨ ساعت میزان بلوغ تخمک در گروه ملاتونین بیشترین تفاوت را نسبت به کنترل نشان داد (p ۰/۰۰٤ =) در حالیکه در دو گروه مداخله دیگر یعنی سکرتوم و گروه مایع فولیکولی بهمراه سکرتوم تفاوت معنی‌داری نسبت به کنترل وجود نداشت، به ترتیب (p = ۰/۷۹) و (p = ۰/۱۰) (جدول۱).

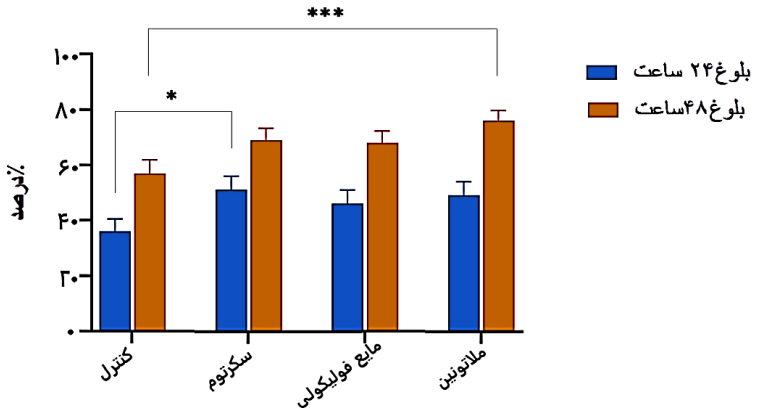
نتایج مقایسه بلوغ تخمک در گروه‌هایی سنی زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال در زمان های ٢٤ و ٤٨ ساعت: در گروه سنی بین ۲۰ تا ۲۹ سال در هیچکدام از گروه‌های مداخله نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (p= ۰/٦۰). همچنین بین هیچکدام از گروه‌ها در مقایسه دو به دو نیز تفاوت معنی‌دارنبود. همچنین نتایج مشابهی در گروه سنی بالای ۳۰ سال مشاهده شد (p = ۰/۲۲). اما در بازه زمانی ٤٨ ساعته برای افراد زیر ۳۰ سال در گروه حاوی سکرتوم و ملاتونین میزان بلوغ تخمک نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان داد (p = ۰/۰۱) در حالیکه برای زنان بالای ۳۰ سال در این بازه زمانی از نظر میزان بلوغ تخمک بین گروه‌ها و در مقایسه با کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (p =۰/۸۰)(نمودارهای ۲ و ۳).



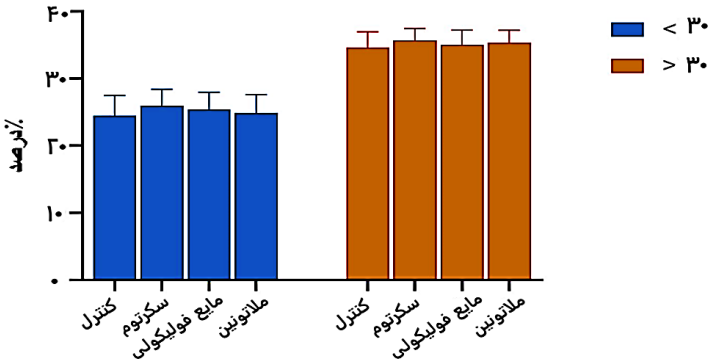
شکل ۲- مورفولوژی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی پس از پاساژ و رسیدن به غلظت مناسب (۱۰۰ ×).

جدول ۱- مقایسه میزان بلوغ تخمک پس از ٢٤ و ٤٨ ساعت در در گروه‌های مداخله حاوی محیط کشت غنی شده و مقایسه با گروه کنترل حاوی محیط روتین ازمایشگاه.

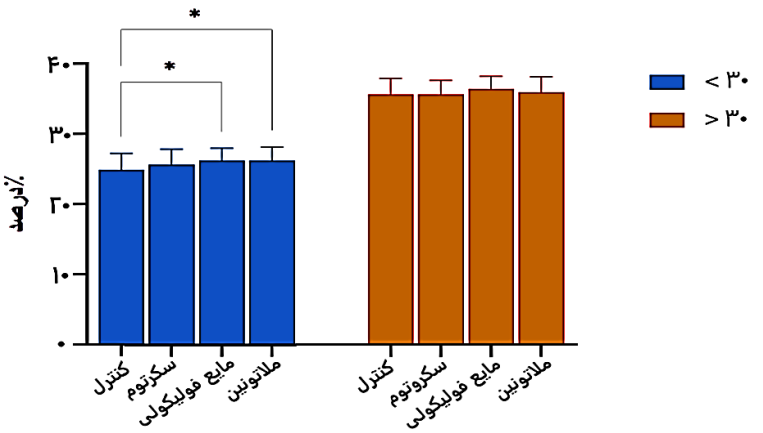
گروه ملاتونین (ملاتونین، مایع فولیکولی و سکرتوم)	گروه مایع فولیکولی (مایع فولیکولی و سکرتوم)	گروه سکرتوم	گروه کنترل	گروه‌ها
n =۱۰۰	n =۱۰۰	n =۱۰۰	n = ۱۰۰	تعداد تخمک
٤٩ (p= ۰/۰٦۳ vs. C)	٤٦ (p= ۰/۱۵۱ vs. C)	۵۱ (p= ۰/۰۳۲ vs. C)	۳٦	میزان بلوغ در ٢٤ ساعت (درصد)
٧٦ (p=۰/۰۰٤ vs. C)	٦٨ (p= ۰/۱۰۸ vs. C)	٦٩ (p=۰/۷۹ vs. C)	۵۷	میزان بلوغ در ٤٨ ساعت (درصد)



نمودار ۱- مقایسه میزان بلوغ آزمایشگاهی تخمک در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت در گروه‌های مورد آزمایش و مقایسه با گروه کنترل (* $p < ۰/۰۵$، ** $p < ۰/۰۱$، *** $p < ۰/۰۰۱$).



نمودار ۲- مقایسه میزان بلوغ تخمک در زنان زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال در بازه زمانی ۲۴ ساعت کشت در گروه‌های مورد آزمایش و مقایسه با گروه کنترل (* $p < ۰/۰۵$، ** $p < ۰/۰۱$، *** $p < ۰/۰۰۱$).



نمودار ۳- مقایسه میزان بلوغ تخمک در زنان زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال در بازه زمانی ۴۸ ساعت کشت در گروه‌های مورد آزمایش و مقایسه با گروه کنترل (* $p < ۰/۰۵$).

بحث

بلوغ آزمایشگاهی تخمک یکی از روش‌های کمک باروری با تاریخچه طولانیست که بعنوان روشی ایمن و آسان بویژه برای حفظ باروری در زنان شناخته می‌شود (۲۰). علیرغم استفاده از ترکیبات مختلف هنوز نقطه عطفی برای بهبود کیفیت تخمک با بهبود محیط کشت ایجاد نشده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر تلفیقی ترکیبات مغذی بر بلوغ آزمایشکاهی تخمک در زمان و بازه های سنی متفاوت بود. یافته ای ما نشان داد که غنی سازی محیط کشت با سکرتوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی بعنوان یک منبع سلولی نوین و ملاتونین باعث افزایش میزان بلوغ تخمک‌های ژرمینال وزیکول به متافاز دو در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک می‌شود. در بخش اول مطالعه ما، تفاوت معنی‌داری بین تخمک‌های تیمار شده با سکرتوم سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی نسبت به گروه کنترل در کشت ۲٤ ساعت به دست آمد. برخی مطالعات حاکی از آن است که غنی سازی کشت IVM با محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی می تواند میزان بلوغ تخمک را بهبود بخشد (۱، ٦، ۸). با این حال، مطالعه ما اولین مورد ارزیابی اثر تقویت محیط IVM با سکرتوم مشتق شده از سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی است. مکانیسم اساسی برای این بهبود ممکن است به غنی‌سازی محیط با سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد ترشح شده ازاین سلول‌ها مانند فاکتور رشد فیبروبلاست FGF2 ، EGF ، IL8 و IL-4 و GDNF نسبت داده شود که نقش مهمی در عملکرد تخمدان و بلوغ تخمک دارند (۳، ۱۸). در سایر گروه‌های مورد آزمایش از جمله گروه حاوی مایع فولیکولی با وجود افزایش میزان بلوغ در زمان ۲٤ ساعت نتایج معنا داری در مقایسه با گروه کنترل حاصل نشد که این موضوع می‌تواند به علت اثرات مهار کنندگی انواعی از فاکتور های رشد موجود در مایع فولیکولی بر ترکیبات موجود در سکرتوم باشد که همسو با نتایج حاصل از مطالعه ای مشابه با استفاده از٤۰ ٪ مایع فولیکولی زنان غیر PCO در محیط کشت می‌باشد(٤). اما داده های حاصل از کشت ٤۸ ساعته نشان داد که غنی‌سازی محیط با سکرتوم و مایع فولیکولی در میزان بلوغ تخمک در این بازه زمانی تفاوت قابل توجهی نسبت به گروه کنترل نشان نمیدهد و تنها درگروه ملاتونین میزان بلوغ تخمک تفاوت معنی‌داری نسبت به کنترل دارد. در راستای این افزایش می‌توان به این نکته اشاره کرد که افزایش زمان کشت باعث افزایش سن تخمک و میزان استرس اکسیداتیو، کاهش کیفیت تخمک و متعاقبا ایجاد انوپلوییدی می‌شود و گرچه با افزایش زمان کشت ممکن است تخمک‌های بالغ بیشتری حاصل شود اما این تغییرات اپی‌ژنتیکی از طریق این گامت‌ها بواسطه روش‌های کمک باروری به نسل بعدی منتقل و باعث مشکلات سلامتی می-گردد (۷، ۱۲).

افزودن ملاتونین با ایفای نقش حذف کننده ROSها بویژه با طولانی تر شدن مدت زمان کشت، تأثیر مفیدی بر میزان بلوغ تخمک دارد چنانکه مطالعات پیشین نشان داده اند که ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان با اثرات ضد آپوپتوز به محیط IVM حاوی LH و FSH می‌تواند میزان بلوغ و کیفیت جنین را در زمان و غلظت متفاوت بین ۱۰$^{-۵}$ تا ۱۰ $^{-۹}$مولار بهبود بخشد (۱۱، ۱٦).

اغلب مطالعات در سنین زیر ٤۰ و بالای ۲۰ سال انجام شده اما ما بازه‌ای گسترده‌تر بین ۲۰ تا ٤۰ را مورد بررسی قرار داده و با دسته‌بندی به دو گروه تا ۳۰ و بالای ۳۰ سال ارتباط میزان بلوغ و سن در

محیط‌های کشت مورد استفاده را مورد ارزیابی قرار دادیم. بر اساس مطالعات پیشین اینطور استنباط که در زنان بالای ۳۰ سال بلوغ تخمک کاهش می‌یابد اما در بررسی دیگر در ۲۰۲۱ در زنانی با متوسط سن ۳۱.۸ سال زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت برای کشت تخمک بررسی شد و میزان بلوغ در ٤۸ ساعت ۱۰ درصد بیشتر بود و فاکتورهایی همچون سن بیمار و سطوح هورمونی بر بلوغ ۲٤ ساعته اثری نداشت که نتایج مطالعه ما نیز با این یافته همسو بود و نشان داد در گروه سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ و در بازه زمانی ۲٤ ساعت تفاوت معنی‌داری در میزان بلوغ تخمک وجود نداشت و این یافته می‌تواند با کاهش کیفیت تخمک در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با زنان نرمال مرتبط باشد (۲۰، ۲۱).

نتایج مربوط به بازه ٤۸ ساعت نشان داد که در افراد زیر ۳۰ سال در محیط غنی شده با مایع فولیکولی و ملاتونین میزان بلوغ تخمک در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌داری داشته است. در نتیجه غنی‌سازی محیط کشت با مواد مغذی وملاتونین قطعا اثرات ناشی از استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد و این احتمال وجود دارد که پایینتر بودن سن بیمار تاثیرات منفی ناشی از طولانی شدن زمان کشت را جبران کرده است. بنابراین اگرچه ارزیابی نسبت‌های مختلف از ترکیبات مغذی ذکر شده برای تعیین فرمولی موثرمورد نیاز است، به نظر میرسد ترکیبی ازسکروتوم سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی و ملاتونین بیشترین تاثیر را بر بلوغ تخمک در بیماران PCOS داشته باشد . در برخی از مطالعات زمان ۲٤ ساعت برای بلوغ تخمک‌ها مناسب گزارش شده و برخی دیگر زمان های ۲٤ تا ۳۰ و یا ۳٦ ساعت را در تخمک‌های انسانی پیشنهاد کرده‌اند اما اغلب مطالعات اظهار می‌کنند که زمان مناسب برای بلوغ کامل تخمک ٤۸ ساعت می‌باشد که پیشتر به تبعات منفی ان اشاره شد (۱۳). اما بر اساس نتایج ما بهترین زمان برای بلوغ ازمایشگاهی تخمک باید بازه ای ما بین دو زمان بررسی شده در نظر گرفته شود تا نه تنها تخمک از نظر بلوغ هسته‌ای به مرحله قابل قبولی برسد بلکه از نظر سیتو پلاسمی نیز بالغ شود در حالیکه از پیر شدن تخمک و اثرات منفی طولانی شدن زمان کشت نیز جلوگیری شود. عدم بررسی مایع فولیکولی یا ملاتونین بطور مجزا به دلیل عدم دسترسی به تخمک کافی ناشی از استفاده از مدل انسانی می تواند به عنوان یک محدودیت در این مطالعه در نظر گرفته شود که علی‌رغم آن، نتایج امیدوارکننده این رویکرد جدید در راستای یافتن ترکیبی موثر برای محیط IVM در بیماران PCOS الهام‌بخش است. قابل توجه است که مطالعات آینده توسط گروه ما برای ارزیابی جنین-های حاصل از این روش و نیز بلاستوسیست‌های توسعه یافته با استفاده از توالی‌یابی نسل بعدی (NGS) و متابولومیکس تعریف شده است.

نتیجه‌گیری

بطور خلاصه غنی‌سازی محیط IVM با سکرتوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی انسان، مایع فولیکولی و ملاتونین در بازه زمانی مناسب به طور قابل توجهی بلوغ تخمک‌های نابالغ را در زنان PCOS بهبود می-بخشد که نشان‌دهنده برداشتن گامی رو به جلو در راستای ایجاد روش‌های آسان و کم هزینه درحوزه IVF است که نه تنها برای PCOS بلکه برای زنان غیر PCOS نیز قابل تعمیم می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکترا می‌باشد که در کمیته اخلاق پژوهشی پژوهشکده ابن سینا، مرکز آموزشی،

فرهنگی و پژوهشی دانشگاهی (ACECR، تهران، ایران) با کد IR.ACECR.AVICENNA.REC.1400.013 به ثبت رسید. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از تمامی افرادی که در به انجام رسیدن این تحقیق سهمی داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Akbari H., Eftekhar Vaghefi S.H., Shahedi A., Habibzadeh V., Mirshekari T. R., Ganjizadegan A., Mollaei H., Ahmadi M., Nematollahi-Mahani S.N. 2017. Mesenchymal stem cell-conditioned medium modulates apoptotic and stress-related gene expression, ameliorates maturation and allows for the development of immature human oocytes after artificial activation. *Genes*, 8(12):371.

2. Akbari H., Vaghefi S.H.E., Shahedi A., Habibzadeh V., Mirshekari T.R., Shekari M.A., Nejatbakhsh R. 2018. Conditioned mediums and human oocytes in vitro maturation. *International Journal of Pharmaceutical* and Phytopharmacological *Research (eIJPPR)*, 8(2):64-71.

3. Chen L., Qu J., Xiang C. 2019. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1):1-10.

4. Doroudi R., Changizi Z., Nematollahi-Mahani S.N. 2021. Effects of melatonin and human follicular fluid supplementation of in vitro maturation medium on mouse vitrified germinal vesicle oocytes: A laboratory study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 19(10):889.

5. Fathi-Kazerooni M., Fattah-Ghazi S., Darzi M., Makarem J., Nasiri R., Salahshour F., Dehghan-Manshadi S.A., Kazemnejad S. 2022. Safety and efficacy study of allogeneic human menstrual blood stromal cells secretome to treat severe COVID-19 patients: clinical trial phase I & II. *Stem Cell Research and Therapy*, 13(1):96.

6. Haryadi D., Sadewa A.H., Mubarika S., Dasuki D. 2019. The potential application of conditioned media-mesenchymal stem cells on human oocyte maturation in assisted reproductive technology: a quasi-experimental based-study at Dr. Sardjito General Hospital, Yogyakarta, Indonesia. *Bali Medical Journal*, 8(3):741-748.

7. Heinzmann J., Mattern F., Aldag P., Bernal-Ulloa S.M., Schneider T., Haaf T., Niemann H. 2015. Extended in vitro maturation affects gene expression and DNA methylation in bovine oocytes. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 21(10):770-782.

8. Jafarzadeh H., Nazarian H., Ghaffari Novin M., Shams Mofarahe Z., Eini F., Piryaei A. 2018. Improvement of oocyte in vitro maturation from mice with polycystic ovary syndrome by human mesenchymal stromal cell–conditioned media. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(12):10365-10375.

9. La X., Zhao J., Wang Z. 2019. Clinical Application of In Vitro Maturation of Oocytes. In *Embryology-Theory and Practice*: IntechOpen.

10.Li Y., Liu H., Wu K., Liu H., Huang T., Chen Z. J., Zhao S., Ma J., Zhao H. 2019. Melatonin promotes human oocyte maturation and early embryo development by enhancing clathrin-mediated endocytosis. *Journal of pineal research*, 67(3):e12601.

11.Lin T., Lee J.E., Kang J.W., Oqani R.K., Cho E.S., Kim S.B., Il Jin D. 2018. Melatonin supplementation during prolonged in vitro maturation improves the quality and development of poor-quality porcine oocytes via anti-oxidative and anti-apoptotic effects. *Molecular Reproduction and Development*, 85(8-9):665-681.

12. Lord T., Nixon B., Jones K.T., Aitken R.J. 2013. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. *Biology of Reproduction,* 88(3):67.

13. Lu C., Zhang Y., Zheng X., Song X., Yang R., Yan J., Feng H., Qiao J. 2018. Current perspectives on in vitro maturation and its effects on oocyte genetic and epigenetic profiles. *Science China Life Sciences,* 61:633-643.

14. Madkour A., Bouamoud N., Kaarouch I., Louanjli N., Saadani B., Assou S., Aboulmaouahib S., Sefrioui O., Amzazi S., Copin H. 2018. Follicular fluid and supernatant from cultured cumulus-granulosa cells improve in vitro maturation in patients with polycystic ovarian syndrome. *Fertility and Sterility,* 110(4): 710-719.

15. Miraki S., Mokarizadeh A., Banafshi O., Assadollahi V., Abdi M., Roshani D., Fathi F. 2017. Embryonic stem cell conditioned medium supports in vitro maturation of mouse oocytes. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 9(3):114.

16.Nikmard F., Hosseini E., Bakhtiyari M., Ashrafi M., Amidi F., Aflatoonian R. 2017. Effects of melatonin on oocyte maturation in PCOS mouse model. *Animal Science Journal*, 88(4):586-592.

17.Plancha C. E., Rodrigues P., Marques M., Almeida J. M., Navarro-Costa P. 2021. The time is ripe for oocyte in vitro maturation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics,* 38(6):1281-1283.

18. Shokri M.R., Bozorgmehr M., Ghanavatinejad A., Falak R., Aleahmad M., Kazemnejad S., Shokri F., Zarnani A-H. 2019. Human menstrual blood-derived stromal/stem cells modulate functional features of natural killer cells. *Scientific Reports,* 9(1):10007.

19. Vuong L.N., Le A.H., Ho V.N., Pham T. D., Sanchez F., Romero S., De Vos M., Ho T.M., Gilchrist R.B., Smitz J. 2020. Live births after oocyte in vitro maturation with a prematuration step in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics,* 37:347-357.

20. Yang H., Kolben T., Meister S., Paul C., van Dorp J., Eren S., Kuhn C., Rahmeh M., Mahner S., Jeschke U., von Schönfeldt V. 2021. Factors Influencing the In Vitro Maturation (IVM) of Human Oocyte. *Biomedicines,* 9(12):1904.

21. Yang Q., Zhu L., Wang M., Huang B., Li Z., Hu J., Xi Q., Liu J., Jin L. 2021. Analysis of maturation dynamics and developmental competence of in vitro matured oocytes under time-lapse monitoring. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19(1):183.

22. Zafardoust S., Kazemnejad S., Darzi M., Fathi-Kazerooni M., Rastegari H., Mohammadzadeh A. 2020. Improvement of pregnancy rate and live birth rate in poor ovarian responders by Intraovarian Administration of autologous menstrual blood derived-Mesenchymal Stromal Cells: Phase I/II Clinical Trial. *Stem Cell Reviews and Reports,* 16:755-763.

The Comparison of 24 and 48 Hours Culture on *In vitro* Maturation of Oocyte using Menstrual Blood Stem Cells Secretome in Polycystic Ovary

Hilda Rastegari[1], Nasim Hayati Roudbari[1]*, Somayeh Kazemnezhad[2], Soheila Ansaripour[2]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran

Abstract

The application of mesenchymal stem cells is a novel approach in regenerative medicine and infertility. Recently, culture enrichment using the secretome obtained from these cells, as well as the optimal time for culture, have been considered in order to improve the results of in vitro maturation (IVM), especially in women with polycystic ovaries (PCOS). The purpose of this study is comparing 24 and 48 timing on IVM using secretome of menstrual blood stem cells (MenSCs) along with follicular fluid and melatonin in PCOS women. 400 germinal vesicle oocytes were collected from 100 PCOS patients, as the best candidates for IVM, and randomly divided into four groups: control, secretome, follicular fluid and melatonin. Oocyte maturation was evaluated at 24 and 48 hours. Also, the effect patient's age on the results of the study was evaluated in the age groups under 30 and over 30 years old in both time periods. Oocyte maturation rate showed a significant increase in 24 hours in the group enriched with secretome compared to the control ($p < 0.05$). Also, matured oocytes were noticeably higher in melatonin enriched group, in 48 hours, compared to the control ($p < 0.001$). Moreover, according to our findings, the age of the women did not have a significant effect on the oocyte maturation rate in the 24-hour culture, while in the younger age group, the oocyte maturation rate increased significantly both in secretome and melatonin groups compared to the control group. As a result, the culture time of 24 hours with IVM medium enriched by secretome is the optimal time in order to increase oocyte maturation in PCOS women. Also, the use of melatonin seems to be an effective strategy to improve egg maturation in extended culture times.

Keywords: Secretome**,** Menstrual blood stem cells, IVM, Melatonin, Follicular fluids, PCOS.