



بررسی تغییرات مورفولوژیکی و بیان ژن‌های بلوغ سیتوپلاسمی تخمک نارس بعد از ۲۴ ساعت کشت آزمایشگاهی در زنان نابارور: یک مطالعه کنترل تصادفی

فاطمه سادات حسینی^{۱*}، مسعود یونسین^۲، فیروزه اکبری اسبق^۳، سیدحمید آقایی بختیاری^۴

۱- استادیار، گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

۲- استاد، گروه بهداشت محیط دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- استاد، گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۴- استادیار، گروه پژوهشی بیوانفورماتیک، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران / استادیار، گروه بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳

چکیده

مقدمه: در طی درمان زنان نابارور کاندید لقاح آزمایشگاهی (IVF)، حدود ۱۵ درصد از تخمک‌های به دست آمده، نابالغ باقی می‌مانند. بنابراین، یافتن یک رویکرد آزمایشگاهی کارآمد برای قابل استفاده کردن این نوع تخمک‌های نابالغ در بالین، به خصوص در زنانی که تعداد تخمک محدودی دارند، اهمیت دارد. یکی از این رویکردها، کشت تخمک نابالغ در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد به گونه‌ای که بیان ژن‌های دخیل در بلوغ سیتوپلاسمی تخمک نارس، افزایش یابد.

مواد و روش‌ها: از چهل و هشت زن نابارور کاندید لقاح آزمایشگاهی (IVF)، نود و پنج تخمک نارس اهدایی به دست آمد و تخمک‌ها به طور تصادفی در دو گروه قرار گرفتند: گروه کنترل بدون کشت و گروه مداخله به صورت کشت ۲۴ ساعته در شرایط آزمایشگاهی. بعد از تکمیل نمونه‌گیری، تخمک‌های هر دو گروه به طور جداگانه فشرده و با روش کمی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (q-PCR) از نظر سطح بیان ژن‌های آدنوزین تری فسفات میتوکندری ۶ (*Mt-ATPase 6*) و پروتئین مورفوژنتیک استخوان (*BMP15*) مقایسه شدند.

نتایج: سطح بیان ژن‌های *BMP15* و *MT-ATPase 6* در گروه مداخله در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب $7/867 \pm 3/12$ و $6/327 \pm 0/78$ برابر افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/001$). همچنین بر اساس تغییرات مورفولوژیکی، ۵۴ درصد تخمک‌های نارس گروه مداخله، تقسیم میوزیس را از سرگیری کرده بودند.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان دو ژن دخیل در بلوغ سیتوپلاسمی *BMP15* و *MT-ATP6* پس از کشت ۲۴ ساعته در شرایط آزمایشگاهی، می‌تواند سبب از سرگیری تقسیم میوز در تخمک‌های نارس شود و این روش در زنانی که تخمک محدود دارند، می‌تواند مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: تخمک نارس، کشت آزمایشگاهی، بیان ژن، نازایی.

*نویسنده مسئول: گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۲۱۸۲۵۸۳، نمابر: ۰۹۱۲۲۱۸۲۵۸۳، Email: mojhosseiniphd@gmail.com

ارجاع: حسینی فاطمه سادات، یونسین مسعود، اکبری اسبق فیروزه، آقایی بختیاری سید حمید. بررسی تغییرات مورفولوژیکی و بیان ژن‌های بلوغ سیتوپلاسمی تخمک نارس بعد از ۲۴ ساعت کشت آزمایشگاهی در زنان نابارور: یک مطالعه کنترل تصادفی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۱؛ ۱۸(۱): ۵۹-۵۱.

مقدمه

با وجود پیشرفت در تکنیک‌های کمک باروری (ART) Assailant Reproductive Techniques طی سال‌های اخیر، همچنان چالش‌های زیادی در درمان زوجین نابارور وجود دارد. به‌طور کلی در جهان، حدود ۱۵ درصد از زوجین پس از یکسال تلاش برای بارداری و مقاربت محافظت نشده، موفق به فرزندآوری نمی‌شوند و نازا تلقی می‌شوند. پروتکل‌های کنترل شده تحریک تخمدان Controlled Ovarian Hyperstimulation (COH) در چرخه درمانی لقاح آزمایشگاهی in-vitro Fertilization (IVF)، که برای برداشت تعداد بیشتر تخمک از تخمدان زنان نابارور استفاده می‌شود، همیشه با نتایج مطلوب همراه نیست. ممکن است حدود ۱۵ درصد و یا بیشتر، تخمک‌ها طی فرآیند فولیکولوژنریس، همچنان در مرحله ژرینال وزیکول (GV) Germinal Vesicle و یا متافاز یک (M1) به‌صورت نابالغ باقی بمانند و تقسیم سلولی میوزیس را جهت فرآیند لقاح کامل نکنند (۱).

تخمک‌های نابالغ توانایی تکاملی ضعیف داشته و در مطالعات انجام شده، گزارشات محدودی از تولد نوزاد زنده به‌دنبال بلوغ آزمایشگاهی این نوع تخمک‌ها به روش in vitro maturation (IVM) وجود دارد (۲). در سال‌های اخیر، روش IVM در زنان نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) polycystic cystic ovarian syndrome انتخاب مناسبی است و از خطر سندرم تحریک بیش از حد تخمدان (OHSS) ovarian hyper stimulation syndrome در این بیماران جلوگیری می‌کند (۳-۶). اگرچه میزان بلوغ تخمک در روش IVM همیشه رضایت‌بخش نیست (۵) پروتکل تحریک تخمدان در روش IVM به‌دلیل عدم استفاده و یا دوز کم گنادوتروپین‌ها در تحریک فولیکول‌ها، با پروتکل تحریک تخمدان در سیکل درمانی IVF معمولی تفاوت دارد (۶). برای پیشبرد روند تکاملی تخمک‌های نابالغ حاصل از یک سیکل IVF معمولی، روش IVM کاربرد ندارد و نیاز به روش آزمایشگاهی دیگری می‌باشد. از طرف دیگر، بلوغ تخمک مستلزم هم‌زمانی بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی است که از ویژگی‌های اصلی تخمک برای انجام لقاح و تکامل جنین حاصله است (۷-۹). علامت بلوغ هسته‌ای مشاهده خروج اولین جسم قطبی از تخمک در زیر میکروسکوپ است (۱۰)، در حالی که تشخیص بلوغ سیتوپلاسمی با مشاهده میکروسکوپی امکان‌پذیر نبوده و نیاز به بررسی مولکولی در سطح سلولی دارد. با وجود بلوغ هسته‌ای تخمک، ممکن است بلوغ سیتوپلاسمی اتفاق نیفتد (۱۱)، لذا ارزیابی مورفولوژیکی، به تنهایی پتانسیل رشد تخمک را نشان نمی‌دهد. کیفیت تخمک بیشتر به بلوغ سیتوپلاسمی آن وابسته است (۱۲ و ۱۳). بلوغ سیتوپلاسمی نشان‌دهنده ظرفیت تخمک بالغ برای لقاح و تکامل به مرحله بلاستوسیستی است. جهت ارزیابی بلوغ سیتوپلاسمی تخمک، ارزیابی فعالیت میتوکندری گزینه مناسبی است. میتوکندری سلولی

مسئول تولید انرژی (ATP) است. هر گونه اختلال در تولید ATP میتوکندری، ناهنجاری‌های رشد سلولی از جمله اختلال در جداسازی کروموزوم‌ها و آنیوپلویدی، شکست بلوغ و فرآیند لقاح، توقف تقسیم سلولی، سایتوکینز ناقص و تکه تکه شدن یا فراگماتاسیون سلولی رخ می‌دهد (۱۴). قابلیت تکامل و باروری تخمک با سطح آنزیم ATPase 6 میتوکندریایی مرتبط است (۱۲).

سطح بیان برخی ژن‌های دیگر در طی مراحل بلوغ تخمک (از مرحله GV به مرحله میوزدو، MII) افزایش می‌یابد (۱۵ و ۱۶). Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) عضو ی از ابرخانواده فاکتور رشد تبدیل‌کننده بتا (TGF- β) transforming growth factor- β است که نقش کلیدی در رشد فولیکولی، تکثیر سلول‌های کومولوسی و بلوغ تخمک دارد (۱۷-۱۹) و از فاکتورهای ترشحی تخمک oocyte secreted factors (OSFs) محسوب می‌شود که با مکانیسم سیگنال‌دهی پاراکرینی و اتوکرینی موجبات بلوغ تخمک را فراهم می‌کند (۱۲).

در حال حاضر، اطلاعات کمی در مورد روش‌های بهبود کیفیت در مورد تخمک‌های نارس GV که از چرخه‌های تحریک شده IVF معمولی گرفته شده‌اند، وجود دارد. به‌نظر می‌رسد ارزیابی بیان دو ژن (Mt- Mitochondrial Adenosine Triphosphatase 6 (ATPase 6) و BMP15 می‌تواند انتخاب مناسبی برای ارزیابی بلوغ سیتوپلاسمی تخمک‌های نارس باشد. هدف اصلی این مطالعه پاسخ به این سؤال است آیا به‌دنبال سیکل درمانی IVF مرسوم، کشت ۲۴ ساعته تخمک‌های نوع GV در محیط کشت G-1 PLUS می‌تواند منجر به پیشبرد بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی با افزایش بیان ژن‌های دخیل در بلوغ از جمله BMP15 و Mt-ATPase 6 در تخمک شود یا خیر. چنانچه پس از کشت ۲۴ ساعته، بیان ژن‌های مذکور در سطح تخمک همراه با بلوغ هسته‌ای تخمک افزایش یابد، می‌توان برای آن دسته از زنان ناباروری که تخمک محدود و از نوع نارس دارند استفاده کرد و تعداد تخمک‌های بالغ این زنان نابارور را جهت تلقیح اسپرم افزایش داد.

مواد و روش‌ها

۵۳ زن نابارور که بین خردادماه ۱۳۹۱ تا آبان ۱۳۹۲ در مرکز ناباروری بیمارستان یاس دانشگاه علوم پزشکی تهران تحت سیکل درمانی IVF قرار گرفته بودند، در این مطالعه وارد شدند. زنانی که علت نازایی با فاکتور مردانه، فاکتور لوله‌ای و یا ناباروری غیرقابل توجیه داشتند. همه زنان سن کمتر از ۴۰ سال داشتند و سطح هورمون محرک فولیکول Follicle Stimulation Hormone (FSH) و هورمون لوتئینی‌ز کننده Luteinizing Hormone (LH) طبیعی داشتند (کمتر از ۱۰ واحد در میلی‌لیتر).

کامل سلول‌های کومولوسی از اطراف تخمک و برهنه کردن تخمک، مرحله بلوغ تخمک‌ها به وسیله یک میکروسکوپ نوری معکوس (Nikon, Japan) با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، بررسی گردید. تخمک نارس مرحله GV با حضور یک هسته بزرگ در سیتوپلاسم و عدم وجود جسم قطبی مشخص می‌شد.

تخمک‌های GV با شکل سالم، با تقسیم تصادفی توسط متخصص آماری، به دو گروه تقسیم شدند، گروه کنترل شامل ۴۷ تخمک GV بود که مستقیماً پس از شستشو در محلول بافر RLT (Qiagen, Germany)، قرار داده می‌شدند و گروه مداخله شامل ۴۸ تخمک GV بود که پس از شستشو، ابتدا در قطرات ۵۰ میکرولیتری G-1 PLUS (Vitrolife, Sweden)، قرار داده می‌شدند و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۶٪ CO₂ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه می‌شدند. پس از ۲۴ ساعت، ابتدا از نظر مورفولوژیک و بلوغ هسته‌ای در زیر میکروسکوپ نوری معکوس بررسی و سپس مشابه گروه مقابل، به صورت انفرادی در محلول بافر RNLater (RLT) (Qiagen, Germany)، در لوله‌های میکرو سانتریفیوژ بدون RNase ذخیره می‌شدند. تمام نمونه‌ها تا زمان تکمیل نمونه‌گیری، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در پایان، ۴۷ تخمک GV از گروه کنترل با هم pool و ۴۸ تخمک از گروه مداخله به طور جداگانه pool شدند و به روش q-PCR میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در دو گروه بررسی و مقایسه گردید.

بررسی بیان ژن‌ها (جداسازی RNA، تهیه cDNA و انجام q-PCR) پرایمر ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Allele ID 6.0 طراحی شدند. همچنین از نرم‌افزار Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA 4) برای ژن‌های بیش از یک واریانت استفاده شد. پرایمرهای طراحی شده در محیط NCBI BLAST نهایی شدند (جدول ۱).

قبل از استخراج RNA، تخمک‌های GV موجود در بافر RLT در دمای اتاق ذوب و سپس با هم pool شدند. پس از سانتریفوژ به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰، بافر RLT از روی تخمک‌ها برداشته شد. جهت استخراج RNA از کیت ترایزول استفاده شد (Trizol, Invitrogen, USA). به منظور حذف آلودگی ژنومی، RNA استخراج شده با محلول DNase I (Fermentas, Germany) تیمار شد.

پس از استخراج RNA، غلظت RNA کل تخمک‌های GV در گروه کنترل و مداخله به ترتیب ۵۹۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۶۷۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که توسط اسپکتروفتومتر Thermo Scientific Nano Drop 2000 بررسی کیفی آن انجام شد. جهت تسریع ساخت cDNA از پرایمر Random Hexamer استفاده شد (Fermentas, Germany). برای استانداردسازی، پرایمر خانه‌گردان β-اکتین جهت q-PCR استفاده شد.

پیامد اول این مطالعه تعیین درصد تغییرات مورفولوژیکی تخمک نارس GV پس از ۲۴ ساعت کشت در شرایط آزمایشگاهی بود و پیامد ثانویه مقایسه سطح بیان Mt-ATPase 6 و BMP15 تخمک در گروه‌های کنترل و مداخله بود. ۴۸ زن که دارای تخمک نارس داشتند حدود نود و پنج تخمک نارس مرحله GV را که استفاده درمانی نداشتند، با رضایت مکتوب جهت مطالعه اهدا کردند و سایر تخمک‌های بالغ برای درمان خودشان استفاده شد.

جمع‌آوری اطلاعات از طریق پرسش از زنان و بررسی پرونده پزشکی، مشاهدات میکروسکوپی تخمک‌ها، ثبت مشخصات در فرم جمع‌آوری و استفاده از نرم‌افزارهای Quantity Polymerase Chain Reaction (q-PCR) انجام شد.

تخصیص تخمک‌های نارس به گروه کنترل و مداخله، به صورت تصادفی و یکی در میان انجام شد. کورسازی مطالعه یک سوکور بود به طوری که در مراحل انجام q-PCR، تکنسین مربوطه از نوع گروه اطلاع نداشت.

قبل از اجرای مطالعه، مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه اخذ و مطالعه در سایت کارآزمایی بالینی به شماره N3 2014031112307 ثبت گردید. در حین اجرای طرح، جهت جمع‌آوری تخمک‌های نارس غیرقابل استفاده در درمان، رضایت‌نامه آگاهانه از بیماران اخذ گردید.

زنان نابارور مورد مطالعه، با پروتکل درمانی آگونیست طولانی مدت برای تحریک کنترل شده تخمدان (COS) وارد سیکل درمانی IVF شدند. بوسرلین استات (Suprefact, Aventis, Germany) ۵۰۰ میکروگرم روزانه از روز ۲۱ سیکل قاعدگی ماه قبل تا سطح کاهشی هیپوفیز در سیکل بعدی، ادامه یافت. سپس دوز آن به ۲۵۰ میکروگرم در روز تا زمان تزریق گنادوتروپین جفتی انسانی human Chorionic Gonadotropin (hCG) کاهش یافت.

از روز سوم سیکل قاعدگی جاری، FSH ترکیبی (Gonal F, Serono, Italy) روزانه ۲۵۰-۱۵۰ واحد تا زمان تجویز hCG تزریق شد. پاسخ تخمدان توسط سونوگرافی ترانس واژینال بررسی شد. وقتی حداقل سه فولیکول (با قطر بیش از ۱۷ میلی‌متر) در سونوی تخمدان مشاهده شد، hCG به میزان ۵۰۰۰ واحد (Choriomon, Switzerland)، به عنوان تریگر تزریق شد. تخمک‌گیری تحت سونوی واژینال ۳۸-۳۶ ساعت پس از تزریق hCG انجام شد (۲۰).

پس از پانکچر تخمدان تحت گاید سونوی واژینال، مجموعه سلول‌های کومولوسی-اووسیت cumulus-oocyte-complexes (COCs) به دست آمده در محیط کشت Quinn's Advantage (Sage, USA) همراه با HEPES دارای ۲۰ درصد آلبومین سرم انسانی قرار داده شدند. حذف سلول‌های کومولوسی به دو روش آنژیمی هیالورونیداز و مکانیکی در زیر میکروسکوپ استریو (Nikon, Japan) صورت گرفت. پس از جداسازی

معنی‌داری ۰/۰۵ تعیین شد. نرم‌افزار SPSS (Chicago, IL, USA) جهت تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد.

از برنامه Linreg جهت تعیین میزان اثر بخشی پرایمرها و برنامه REST 2009 (Qiagen, Hilden, Germany) برای مقایسه سطح بیان ژن‌های مورد مطالعه در بین دو گروه استفاده شد (۲۱). داده‌های q-PCR به روش CT مقایسه‌ای تجزیه و تحلیل شد. ابتدا ΔC ژن هدف با β -actin داخلی تعیین و سپس نسبت بیان ژن‌ها بین دو گروه به روش $FC=2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

نتایج

همان‌طور که در جدول ۲ و ۳ نشان شده است، تفاوت معنی‌داری بین سن مادر، پروفایل هورمونی، تعداد کلی تخمک‌های به‌دست آمده، مدت زمان ناباروری، نوع و علت ناباروری در دو گروه وجود نداشت ($P > 0.05$). بیشتر بیماران، ناباروری نوع اولیه و با علت مردانه داشتند. تعداد تخمک GV به‌دست آمده در زنان گروه کنترل، به‌طور متوسط $1/71 \pm 0/85$ عدد و در زنان گروه مداخله به‌طور متوسط $2/35 \pm 2/18$ عدد بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P=0/23$). عوامل مداخله گر در دو گروه یکسان بودند.

واکنش‌های Quantitative real time PCR با استفاده از Roto-Gene Q instrument (Qiagen, German) with SYBR® Premix Ex Taq™ II master mix مطابق دستورالعمل سازنده (Takara, Japan) انجام شد. شرایط بهینه واکنش پس از فعال‌سازی آنزیم پلی‌مراز در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ چرخه دو مرحله‌ای تحت شرایط زیر تکرار شد:

۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشتگی (denaturation) و ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰-۵۹ درجه سانتی‌گراد برای اتصال و گسترش (Annealing, Extension). ویژگی قطعات PCR با استفاده از تجزیه و تحلیل منحنی ذوب تعیین شد. تمام منحنی‌های ذوب برای هر یک از محصولات PCR یک پیک تولید کردند.

داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار ($mean \pm SD$) همراه با حداقل و حداکثر برای داده‌های عددی و درصد برای داده‌های طبقه‌بندی نشان داده شده است. طبیعی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون One Sample Smirnov-Kolmogorov بررسی شد. برای مقایسه متغیرهای کمی بین دو گروه، از آزمون T-test (برای داده‌هایی که توزیع طبیعی داشتند) و آزمون Mann-Whitney U (برای همه متغیرهای عددی که توزیع طبیعی نداشتند) استفاده شد و برای داده‌های طبقه‌بندی شده از آزمون chi-square استفاده شد. سطح

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرها جهت بررسی ژن در تخمک به روش qPCR

نام ژن	Accession no.	پرایمر	طول پرایمر (bp)
MtATPase6	YP_003024031.1	CTGTTCGCTTCATTCATTG GGTGGTGATTAGTCGGTTG	۱۳۳
BMP15	NM_005448.2	CCTCACAGAGGTATCTGGC GGAGAGATTGAAGCGAGTTAG	۱۲۹
β actin	NM_001101.3	CAAGATCATTGCTCCTCTG ATCCACATCTGCTGGAAGG	۹۰
Sense			
Antisense			

جدول ۲- اطلاعات دموگرافیک و پروفایل هورمونی زنان در گروه شاهد و مداخله

P.V	گروه مداخله (۲۰)	گروه شاهد (۲۸)	متغیر
۰/۳۲	۳۱/۶۰ ($\pm 4/91$)	۳۰/۱۴ ($\pm 4/96$)	سن (سال)
۰/۳۴	۵/۵۰ ($\pm 2/94$)	۶/۶۷ ($\pm 3/84$)	مدت ناباروری (سال)
۰/۷۲	۱۰/۴۵ ($\pm 5/89$)	۹/۸۹ ($\pm 3/94$)	تعداد کلی تخمک
۰/۸۳	۶/۵۵ ($\pm 3/71$)	۶/۳۲ ($\pm 3/51$)	تخمک بالغ (MII)
۰/۵۵	۱/۵۵ ($\pm 1/82$)	۱/۸۶ ($\pm 1/65$)	(تخمک نارس MI)
۰/۲۳	۲/۳۵ ($\pm 2/18$)	۱/۷۱ ($\pm 0/85$)	(تخمک نارس GV)
۰/۹۹	۳۰۶۶/۴۰ ($\pm 1161/86$)	۳۰۶۱/۹۵ ($\pm 2348/53$)	^۱ سطح سرمی استرادیول
۰/۶۹	۶/۱۳ ($\pm 3/35$)	۵/۶۳ ($\pm 2/94$)	^۲ سطح سرمی LH
۰/۴۲	۷/۰۳ ($\pm 2/66$)	۶/۲۶ ($\pm 2/40$)	^۲ سطح سرمی FSH
۰/۳۸	۲/۱۵ ($\pm 1/07$)	۲/۶۷ ($\pm 2/07$)	^۳ سطح سرمی TSH
۰/۱۱	۳۱۶/۹۸ ($\pm 319/47$)	۱۰۲/۲۴ ($\pm 166/94$)	^۴ سطح سرمی PRL

^۱استرادیول سرم زمان تزریق hCG (پیکوگرم در میلی‌لیتر)

^۲LH: luteinizing hormone; FSH: follicle-stimulating hormone (IU/L);

^۳TSH: thyroid stimulating hormone (μ IU/L); ^۴PRL: prolactin;

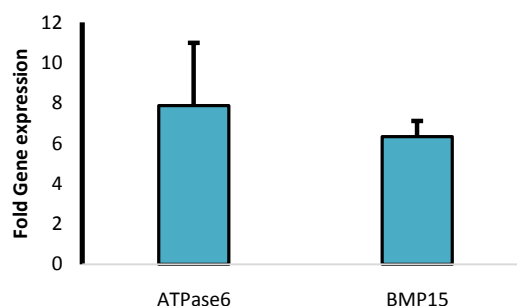
جدول ۳- علل و انواع ناباروری در زنان گروه شاهد و مداخله

متغیر	گروه شاهد تعداد (درصد)	گروه مداخله تعداد (درصد)	P.V
نوع ناباروری			
اولیه	۲۳(۸۲/۱)	۱۲(۶۰)	۰/۲۲۱
ثانویه	۲(۷/۱)	۴(۲۰)	
اهداننده	۳(۱۰/۷)	۴(۲۰)	
علت ناباروری			
علت مردانه	۱۵(۵۳/۶)	۱۱(۵۵)	۰/۴۹۱
علت لوله‌ای	۸(۲۸/۶)	۷(۳۵)	
غیرقابل توجه	۲(۷/۱)	۲(۱۰)	
اهداننده	۳(۱۰/۷)	۰(۰)	

در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که پس از ۲۴ ساعت کشت آزمایشگاهی در چرخه‌های IVF مرسوم، فعالیت میتوکندری ممکن است به وضعیت مطلوب‌تر تغییر کند. سطح بیان بالاتر ژن Mt-ATPase 6 به نوبه خود، بیوستز انرژی بالاتر باعث می‌شود که دوک‌های تقسیم سلولی تحت شرایط مطلوب ساخته شوند و در نتیجه پتانسیل رشد بالاتری ایجاد شود (۲۲).

کیفیت هر تخمک به بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی خود وابسته بوده و میزان بلوغ آن، در موفقیت لقاح و درمان IVF نقش اساسی دارد. ژن‌های متعددی نقش کلیدی در بلوغ تخمک دارند (۱۵، ۱۶، ۲۳ و ۲۴). یکی از مهمترین آنها، ژن میتوکندریایی Mt-ATPase 6 است که در مقایسه با سایر سنتتازهای ATP، سطح بیان بیشتری در تخمک دارد. همان‌طور که مطالعات نشان داده‌اند تخمک با کیفیت خوب، دارای میتوکندری‌های عملکردی است که متعهد به تأمین انرژی کافی برای بقای تخمک و قابلیت باروری است (۲۵ و ۲۶). عوامل مختلف می‌تواند بر بیان ژن Mt-ATPase 6 تأثیر بگذارد. پروتکل درمانی کنترل شده تحریک تخمدان بر بیان ژن Mt-ATPase 6 در تخمک‌های GV انسان تأثیر می‌گذارد (۲۷). تخلیه مخزن ATP میتوکندری می‌تواند با اختلالات کروموزومی، کاهش قابلیت لقاح تخمک و رشد جنین همراه باشد (۲۲ و ۲۸). همچنین کاهش بیان Mt-ATPase 6 در سلول‌های کومولوسی می‌تواند مسئول سیتوپلاسم نابالغ تخمک و کاهش قابل توجه رشد جنین حاصله باشد (۲۹). مطالعات نشان داده است جهش ژن Mt-ATPase 6 ممکن است منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن reactive oxygen species (ROS) شود (۳۰). تجمع بیش از حد ROS تعادل بین ROS و آنتی‌اکسیدان سلولی را مختل نموده و منجر به آسیب DNA در سطح هسته و میتوکندری سلولی می‌شود (۳۱ و ۳۲). مطالعه ونکاتش و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد سطح مزاد استرس اکسیداتیو ناشی از جهش ژن Mt-ATPase 6 ممکن است سبب نارسایی اولیه تخمدان

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است سطح بیان ژن‌های MT-ATPase 6 و BMP15 در گروه مداخله در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب $7/12 \pm 3/12$ و $6/327 \pm 0/78$ برابر افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/001$).



شکل ۱- نتایج تحلیل میزان بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار REST و در نظر گرفتن ژن β -actin به عنوان ژن مرجع محور Y، میزان تغییر بیان نسبی mRNA ژن Mt-ATPase 6 و BMP15 در تخمک‌های گروه کنترل را در مقایسه با تخمک‌های گروه مداخله نشان می‌دهد.

همچنین، براساس مورفولوژی تخمک‌ها پس از ۲۴ ساعت کشت آزمایشگاهی، ۵۴ درصد از تخمک‌های GV در گروه مداخله، تقسیم میوز را از سرگیری کردند به طوری که ۳۳ درصد به مرحله متافاز یک (MI) و ۲۱ درصد به مرحله متافاز دو (MII) رسیدند. ۴۰ درصد نیز در همان مرحله GV باقی ماندند و ۶ درصد نیز دژنره شدند.

بحث

هدف اصلی این مطالعه پاسخ به این سوال بود که آیا در سیکل درمانی IVF مرسوم، کشت ۲۴ ساعته تخمک نوع GV، در شرایط in-vitro می‌تواند منجر به پیشبرد بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی با افزایش بیان ژن‌های دخیل در بلوغ تخمک (BMP15 و Mt-ATPase 6) شود یا خیر. در مطالعه حاضر، سطح بیان بالاتر Mt-ATPase 6 در گروه مداخله

یکسان بیان می‌شوند ولی ژن‌های مربوطه بلوغ سیتوپلاسمی دارای الگوی بیان متفاوتی در محیط کشت in-vitro نسبت به شرایط in-vivo دارند و این می‌تواند پاسخ این سؤال باشد چرا نتایج بارداری از کشت ۲۴ ساعته تخمک در شرایط آزمایشگاهی، چندان رضایت‌بخش نیست (۴۴). از آنجایی که بسیاری از مسیرهای مولکولی در بلوغ سیتوپلاسمی دخیل هستند، حدس زدن این که کدام مسیر در این شرایط مختل شده، دشوار است و مطالعات بیشتری لازم است.

در مطالعه حاضر به دلیل کمبود منابع مالی و محدودیت‌های فنی، کلیه تخمک‌های یک گروه با هم pool شدند و سپس ارزیابی به روش q-PCR صورت گرفت؛ پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی تغییرات بیان هر ژن را در هر تخمک به صورت تک سلولی (single cell) بررسی نماید. دو ژن Mt-ATPase 6 و BMP15 به عنوان ژن‌های دخیل در بلوغ سیتوپلاسمی هستند که افزایش بیان آنها را می‌توان به عنوان شاخصی در کارایی محیط کشت تخمک و یا در بهینه‌سازی آن در نظر گرفت. با توجه به افزایش بیان این دو ژن پس از کشت ۲۴ ساعته تخمک GV و پیشرفت بلوغ هسته‌ای در مطالعه حاضر، می‌توان برای آن دسته از زنان ناباروری که تخمک محدود و از نوع نارس دارند از کشت ۲۴ ساعته استفاده کرد و تعداد تخمک‌های بالغ این زنان نابارور را جهت تلقیح اسپرم افزایش یابد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از پرسنل مرکز ناباروری یاس دانشگاه علوم پزشکی تهران، جهت همکاری و پشتیبانی در حین انجام این مطالعه اعلام می‌دارند. این مطالعه پس از تأیید کمیته اخلاق به شماره IRCT: 2014031112307 N3 و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران با گرانت شماره ۹۱-۳۰-۳۰۲-۱۸۳۲۴ انجام شد.

References

- Halvaei I, Khalili MA, Razi MH, Nottola SA. The effect of immature oocytes quantity on the rates of oocytes maturity and morphology, fertilization, and embryo development in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:803-10. doi: 10.1007/s10815-012-9799-6
- Chian R, Tan SJRbo. Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Reprod Biomed Online* 2002;5:125-32. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61614-8
- Shirasawa H, Terada Y. In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation and research material. *Reprod Med Biol* 2017;16:258-67. doi: 10.1002/rmb2.12042
- Lin Y-H, Hwang J-L. In vitro maturation of human oocytes. *Taiwanese J Obstet Gynecol* 2006;45:95-9. doi: 10.1016/S1028-4559(09)6204-7
- Li X, Mu Y, Elshewy N, Ding D, Zou H, Chen B, et al. Comparison of IVF and IVM outcomes in the same patient treated with a modified IVM protocol along with an oocytes-maturing system containing melatonin: A pilot study. *Life Sci* 2021;264:118706. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118706

به صورت ایدیوپاتیک (POI) primary ovarian insufficiency شود (۳۳).

داده‌های مطالعه حاضر مشابه مطالعه حسینی و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۲۷) نشان داد که کشت ۲۴ ساعته تخمک‌های نارس GV در شرایط آزمایشگاهی، می‌تواند از سرگیری تقسیم میوز را در ۵۴ درصد القا نموده و سطح بیان ژن‌های Mt-ATPase 6 و BMP15 را به طور معنی‌داری در تخمک افزایش دهد.

BMP15 ژن مهم دیگری است که در سیتوپلاسم تخمک بیان می‌شود و در محیط اطراف آزاد می‌شود تا از طریق مسیرهای سیگنالینگ، رشد سلول‌های کومولوسی مجاور خود را تنظیم کند. همچنین، مطالعات نشان داده است که بیان BMP15 در تخمک‌های زنان مسن کاهش می‌یابد لذا می‌تواند عامل مهمی در ارزیابی کیفیت تخمک محسوب شود (۳۶-۳۴).

مطالعه مور و همکاران نشان داده است که پروتئین BMP-15 ترشح شده از تخمک، تکثیر و تمایز سلول‌های گرانولوزای اطراف را نیز اصلاح می‌کند (۳۷) و در تنظیم برخی از فرآیندهای اساسی در سلول‌های گرانولوزا مانند گلیکولیز و سنتز کلاسترول (که برای نگهداری تخمک حیاتی هستند)، کمک‌کننده است (۳۸). علاوه بر این، یک مطالعه نشان داده است که BMP15 نو ترکیب می‌تواند پتانسیل رشد تخمک گاوی را افزایش دهد و نسبت تخمک‌هایی را که به مرحله بلاستوسیت پس از تلقیح می‌رسند، افزایش دهد (۳۹) مطالعه نشان داده است درمان با ملاتونین، به طور قابل توجهی پتانسیل رشد اووسیت‌ها و همچنین جنین حاصل از آنها را با مکانیسم‌های متعددی از جمله افزایش بیان Mt-ATPase 6 و BMP-15 بهبود می‌دهد (۴۰).

محیط کشت G-1 PLUS ترکیبات مختلف شامل کربوهیدرات، اسید آمینه و هیالورونان را برای حمایت از رشد جنین در اولین مراحل تکاملی فراهم می‌کند. اسید هیالورونیک (HA) hyaluronic acid مسئول استقرار ساختاری و عملکردی مناسب سلول‌های کومولوس در طی بلوغ تخمک است (۴۱). در برخی مطالعات اثر مکمل اسیدهای آمینه در محیط کشت بر روی رشد گامت‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (۴۲) و به نظر می‌رسد که این ترکیبات می‌تواند برای بلوغ تخمک نیز مفید باشد. در مطالعه حاضر در محیط کشت G-1 PLUS حدود ۵۴ درصد تخمک‌های نارس، تقسیم میوزیس را از سرگیری کردند و این یافته مشابه با مطالعه چریستویکو و همکاران در سال ۲۰۱۰ بود (۴۱ و ۴۳) که این پیشرفت احتمالاً به دلیل وجود پیرووات در محیط کشت باشد. ویلز و همکاران در مطالعه سال ۲۰۱۰ دریافتند سطح مولکولی، بیان ژن و عملکرد آنها در تخمک‌های بالغ شده در شرایط کشت آزمایشگاهی (in-vitro)، نسبت به آنچه که در شرایط in-vivo رخ می‌دهد متفاوت است (۲۴) بگونه‌ای که ژن‌های دخیل در بلوغ هسته‌ای، در دو محیط in-vitro و in-vivo

6. Dahan MH, Tan SL, Chung J, Son W-YJHR. Clinical definition paper on in vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 2016;31:1383-6. doi: 10.1093/humrep/dew109
7. Cha K-Y, Chian R-C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 1998;4:103-20. doi: 10.1093/humupd/4.2.103
8. Chian R-C, Buckett WM, Jalil AKA, Son W-Y, Sylvestre C, Rao D, et al. Natural-cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes is a potential approach in infertility treatment. *Fertil Steril* 2004;82:1675-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.04.060
9. Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996;8:485-9. doi: 10.1071/rd9960485
10. Fulka Jr J, First N, Moor R. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* 1998;4:41-9. doi: 10.1093/molehr/4.1.41
11. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996;54:197-207. doi: 10.1095/biolreprod54.1.197
12. Li Y, Li R-Q, Ou S-B, Zhang N-F, Ren L, Wei L-N, et al. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:1-9. doi: 10.1186/1477-7827-12-81
13. Cha K-Y, Chian R-CJHRU. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 1998;4:103-20. doi: 10.1093/humupd/4.2.103
14. Torner H, Brüssow K-P, Alm H, Ratky J, Pöhland R, Tuchscherer A, et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology* 2004;61:1675-89. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.09.013
15. Assou S, Anahory T, Pantescio V, Le Carrour T, Pellestor F, Klein B, et al. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod* 2006;21:1705-19. doi: 10.1093/humrep/del065
16. Virant-Klun I, Knez K, Tomazevic T, Skutella T. Gene expression profiling of human oocytes developed and matured in vivo or in vitro. *Bio Med Res Int* 2013; 2013:879489 doi:10.1155/2013/879489
17. Lin ZL, Li YH, Xu YN, Wang QL, Namgoong S, Cui XS, et al. Effects of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on the in vitro maturation of porcine oocytes. *Reprod Domest Anim* 2014;49:219-27. doi: 10.1111/rda.12254
18. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 1998;12:1809-17. doi: 10.1210/mend.12.12.0206
19. Otsuka F, Yao Z, Lee T-h, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15 identification of target cells and biological functions. *JBC* 2000;275:39523-8. doi:10.1074/jbc.M007428200
20. Ye H, Huang G-n, Zeng P-h, Pei L. IVF/ICSI outcomes between cycles with luteal estradiol (E 2) pre-treatment before GnRH antagonist protocol and standard long GnRH agonist protocol: a prospective and randomized study. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26:105. doi: 10.1007/s10815-009-9300-3
21. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36-e. doi: 10.1093/nar/30.9.e36
22. Lee S-H, Han J-H, Cho S-W, Cha K-E, Park S-E, Cha K-Y. Mitochondrial ATPase 6 gene expression in unfertilized oocytes and cleavage-stage embryos. *Fertil Steril* 2000;73:1001-5. doi: 10.1016/s0015-0282(00)00486-6
23. Gasca S, Pellestor F, Assou S, Loup V, Anahory T, Dechaud H, et al. Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reprod Biomed Online* 2007;14:175-83. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60785-7
24. Wells D, Patrizio P. Gene expression profiling of human oocytes at different maturational stages and after in vitro maturation. *AJOG* 2008;198:455.e1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2007.12.030
25. Chong F, Bahena I, Casas E, Betancourt M, Ducolomb Y, González C, et al. ATPase6 participates in pig oocyte maturation in vitro. *TIP [online]*. 2018;21. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2018.2.1
26. Markholt S, Grøndahl ML, Ernst E, Andersen CY, Ernst E, Lykke-Hartmann K. Global gene analysis of oocytes from early stages in human folliculogenesis shows high expression of novel genes in reproduction. *Mol Hum Reprod* 2012;18:96-110. doi: 10.1093/molehr/gar083
27. Hoseini FS, Salsabili N, Akbari-Asbagh F, Aflatoonian R, Aghae-Bakhtiari SH. Comparison of Gene Expression Profiles in Human Germinal Vesicle Before and After Cytoplasmic Transfer From Mature Oocytes in Iranian Infertile Couples. *JFRH* 2016;10:71.
28. Máximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hürthle cell tumors. *Am J Clin Pathol* 2002;160:1857-65. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61132-7
29. Mesalam AA, El-Sheikh M, Joo M-D, Khalil AAK, Mesalam A, Ahn M-J, et al. Induction of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction by Juglone Affects the Development of Bovine Oocytes *Int J Mol Sci* 2021;22:168. doi: 10.3390/ijms22010168
30. Baracca A, Sgarbi G, Mattiazzi M, Casalena G, Pagnotta E, Valentino ML, et al. Biochemical phenotypes associated with the mitochondrial ATP6 gene mutations at nt8993. *Biochim Biophys Acta Bioenerg BBA-Bioenergetics* 2007;1767:913-9. doi: 10.1016/j.bbabi.2007.05.005
31. Fanaei H, Khayat S, Halvaei I, Ramezani V, Azizi Y, Kasaieian A, et al. Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples. *Iran J Reprod Med* 2014;12:103.
32. Bisht S, Dada R. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front Biosci (Schol Ed)* 2017;9:420-47. doi: 10.2741/s495
33. Venkatesh S, Kumar M, Sharma A, Kriplani A, Ammini A, Talwar P, et al. Oxidative stress and ATPase6 mutation is associated with primary ovarian insufficiency. *Arch Gynecol Obstet* 2010;282:313-8. doi: 10.1007/s00404-010-1444-y
34. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008;14:159-77. doi: 10.1093/humupd/dmm040
35. Sharov AA, Falco G, Piao Y, Poosala S, Becker KG, Zonderman AB, et al. Effects of aging and calorie restriction on the global gene expression profiles of mouse testis and ovary. *BMC Biol* 2008;6:24. doi: 10.1186/1741-7007-6-24
36. Wang L-y, Wang D-h, Zou X-y, Xu C-m. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009; 10(7):483-92. doi: 10.1631/jzus.B0820379
37. Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *JBC* 2003;278:304-10. doi: 10.1074/jbc.M207362200
38. Sanfins A, Rodrigues P, Albertini DFJJoar, genetics. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *J Assist Reprod Genet* 2018; 35:1741-50. doi: 10.1007/s10815-018-1268-4
39. Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol* 2006;296:514-21. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.06.026

40. Yang M, Tao J, Chai M, Wu H, Wang J, Li G, et al. Melatonin improves the quality of inferior bovine oocytes and promoted their subsequent IVF embryo development: mechanisms and results. *Molecules* 2017;22:2059. doi: [10.3390/molecules22122059](https://doi.org/10.3390/molecules22122059)
41. Rios GL, Buschiazzo J, Mucci NC, Kaiser GG, Cesari A, Alberio RJT. Combined epidermal growth factor and hyaluronic acid supplementation of in vitro maturation medium and its impact on bovine oocyte proteome and competence. *Theriogenology* 2015; 83:874-80. doi: [10.1016/j.theriogenology.2014.11.022](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.022)
42. Bahrami M, Morris MB, Day MLJSr. Amino acid supplementation of a simple inorganic salt solution supports efficient in vitro maturation (IVM) of bovine oocytes. *Sci Rep* 2019;9:1-10. doi: [10.1038/s41598-019-48038-y](https://doi.org/10.1038/s41598-019-48038-y)
43. Christopikou D, Karamalegos C, Doriza S, Argyrou M, Sisi P, Davies S, et al. Spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro in two different culture media. *Reprod Biomed Online* 2010;20:639-48. doi: [10.1016/j.rbmo.2010.02.005](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.02.005)
44. Jones GM, Cram DS, Song B, Magli MC, Gianaroli L, Lacham-Kaplan O, et al. Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. *Hum Reprod* 2008;23:1138-44. doi: [10.1093/humrep/den085](https://doi.org/10.1093/humrep/den085)



Investigating the Morphological Changes and Expression Level of Cytoplasmic Maturation Genes of Immature Oocytes after 24-hour In-Vitro Culture in Infertile Women: A Randomized Control Study

Fatemeh Sadat Hosseini (Ph.D.)^{1*}, Masud Yunesian (Ph.D.)², Firoozeh Akbari-Asbagh (Ph.D.)³, Seyed Hamid Aghaee-Bakhtiari (Ph.D.)⁴

1- Dept. of Obstetrics & Gynecology, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

2- Dept. of Research Methodology and Data Analysis, Institute for Environmental Research, Tehran University of Medical Sciences Tehran, Iran.

3- Infertility center of Tehran Yas Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- Bioinformatics Research Group, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran; Dept. of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Received: 19 July 2022, Accepted: 4 March 2023

Abstract:

Introduction: According to previous reports, treatment of infertile women who are candidates for in vitro fertilization (IVF), about 15% of the oocytes remains immature. Therefore, finding an efficient approach to make these types of oocytes usable in the clinic, especially in women with limited oocytes, is necessary. One of these approaches is the laboratory culture of immature oocytes in such a way that the expression of genes involved in cytoplasmic maturation increases.

Methods: Forty-eight infertile women candidates for IVF donated their immature oocytes at the time of oocyte retrieval. The obtained immature oocytes were randomly divided into two groups: the control group without in-Vitro culture and the intervention group in the form of 24-hour culture. The total oocytes of both groups (ninety-five immature oocytes) were pooled separately and analyzed by quantitative polymerase chain reaction (q-PCR).

Results: The level of expression of MT-ATP6 and BMP15 genes in the intervention group has a significant increase compared to the control group, with a fold change of 7.867 ± 3.12 and 6.327 ± 0.78 , respectively ($P < 0.001$). Furthermore, according to the morphological changes, 54% of the immature oocytes in the intervention group had resumed meiosis.

Conclusion: Increasing the expression of two cytoplasmic maturation genes, MT-ATP6 and BMP15 can cause the resumption of meiosis in immature oocytes. Therefore, this strategy can be promising in women with low eggs.

Keywords: Germinal Vesicle Oocyte, MT-ATP6, BMP15, Gene Expression, Conventional IVF, In-vitro Culture.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: F.S. Hosseini, Email: mojhosseiniphd@gmail.com

Citation: Hosseini F.S, Yunesian M, Akbari-Asbagh F, Aghaee-Bakhtiari SH. Investigating the morphological changes and expression level of cytoplasmic maturation genes of immature oocytes after 24-hour in-vitro culture in infertile women: a randomized control study. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(1):51-59.