تحقیقی

اثر عامل تحریک کننده کلنی گرانولوسیت بر میزان تخمک‌گذاری و موفقیت لانه‌گزینی رویان‌های موش سوری

فرناز گلشن[1]، دکتر مجید شهبازی[2]، دکتر کامران حیدری*[2و3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۲- دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۳- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *عامل تحریک کننده کلنی گرانولوسیت (G-CSF) و گیرنده آن در فولیکول‌های در حال رشد، سلول‌های بافت جنینی و دستگاه تولید مثل وجود داشته و تجمع سرمی G-CSF به‌طور آشکاری در زمان تخمک‌گذاری افزایش می‌یابد. لذا این مطالعه به منظور تعیین اثر عامل تحریک کننده کلنی گرانولوسیت بر میزان تخمک‌گذاری و موفقیت لانه‌گزینی رویان‌های حاصل از آمیزش موش سوری انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه تجربی روی ٤٠ سر موش سوری ماده نژاد NMRI در دو گروه کنترل و تیمار و ۱۰ سر موش سوری نر انجام شد. در هر دو گروه به منظور تحریک تخمدان و القای اوولاسیون به ترتیب ۱۰ واحد PMSG و ٤٨ ساعت بعد ۱۰ واحد hCG به صورت داخل صفاقی و تک‌دوز به ازای هر موش تزریق شد. سپس در گروه تیمار، هم‌زمان با تزریق PMSG ، ۵۰µg/kg از G-CSF و در گروه کنترل نیز در همین مرحله و هم‌حجم با آن نرمال سالین به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. نیمی از موش‌های گروه کنترل و تیمار پس از گذشت ١٦تا ١٨ساعت از آخرین تزریق به روش دررفتگی مهره های گردنی کشته شدند تا تعداد تخمک های آزادشده به وسیله میکروسکوپ اینورت بررسی شود. نیمی دیگر از موش‌های گروه کنترل و تیمار با موش‌های نر آمیزش داده شدند و پس از گذشت ١٦ روز بعد از لقاح موش‌های ماده باردار با همان روش کشته و جنین‌های حاصل از نظر تعداد بررسی شدند.*

یافته‌ها : *میانگین تخمک‌های آزادشده در گروه تیمار (۱/۲۵±۱۸/۵) بیش از گروه کنترل (۱/۳۲ ±۱۲/۱) بود (P<۰/۰۵). میزان لانه‌گزینی در گروه کنترل و تیمار از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد.*

نتیجه‌گیری : *علی رغم این که عامل تحریک کننده کلنی گرانولوسیت نتوانست بر تعداد لانه‌گزینی اثر داشته باشد؛ ولی موجب افزایش تعداد تخمک‌های آزاد شده گردید.*

کلید واژه‌ها : *عامل تحریک کننده کلنی گرانولوسیت ، تخمک گذاری ، موش سوری*

* نویسنده مسؤول : دکتر کامران حیدری ، پست الکترونیکی haidarikamran@goums.ac.ir

نشانی: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی، تلفن ۳۲٤۲۱٦۵۱-۰۱۷ (داخلی ۳۲۷) ، نمابر ۳۲٤٤۰۲۲۵

وصول مقاله : ۱۳۹۵/۳/۵ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۵/۱۱/۵ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹۵/۱۱/٦

مقدمه

درگذشته سیتوکین‌ها به عنوان محصولاتی از سلول های ایمنی، واسطه‌های مهمی در پاسخ‌های ایمنی شناخته می‌شدند (۱). سیتوکین‌ها به‌وسیله محدوده وسیعی از انواع سلول‌های غیرایمنی همانند سلول‌های استرومای تخمدان سنتز می‌شوند. عملکرد سیتوکین‌ها در تخمدان شامل پیشبرد فرایند رشد فولیکولی، تولید استروئید، فعالیت لوکوسیت‌های موردنیاز برای تخمک گذاری، تغییرات بافتی مربوطه طی تخمک گذاری، لوتئینی شدن و لوتئولیز است (۱). سیتوکین‌ها نقش مهمی در موفقیت فرایند تولیدمثل ایفا می‌کنند. فعالیت مستقیم آنها بر روی سلول‌ها شامل سلول‌های زایا، رویان، سلول های غیر هماتوپویتیک در تخمدان‌ها و رحم بوده و نیز به‌طور غیرمستقیم در پیشبرد تولید گامت‌ها، لانه‌گزینی، رشد و نمو conceptus و زایمان نقش دارند (۲). گروهی از این سیتوکین‌ها، خانواده عامل تحریک کننده کلنی (Colony-Stimulating Factors: CSF) است که نقش آنها در ایجاد ارتباط اولیه بین مادر و رویان در هر دو مدل انسانی و حیوانی تایید شده است (۳). CSFs گلیکوپروتئین‌هایی را ترشح می کنند که به گیرنده‌های پروتئینی مربوطه متصل شده و موجب فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی همراه با تکثیر و تمایز سلولی می‌شوند (۴).

G-CSF یکی از عوامل رشد هماتوپویتیک است که تکثیر و تمایز جمعیت سلول‌های progenitor را در مغز استخوان تنظیم می‌کند. در هرحال چندین نوع سلول غیرخونساز نیز مانند

استئوبلاست، عضله صاف، اندوتلیال و اپیتلیال همانند سلول‌های بافت دستگاه تولیدمثل قادر به تولید G-CSF هستند (۵و۶). از طرفی این عامل به‌وسیله سلول‌های دسیدوا نیز بیان و تولید شده و گیرنده آن c-fms، نیز به‌وسیله سلول‌های تروفوبلاست تولید می‌شود (۱۱-۷). علاوه براین، گیرنده G-CSF در انواع سلول‌های غیر هماتوپویتیک شامل سلول‌های اندوتلیال عروق خونی (۱۲)، سلول‌های تروفوبلاست جفت (۷)، سلول‌های ریه و سلول‌های سرطانی مثانه نیز مشاهده شده است (۱۳و۱۴).

G-CSF به‌وسیله سلول‌های گرانولوزا در زمان تخمک‌گذاری ترشح شده (۱۵و۱۶) و سپس افزایش اولیه آن در اندومتر رحم و سرم در دوره فاز لوتئال طی بارداری رخ می‌دهد (۱۷). تجویز G-CSF به طور آشکاری موجب افزایش تعداد نوزادان زنده در بیماران باسابقه سقط‌جنین می‌شود (۱۸). بنابراین فرضیه اصلی بر این اساس است که G-CSF موجود در مایع فولیکولی نشان‌دهنده صلاحیت اووسیت برای پیشبرد افزایش ارتباط بین مادر و conceptus بوده و در تشکیل جفت مؤثر است (۱۹). تجمع سرمی G-CSF به طور آشکاری طی فاز تخمک‌گذاری در مقایسه با دیگر فازها افزایش می‌یابد (۲۰و۲۱). بیشتر سقط‌های مکرر در افرادی با G-CSF سرمی پایین رخ می‌دهد. شواهد نشان می‌دهد که آن نقش مهمی در تخمک‌گذاری و نگهداری بارداری ایفا می‌کند (۱۹و۲۰). از طرفی مشاهده شده که علاوه بر عدم ارتباط بین سطح سرمی این عامل با نتیجه IVF، اثر مثبت معنی‌داری از نظر آماری نیز بر تعداد تخمک‌های بالغ آزاد شده و میزان بارداری حاصل نمی‌شود (۲۲). همچنان که در عدم تاثیر کاربرد G-CSF در محیط کشت بر میزان IVM تخمک‌ها نیز در مطالعه‌ای نتیجه مشابهی به‌دست آمد (۲۳).

لذا با توجه به نظرات متفاوت در این خصوص و از آنجایی که G-CSF به صورت اشکال دارویی در کلینیک به عنوان درمان بیمارانی با سابقه سقط جنین استفاده می‌شود و کاربرد آن برای درمان اختلالات تخمک‌گذاری و افزایش لانه‌گزینی رویان نیز مورد بحث است؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر عامل تحریک کننده کلنی گرانولوسیت (G-CSF) بر میزان تخمک‌گذاری و موفقیت لانه‌گزینی رویان‌های حاصل از آمیزش موش سوری انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از ۴۰ سر موش سوری ماده و ۱۰ سر موش سوری نر بالغ نژاد NMRI با سن تقریبی ۸-۶ هفته خریداری شده از انستیتو پاستور شعبه آمل استفاده گردید.

ضمن رعایت پروتکل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی، موش ها در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی گلستان در شرایط استاندارد با دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته و رطوبت ۵۰ درصد با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. ۲۰ سر موش ماده در هر دو گروه کنترل و تیمار به‌طور تصادفی قرار داده شده و در هر دو گروه به‌منظور تحریک تخمدان و القای اوولاسیون به ترتیب ۱۰ واحد PMSG (Pregnant mare serum gonadotrophin) و ۴۸ ساعت بعد ۱۰ واحد hCG (human Chronic Gonadotrophin) به‌صورت داخل صفاقی و تک‌دوز به ازای هر موش تزریق شد. سپس در گروه تیمار، هم‌زمان با تزریق PMSG، ۵۰µg/kg از G-CSF (۲۴) و در گروه کنترل نیز در همین مرحله و هم‌حجم با آن نرمال سالین به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. نیمی از موش‌های گروه‌های کنترل و تیمار پس از گذشت ۱۶ تا ۱۸ ساعت از آخرین تزریق به روش دررفتگی مهره‌های گردنی کشته شدند. سپس لوله‌های رحمی به همراه تخمدان و شاخ‌های رحمی به پتری دیش ۳cm حاوی PBS (Phosphate Buffer Saline) انتقال داده شدند. سپس تحت استریومیکروسکوپ، لوله‌های رحمی جداسازی گشته و به داخل قطره ۶۰ میکرولیتری محتوی PBS تحت پوشش روغن معدنی در پتری دیش ۶cm انتقال داده شدند تا به‌منظور خارج کردن COCs (Oocyte Complexes Cumulus) از ناحیه آمپولار لوله رحمی برشی به‌وسیله سوزن G ۲۹ به بخش متورم لوله ایجاد شده که سپس با squeezing، COCs مربوطه بیرون آورده شد. سپس تعداد تخمک‌های آزادشده به‌وسیله میکروسکوپ اینورت شمارش گردید.

بلافاصله بعد از آخرین تزریق بر روی نیمی دیگر از موش‌های ماده باقیمانده از هر دوگروه کنترل و تیمار به منظور باردار شدن، موش‌های نر (دو موش ماده با یک نر) به مدت یک شب کنار آنها قرار داده شد. صبح روز بعد با مشاهده پلاک واژینال به عنوان نشانه بارداری، روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. در پایان روز ۱۶ بارداری موش‌های ماده باردار با همان روش کشته شدند و با شکافتن جدار قدامی شکم، جنین‌ها به همراه جفتشان از شاخ‌های رحمی خارج گردید و سپس تعداد جنین‌های حاصل شمارش گردید.

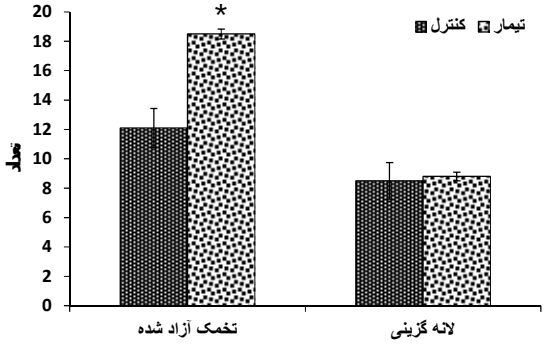
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 تجزیه وتحلیل شدند. ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها از نظر میزان تخمک‌های به‌دست‌آمده، تعداد و وزن جنین‌های حاصل با استفاده از Two- Sample Kalmogorov- Smiranov Test تعیین شد. سپس از T-test در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ استفاده گردید.

یافته‌ها

میانگین تعداد تخمک‌های آزادشده در گروه کنترل ۱/۳۲±۱۲/۱ و در گروه تیمار ۱/۲۵±۱۸/۵ تعیین شد. این تفاوت از نظر آماری معنی دار بود؛ به‌طوری که در گروه تیمار تعداد بیشتری تخمک نسبت به گروه کنترل آزاد شد (P<۰/۰۵) (نمودار یک).

میزان لانه‌گزینی در گروه کنترل (۰/۳۴±۸/۵۰) و گروه تیمار

(۸/۸۰±۰/۲۹) بود که تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد (نمودار یک).



نمودار ۱ : مقایسه میانگین تعداد تخمک‌های آزاد شده و تعداد لانه‌گزینی جنین‌های موش سوری نژاد NMRI در دو گروه کنترل و تیمار شده با غلظت ۵۰µg/kg از G-CSF
***P< ۰/۰۵ ***

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر میانگین تخمک‌های آزادشده در گروه تیمار به طور معنی داری بیش از گروه کنترل بود؛ اما تفاوتی در میزان لانه‌گزینی بین دو گروه مشاهده نشد.

تحریک تخمک‌گذاری در روش‌های کمک باروری (Assisted Reproductive Technology: ART) (۲۵) برای به‌دست آوردن تعداد زیادی تخمک طی یک سیکل معین صورت می‌گیرد تا تعداد زیادی فولیکول به‌طور هم‌زمان شروع به رشد نموده و پس از تخمک‌گذاری تعداد بیشتری اووسیت حاصل شود (۵). طی ART در کلینیک تنها ۵ درصد از اووسیت‌های جمع‌آوری شده و پس از لقاح تنها ۲۵-۲۰ درصد رویان‌های انتقال‌یافته منجر به تولد نوزاد می‌شوند (۲۶). تحریک تخمک‌گذاری به‌خاطر برهم خوردن تعادل هورمون‌ها، کیفیت اووسیت را تحت تاثیر قرار می‌دهد. از طرفی موجب ایجاد تغییرات مورفولوژیکی و مولکولی نامطلوبی در اندومتر رحم شده که این شرایط باعث کاهش گیرندگی رحم برای پذیرش رویان (۷و۲۰و۲۱)، نقص در چسبندگی رویان به اندومتر (۲۷) و در نهایت درصد پایین لانه‌گزینی می‌گردد (۱۱و۱۵) و نشان دهنده نقش غالب فاکتورها و هورمون‌های مادری طی رشد و نمو اووسیت و رویان است (۲۸).

در مطالعه Kahyaoglu و همکاران ارتباطی بین سطح G-CSF موجود در مایع فولیکولی و سرم بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک با برآیند IVF (Fertilization In Vitro) مشاهده نشد. علی‌رغم این که سطح G-CSF موجود در مایع فولیکولی و سرم بیماران از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با سایر بیماران تحت درمان با IVF داشت؛ اما پاسخ تخمدانی مناسب از نظر تعداد تخمک‌های بالغ آزاد شده، افزایش E2 و میزان بارداری مشاهده نشد (۲۲). در مطالعه Fujii و همکاران اثر G-CSF در پیشگیری و کاهش Luteinized Unruptured Follicle Syndrome (IUF) ایجاد شده به وسیله داروی کلومیفن ارزیابی شد. تجویز G-CSF به‌طور آشکاری موجب اصلاح تخمک‌گذاری در پروسه درمانی با CC-hCG گردید (۲۹). اثر مثبت این فاکتور به‌طور مشابه در مطالعه Salmassi و همکاران مشاهده شد. به طوری که G-CSF در رشد فولیکول و تخمک‌گذاری ایفای نقش کرد و در مورد بیمارانی با G-CSF سرمی بیشتر، پس از تحریکات تخمدانی، پاسخی بهتر و میزان باروری بیشتری مشاهده شد (۳۰).

با توجه به شناسایی G-CSF و گیرنده‌اش در فولیکول‌های پیش از تخمک‌گذاری و سنتز G-CSF و گیرنده‌اش توسط سلول‌های گرانولوزا و نقش آن در تکثیر و تمایز خود این سلول‌ها و تجمع حداکثری آن در سلول‌های گرانولوزا در زمان تخمک‌گذاری؛ لذا احتمال ایفای نقش آن در تکوین فولیکول و تخمک‌گذاری مطرح است (۱۵و۳۱). علاوه بر این میزان G-CSF و گرانولوسیت‌های موجود در خون طی زمان تخمک‌گذاری به بیشترین مقدار خود می‌رسد (۲۰و۳۲). همچنین در زمان پیش از تخمک‌گذاری بیشتر لوکوسیت‌ها (نوتروفیل، بازوفیل و لنفوسیت و منوسیت / ماکروفاژ) در تکا و مدولای تخمدان حضور دارند که با افزایش LH، مهاجرت لوکوسیت‌ها به سلول‌های تکا افزایش می‌یابد و منجر به گسیخته شدن دیواره فولیکول‌ها و تخمک‌گذاری می گردد (۳۳و۳۴). با توجه به نتایج مشابهی که در این خصوص در مطالعه حاضر حاصل شد؛ چنین به‌نظر می‌رسد که با تزریق G-CSF به صورت تک دوز و به مقدار ۵۰µg/kg در زمان تزریق PMSG احتمالاً این فاکتور می‌تواند از طریق همین مکانیسم به صورت مستقیم بر روی فولیکوژنزیس و تخمک‌گذاری و نیز بر افزایش گرانولوسیت‌های خون به‌طور غیرمستقیم اثر گذاشته و در نهایت منجربه افزایش تعداد تخمک‌های MII آزادشده در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل شده گردد. از طرفی باتوجه به این که تولید G-CSF و بیان گیرنده آن در استرومای پرزهای کوریونی جنینی، جفت، سلول‌های تروفوبلاستیک و دسیدوایی (۹)، غدد اندومتریال طی بارداری (۷و۱۱) مشاهده می‌شود؛ لذا به این خاطر استفاده از آن به منظور درمان بیمارانی با سابقه سقط مطرح شده است. در مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد که تزریق G-CSF اگزوژن به‌صورت تک دوز نتوانست اثر معنی‌داری بر تعداد لانه‌گزینی رویان‌های حاصل داشته باشد که این خود می‌تواند ناشی از عدم اثر وجود مقادیر بالاتر از حد طبیعی این عامل در بافت‌های فوق به‌علت محدود بودن گیرنده‌های مربوطه باشد و یا احتمال کافی نبودن دوز به‌خاطر تک دوز استفاده شدن آن نیز می‌تواند مطرح باشد. از طرفی این نتیجه نمی‌تواند برای کاربرد این فاکتور نکته منفی را در پی داشته باشد. زیرا یکی از کاربردهای G-CSF به عنوان عامل رشد هماتوپویتیک،

تنظیم تکثیر و تمایز جمعیت سلول‌های progenitor در مغز استخوان است. بنابراین اثر مضر و عوارض جانبی مربوطه بر روی سیستم تولید مثل بیماران دریافت کننده آن را می‌تواند رد کند و از این حیث می‌توان نکته مثبت را در این خصوص برای آن متصور شد.

از این‌رو مطالعات آتی به‌منظور بررسی دوزهای چندگانه، زمانبندی کاربرد آن و بررسی میزان بیان گیرنده‌های مربوطه در بافت‌های جنینی و مادری به‌منظور نتیجه‌گیری بهتر و جامع‌تر پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عامل تحریک کننده کلنی گرانولوسیت نتوانست بر تعداد لانه‌گزینی تاثیر داشته باشد؛ ولی موجب افزایش تعداد تخمک‌های آزاد شده گردید که در مجموع نتیجه مثبتی را می‌توان در فرایند فولیکوژنزیس برای آن متصور شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه (شماره ۱۷۰) خانم فرناز گلشن برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریحی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود. بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان به خاطر تامین هزینه‌های مالی (گرانت ۹۴۰۳۱۰۰۴۵) سپاسگزاری می‌گردد. همچنین تشکر ویژه و نهایت سپاس خود را از شرکت آریاتیناژن به خاطر اهدای عامل G-CSF مورد استفاده، اعلام می‌داریم.

References

1. Büscher U, Chen FC, Kentenich H, Schmiady H. Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? Hum Reprod. 1999 Jan; 14(1): 162-6.

2. Ingman WV, Jones RL. Cytokine knockouts in reproduction: the use of gene ablation to dissect roles of cytokines in reproductive biology. Hum Reprod Update. 2008 Mar-Apr; 14(2): 179-92.

3. Pollard JW. Role of colony-stimulating factor-1 in reproduction and development. Mol Reprod Dev. 1997 Jan; 46(1): 54-60. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199701)46: 1<54::AID-MRD9>3.0.CO;2-Q

4. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. N Engl J Med. 2006 May; 354(19): 2034-45.

5. Morstyn G, Burgess AW. Hemopoietic growth factors: a review. Cancer research. 1988; 48(20): 5624-37.

6. Giacomini G, Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG, Bonsi L, Vitale L, Bagnara GP, et al. Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. Hum Reprod. 1995 Dec; 10(12): 3259-63.

7. Uzumaki H, Okabe T, Sasaki N, Hagiwara K, Takaku F, Tobita M, et al. Identification and characterization of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Dec; 86(23): 9323–26.

8. Shorter SC, Vince GS, Starkey PM. Production of granulocyte colony-stimulating factor at the materno-foetal interface in human pregnancy. Immunology. 1992 Mar; 75(3): 468-74.

9. Saito S, Fukunaga R, Ichijo M, Nagata S. Expression of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor at the fetomaternal interface in murine and human pregnancy. Growth Factors. 1994; 10(2): 135-43.

10. McCracken S, Layton JE, Shorter SC, Starkey PM, Barlow DH, Mardon HJ. Expression of granulocyte-colony stimulating factor and its receptor is regulated during the development of the human placenta. J Endocrinol. 1996 May; 149(2): 249-58.

11. McCracken SA, Grant KE, MacKenzie IZ, Redman CW, Mardon HJ. Gestational regulation of granulocyte-colony stimulating factor receptor expression in the human placenta. Biol Reprod. 1999 Apr; 60(4): 790-6.

12. Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell CJ, et al. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. Nature. 1989 Feb; 337(6206): 471-3.

13. Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C, Quan SG, Baldwin GC, Weisbart RH, et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. Blood. 1990 Feb; 75(4): 851-7.

14. Tachibana M, Miyakawa A, Uchida A, Murai M, Eguchi K, Nakamura K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor receptor expression on human transitional cell carcinoma of the bladder. Br J Cancer. 1997; 75(10): 1489-96.

15. Salmassi A, Schmutzler AG, Huang L, Hedderich J, Jonat W, Mettler L. Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. Fertil Steril. 2004 Mar; 81 Suppl 1: 786-91. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.09.039

16. Salmassi A, Zhang Z, Schmutzler AG, Koch K, Buck S, Jonat W, et al. Expression of mRNA and protein of macrophage colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. Fertil Steril. 2005 Feb; 83(2): 419-25. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.06.072

17. Yanagi K, Makinoda S, Fujii R, Miyazaki S, Fujita S, Tomizawa H, et al. Cyclic changes of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mRNA in the human follicle during the normal menstrual cycle and immunolocalization of G-CSF protein. Hum Reprod. 2002 Dec; 17(12): 3046-52.

18. Scarpellini F, Sbracia M. Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial. Hum Reprod. 2009 Nov; 24(11): 2703-8. doi: 10.1093/humrep/dep240

19. Lédée N, Frydman R, Osipova A, Taieb J, Gallot V, Lombardelli L, et al. Levels of follicular G-CSF and interleukin-15 appear as noninvasive biomarkers of subsequentsuccessful birth in modified natural in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril. 2011 Jan; 95(1): 94-8. doi: 10.1016/j. fertnstert.2010.03.010

20. Makinoda S, Mikuni M, Furuta I, Okuyama K, Sagawa T, Fujimoto S. Serum concentration of endogenous G-CSF in women during the menstrual cycle and pregnancy. Eur J Clin Invest. 1995 Nov; 25(11): 877-9.

21. Makinoda S, Mikuni M, Sogame M, Kobamatsu Y, Furuta I, Yamada H, et al. Erythropoietin, granulocyte-colony stimulating factor, interleukin-1 beta and interleukin-6 during the normal menstrual cycle. Int J Gynaecol Obstet. 1996 Dec; 55(3): 265-71.

22. Kahyaoglu I, Yılmaz N, Timur H, Inal HA, Erkaya S.

Granulocyte colony-stimulating factor: A relation between serum and follicular fluid levels and in-vitro fertilization outcome in patients with polycystic ovary syndrome. Cytokine. 2015 Jul; 74(1): 113-6. doi: 10.1016/j.cyto.2014.09.002

23. Cai L, Jeon Y, Yoon JD, Hwang SU, Kim E, Park KM, et al. The effects of human recombinant granulocyte-colony stimulating factor treatment during in vitromaturation of porcine oocyte on subsequent embryonic development. Theriogenology. 2015 Oct; 84(7): 1075-87. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.06.008

24. Skaznik-Wikiel ME, McGuire MM, Sukhwani M, Donohue J, Chu T, Krivak TC, et al. Granulocyte colony-stimulating factor with or without stem cell factor extends time to premature ovarian insufficiency in female mice treated with alkylating chemotherapy. Fertil Steril. 2013 Jun; 99(7): 2045-54.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.135

25. Visani G, Manfroi S. G-CSF in the biology and treatment of acute myeloid leukemias. Leukemia & lymphoma. 1995; 18(5-6): 423-28.

26. Patrizio P, Sakkas D. From oocyte to baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of in vitro fertilization. Fertil Steril. 2009 Apr; 91(4): 1061-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.01.003

27. Hock DL, Huhn RD, Kemmann E. Leukocytosis in response to exogenous gonadotrophin stimulation. Hum Reprod. 1997 Oct; 12(10): 2143-6.

28. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. Reprod Biomed Online. 2006 May; 12(5): 608-15.

29. Fujii R, Shibata T, Neyatani N, Waseda T, Makinoda S, Utsunomiya T. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) prevents luteinized unruptured follicle (LUF) caused clomiphene treatment. Fertility and Sterility. 2013; 100(3): S258. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.1087

30. Salmassi A, Schmutzler AG, Schaefer S, Koch K, Hedderich J, Jonat W, et al. Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? Hum Reprod. 2005 Sep; 20(9): 2434-40. doi: 10.1093/humrep/dei071

31. Moqbel R, Hamid Q, Ying S, Barkans J, Hartnell A, Tsicopoulos A, et al. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. J Exp Med. 1991 Sep; 174(3): 749-52.

32. Watari K, Asano S, Shirafuji N, Kodo H, Ozawa K, Takaku F, et al. Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. Blood. 1989 Jan; 73(1): 117-22.

33. Asboe-Hansen G. Endocrine control of connective tissue. Am J Med. 1959 Mar; 26(3): 470-84.

34. Bukulmez O, Arici A. Leukocytes in ovarian function. Hum Reprod Update. 2000 Jan-Feb; 6(1): 1-15.

Original Paper

Effect of exogenous Granulocyte Colony-Stimulating Factor on ovulation and pregnancy rate in NMRI mice

Golshan F (B.Sc)[1], Shahbazi M (Ph.D)[2], Haidari K (Ph.D)*[2,3]

[1]M.Sc Student in Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. [2]Associate Professor, Medical Cellular & Molecular Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. [3]Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Granulocyte colony-stimulating factors (G-CSF) and its receptor express in developing follicles, fetal and reproductive tissues. The serum G-CSF concentration significantly increases during the ovulatory phase in comparison with other phases, so G-CSF may have an important role in ovulation and the early cross-talk between mother and conceptus in both human and animal models. This study was done to evaluate the Effect of exogenous G-CSF on ovulation and pregnancy rate in NMRI mice.

Methods: In this experimental study, 40 mature female and 10 male NMRI mice were randomly allocated into the control and treatment groups. All Ovaries were stimulated with intraperitoneal injections (IP) of 10 IU PMSG and after 48 hour by 10 IU hCG per mouse. The treatment group were recieved G-CSF (50μg/kg i.p.), at the time of PMSG administration, while the control group had the same volume of normal saline instead of G-CSF at the same time. 16-18 hours post-hCG administration, twenty female mice of both groups were sacrificed by cervical dislocation and ovulated oocytes were assessed. On day 16 post coitus, the rest of female mice of both groups were scarificed for withdrawing their fetuses to determine the effect of G-CSF on pregnancy rates.

Results: The ovulation rate in the treatment group (18.5±1.25) were significantly more than that of control (12.1±1.32) ($P<0.05$). The number of fetuses had no significant difference between control and treatment groups.

Conclusion: This study demonstrated that exogenous G-CSF may affect on folliculogenesis and ovulation but the following pregnancy outcome was not impressed.

Keywords: Granulocyte colony-stimulating factor, Ovulation, Mouse

*** Corresponding Author: Haidari K (Ph.D), E-mail: haidarikamran@goums.ac.ir**

Received 25 May 2016 **Revised** 24 Jan 2017 **Accepted** 25 Jan 2017

Cite this article as: Golshan F, Shahbazi M, Haidari K. [Effect of exogenous Granulocyte Colony-Stimulating Factor on ovulation and pregnancy rate in NMRI mice]. J Gorgan Uni Med Sci. Summer 2017; 19(2): 32-37. [Article in Persian]