جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Original Article

The Effect of Vero Cells Co-Culture on In Vitro Maturation of Bovine Immature Oocytes and Further Embryo Development

MH. Nasr-Esfahani, Ph.D.[:], F. Moulavi, B.Sc., SM. Hosseini, D.V.M., M. Hajian, M.Sc., A. Shahverdi, Ph.D.

Embryology Department, Royan Institute

[:] *Corresponding Address: P.O.Box:19395-4644, Embryology Department, Royan Institute*
Tehran, Iran
Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

Abstract

Received: 8/Jan/2007, Accepted: 6/Aug/2007

Objective: This study was carried out to examine the effect of vero cells co-culture on developmental competence of immature oocytes.

Materials and Methods: Bovine cumulus-oocyte-complexes (COCs) were matured in either presence or absence of vero cells. Matured oocytes were inseminated and cultured for up to nine days. Cleavage percentages were recorded on day two post insemination (pi). Embryos were evaluated on daily basis till 9pi. Expanding/expanded and hatching/hatched blastocysts were used for cell number assay.

Results: The results indicated a significantl increase in the cleavage number in oocytes matured in the presence of vero cells than that of the control (86% vs. 76%). The percentages of advanced embryos appear to be greater on a daily basis in COCs matured in the presence of vero cells compared to those of the control. However, these differences were not significant. Blastocysts derived from COCs matured in the presence of vero cells had a significantly higher number of inner cell mass, trophectoderm and total cell number in expanding/expand and hatching/hatched embryos in comparison to those of the control.

Conclusion: Results confirm that co-culture of bovine COCs, during *in vitro* maturation, enhances the potential for cleavage and for producing blastocysts with higher quality.

Keywords: Vero Cells, Cleavage, Bovine Oocytes, Blastocyst Quality

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 4, Winter 2008, Pages: 240-247

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اثر هم کشتی سلول های Vero بر بلوغ تخمک های نارس گاوی و تکوین جنینی حاصله

محمد حسین نصر اصفهانی .Ph.D ، فریبا مولوی .B.Sc، سید مرتضی حسینی .D.V.M، مهدی حاجیان .M.Sc، عبدالحسین شاهوردی .Ph.D

پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

: آدرس مکاتبه : تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

پست الکترونیک: Email: mh_nasr@med.ui.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۱۰/۱۸، پذیرش مقاله: ۸۶/۵/۱۵

* **هدف:** بررسی اثر هم‌کشتی سلول‌های vero بر روی توان تکامل آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ گاو

* **مواد و روش‌ها:** توده سلول‌های کومولوس- اووسیت (Cumulus Oocyte Complexes: COCs) گاوی در حضور (گروه درمان) و بدون حضور (کنترل) سلول‌های vero بالغ شد. تخمک‌های بالغ شده پس از لقاح به مدت ۹ روز کشت داده شدند. درصد کلیواژ روز دوم بعد از لقاح و پیشرفت جنینی به صورت روزانه بررسی شد. جنین‌های بلاستوسیست که به مرحله اتساع و شکوفایی (expanding/expand و Hatching/hatched) رسیده بودند برای شمارش سلولی استفاده شدند.

* **یافته‌ها:** درصد کلیواژ تخمک‌هایی که در حضور سلول‌های vero بالغ شده‌اند به طور چشمگیری بالاتر از گروه کنترل بود (۸۶ درصد در مقابل ۷۶ درصد $p \leq ۰/۰۵$). بررسی روزانه موید درصد بالاتر تکوین جنینی در گروه درمان نسبت به گروه کنترل بود. هر چند این اختلاف در حد چشم‌گیری نبود. همچنین تعداد سلول‌های توده داخلی، تروفکتودرم و تعداد کل سلول بالاتری در جنین‌های متسع و شکوفا نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصله بیانگر آن است که هم کشتی COCهای گاو طی بلوغ آزمایشگاهی توان آنها را برای تسهیم (کلیواژ) و تولید بلاستوسیست‌های با کیفیت بالاتر افزایش می‌دهد.

کلیدواژگان: سلول‌های Vero، کلیواژ، تخمک‌های گاو، کیفیت بلاستوسیست

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ٤، زمستان ۸۶، صفحات: ۲٤۷-۲٤۰

مقدمه

از زمان تولد اولین گوساله حاصل از لقاح آزمایشگاهی (IVF) در سال ۱۹۸۱ (۱)، پیشرفت‌های شایانی در تکامل تکنیک‌های تولید آزمایشگاهی جنین‌های گاو چه در عرصه تحقیقات و چه در زمینه اهداف تجاری انجام پذیرفته است (۲).

با این وجود، میزان استحصال جنین بلاستوسیست پایین و در حد ۴۰-۳۰ درصد است (۳) که هنوز نسبت به آنچه در روش طبیعی (*In vivo*) وجود دارد پایین است (۴). افزون بر این، کیفیت جنین‌های حاصله از IVF، از لحاظ مورفولوژیک، حساسیت بالاتر به شوک سرما و میزان لانه‌گزینی و ابقا، پایین‌تر از جنین‌های تولید شده به روش طبیعی (*In vivo*) است (۵، ۶).

عوامل گوناگونی از قبیل کیفیت تخمک، منبع پروتئین، سلول‌های سوماتیک، محیط کشت، میزان اکسیژن، تعداد جنین‌ها در واحد کشت (تراکم جنین) و منبع انرژی ممکن است بر کیفیت ماقبل لانه‌گزینی جنین و توان تکامل بعدی آن اثر داشته باشند (۲، ۷، ۸).

هم‌کشتی (Co culture) از جمله روش‌هایی است که به دلیل ضعف محیط‌های کشت ساده در حمایت از تکوین جنین در مرحله کلیواژ و لانه‌گزینی (۱۱-۹)، جهت تولید آزمایشگاهی حیوانات (۱۲) و حتی انسان، همچنین تا پیش از گسترش محیط‌های کشت متوالی (Sequential) جهت بهبود درمان‌های ناباروری (۱۳)، به عنوان بهترین سیستم کشت آزمایشگاهی جنین مورد استفاده بوده است. اما ابداع و گسترش محیط‌های متوالی کشت جنین موجب کاهش استفاده از سیستم هم‌کشتی شده است.

مطالعات متعددی بر پایه مزایای لایه سلولی (Cellular mono layers) متشکل از انواع مختلف سلول‌های سوماتیک در تکوین آزمایشگاهی جنین پستانداران انجام پذیرفته است (۱۶-۱۴).

از جمله مزایای سیستم هم‌کشتی می‌توان ترشح فاکتورهای محرک رشد همچون مواد مغذی، سوبستراهای گوناگون، فاکتورهای رشد و سایتوکاین، حذف مواد سمی از محیط کشت توسط سلول‌های موجود در لایه هم‌کشتی را نام برد (۱۷، ۱۸). بر همین اساس انواع گوناگونی از سلول‌های سوماتیک، نظیر سلول‌های گرانولوزا (Granulose cells)، اویداکتی (Oviductal cells)، رحمی (Uterine cells)، سلول‌های فیبروبلاستی آندومتر جنین گاو (Bovine endometrial fetal fibroblast cells)، سلول‌های vero یا اپی‌تلیال کلیه میمون سبز آفریقایی (Vero cells: African green monkey kidney epithelial cells)، این سیستم استفاده می‌شوند (۱۹، ۲۰). از همه این سلول‌ها به عنوان لایه تغذیه کننده (Feeder cells) استفاده شده است که به عنوان هم‌کشتی قادر به بهبود تکوین آزمایشگاهی زیگوت‌های گاو (bovine zygotes) در مقایسه با محیط‌های کشت فاقد این سلول‌ها هستند (۲۱). سلول‌های vero که از کلیه میمون سبز آفریقایی (Cercopithecus aethiops) مشتق شده‌اند دارای

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

منشاء جنینی مشترک (مزودرم) با سلول‌های مشتق از دستگاه تناسلی هستند (۲۲). همچنین استفاده از این سلول‌ها بسیار آسان و معمول بوده است و کیفیت کشت آزمایشگاهی جنین را بهبود می‌بخشد.

بنابراین انجام هم‌کشتی با استفاده از سلول‌های vero می‌تواند به طور گسترده‌ای برای افزایش حیات و تکوین جنین مورد استفاده قرار گیرد (۲۲، ۲۳). اگرچه اثرات مفید هم‌کشتی بر بهبود کیفیت جنین حاصل از IVF مسلم است اما تقریبا تمام گزارش‌های موجود مربوط به استفاده هم‌کشتی برای تکوین زیگوت تا مرحله بلاستوسیست است و هیچ گزارشی در زمینه اثر هم‌کشتی بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک گاو وجود ندارد. لذا با توجه به اهمیت بنیادی بلوغ مناسب تخمک‌ها برای بهبود تکوین بعدی آزمایشگاهی جنین، این مطالعه برای مقایسه توان تکامل تخمک‌های گاوی که در حضور یا عدم حضور سلول‌های vero بالغ شده بودند انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی به جز موارد ذکر شده از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) تهیه شد.

محیط‌های کشت

محیط‌های کشت مورد استفاده برای بلوغ تخمک‌ها و نیز تکوین آزمایشگاهی زیگوت‌ها بر اساس محیط کشت (Tissue Culture Medium 199: TCM 199) غنی‌سازی شده با ۱۰درصد سرم غیرفعال شده (Heat-inactivated) جنین گاو (Fetal Calf Serum: FCS) بود. برای انجام بلوغ آزمایشگاهی، TCM 199 با هورمون‌های معمول مورد استفاده از جمله FSH (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، LH (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و 17-β-estradiol (۱میکرو گرم بر میلی‌لیتر) تکمیل شد (۱، ۳، ۴).

تهیه و نگهداری مونولایر سلول‌های Vero

پس از ذوب ویال‌های حاوی سلول‌های **vero** (تهیه شده از پژوهشکده رویان)، سلول‌های حاصله درون فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع (فالکون) حاوی محیط TCM 199 در غلظت $۱×۱۰^۶$ میلی‌لیتر و در شرایط ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، ۵درصد CO_2 و رطوبت ماکزیمم کشت داده شدند. بعد از ایجاد تراکم سلولی (Confluency) در روز سوم تا چهارم بعد از کشت، محیط کشت و سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیده بودند حذف شدند و با انجام تریپسینازسیون (Trypsinization) با استفاده از ترکیب ۲۵درصدی Trypsin-EDTA، سلول‌های به دست آمده، برای کشت مجدد و نیز برای تهیه قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری بلوغ حاوی غلظت $۲×۱۰^۴$ سلولی vero استفاده شد. حدود ۲ ساعت قبل از بلوغ اووسیت‌ها، محیط قطره‌های حاوی سلول‌های vero با محیط بلوغ از قبل انکوبه و تعویض (Refresh) شد.

دست‌یابی به تخمک‌ها و انجام بلوغ آزمایشگاهی

بلافاصله بعد از کشتار، تخمدان‌های گاو از یک کشتارگاه محلی جمع‌آوری و در محلول نرمال سالین ۰/۹درصد (۳۰ درجه سانتی‌گراد) که حاوی آنتی‌بیوتیک (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Streptomycin، ۱۰۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر Penicilin) بود به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه، توده‌های سلول‌های کومولوس- اووسیت (COCs) از فولیکول‌های شفاف (Transparent) در اندازه‌های ۸-۲ میلی‌متر آسپیره شدند. تنها COCهایی که حاوی سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت احاطه شده با بیش از سه لایه سلولی کومولوس بودند، انتخاب شدند.

طرح آزمایشی

COCهای انتخاب شده در محیط Hepes-TCM 199 و نیز محیط بلوغ، که حاوی (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) FSH، (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) LH و (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) 17-β-estradiol بودند، به طور کامل شستشو داده شدند، سپس به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند: هر ۵ COC مدت ۲۴ ساعت در ۱۰۰ میکرولیتر محیط بلوغ حاوی مونولایر سلول‌های vero (درمان) و یا فاقد آن (کنترل) در شرایط ۹۰ درصد رطوبت، ۳۸/۶درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد Co_2 کشت داده شد. این طرح شامل ۱۰ تکرار و هر کدام حاوی ۴۰-۳۰ COC بود.

تعیین وضعیت بلوغ

در پایان دوره بلوغ، وضعیت هسته‌ای بعضی از تخمک‌های بالغ شده با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI (6-Dimethylaminopurine) و طبق روش ایزدیار و همکارانش (۲۴) ارزیابی شد. به طور مختصر COCها با استفاده از ۷-۳ دقیقه ورتکس از سلول‌های کومولوس اطراف عاری و سپس در گلوتارآلدئید ۲/۵درصد (w/v) برای مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند. تخمک‌های فیکس شده سپس در PBS شستشو داده شدند و با رنگ DAPI واجد غلظت ۲/۵درصد (w/v) رنگ‌آمیزی شدند و روی اسلایدهای مورد نظر قرار گرفتند. وضعیت هسته‌ای تخمک‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی و مطابق روش موری و همکاران (۲۵) در یکی از وضعیت‌های (Germinal Vesicle: GV) عدم رخداد بلوغ، (Germinal Vesicle Break Down: GVBD) مراحل ابتدای شروع روند بلوغ، (Metaphase one of the meiosis resumption: MI) مرحله میانی بلوغ و (Metaphase two arrested oocyte: MII) بلوغ کامل هسته‌ای تخمک ثبت شد.

آماده‌سازی اسپرم و انجام لقاح آزمایشگاهی

در سراسر این مطالعه از ویال‌های سیمن منجمد دو گاو هلشتاین با باروری بالا که به صورت تجاری موجود بود استفاده شد. جهت انجام IVF، پس از دو بار شستشو، COCهای بالغ در گروه‌های ۲۵ تا ۳۰ تایی به قطره‌های ۲۰۰ میکرولیتری محیط لقاح پوشیده شده با روغن مینرال منتقل شدند. محیط لقاح متشکل از Fert-TALP (۲۶) غنی‌سازی شده با Penicillamine (۲۰میکرومولار)، Hypotaurine (۱۰ میکرومولار)، Epinephrine (۱ میکرومولار) و Heparin (۰/۵۶ میکرومولار بر میلی‌لیتر) بود.

پس از ذوب سیمن در آب ۳۷درجه سانتی‌گراد، اسپرم‌های متحرک با استفاده از تکنیک Swim up جداسازی و در غلظت نهایی $۱۰×۱۰^۶$ میلی‌لیتر به قطره‌های لقاح افزوده شدند. مجموعه اسپرم و تخمک‌ها به مدت ۲۰ ساعت در شرایط ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد،

۵ درصد CO_2 و رطوبت ماکزیمم انکوبه شدند.

کشت آزمایشگاهی (*In-vitro culture*)

از آنجا که مشاهده پیش‌هسته‌ها (pronucleus) درتخمک‌های لقاح یافته گاو به دلیل گرانولاسیون فوق‌العاده سیتوپلاسم امکان‌پذیر نیست، تمام زیگوت‌های فرضی حاصل از تخمک‌های بالغ شده در حضور vero یا عدم حضور (کنترل) سلول‌های vero جهت بررسی تسهیم (کلیواژ) عاری از توده سلول‌های کومولوس متسع خود شدند. پس از شستشو تمامی زیگوت‌های فرضی هر دو گروه در محیط ۱۰درصد TCM 199+FCS حاوی سلول‌های vero در شرایط ۹۰درصد رطوبت، دمای ۳۸/۶درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2، ۵ درصد O_2 کشت داده شدند. در طول دوره کشت، جنین‌ها به صورت روزانه به دیش‌های جدید حاوی سلول‌های vero انتقال داده می‌شدند. این انتقال روزانه به این خاطر بود که به نظر می‌رسد هر بار که سلول‌های vero در معرض شوک تریپسینه شدن (Trypsinization) قرار بگیرند یک‌سری پروتیین‌های استرسی غیراختصاصی آزاد می‌کنند که اثرات مفیدی بر توانایی بقا جنین‌ها دارد (۱۸).

ارزیابی جنین‌ها

تمامی زیگوت‌های فرضی برای یک دوره ۹-۸ روزه (روز لقاح=روز صفر) در حضور سلول‌های vero و در شرایط ۳۸/۶درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2، ۵ درصد O_2 و رطوبت ۹۰درصد کشت داده شدند. پیشرفت جنین‌ها روزانه به صورت تسهیم یافته (Cleaved) ۲، ۴، ۸، ۱۶/۸ سلولی، مورولا، کامپکت (Compact)، بلاستوسیست اولیه، متسع، در حال شکوفایی و شکوفا ثبت می‌شد.

رنگ‌آمیزی افتراقی جنین‌ها

در پایان دوره کشت جنین (روز نهم)، تعداد سلول‌های بعضی از بلاستوسیست‌های کاملا تکامل یافته هر دو گروه با استفاده از رنگ‌آمیزی افتراقی و بر اساس روش توآس و همکارانش (۲۷) مورد ارزیابی قرار گرفت.

به طور خلاصه، بلاستوسیست‌ها، ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۱درصد تریتون ×۱۰۰ و propidium iodide ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انکوبه و بلافاصله درون ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰۰درصد اتانول حاوی bisbenzimide (Hoechst 33258) ۲۵میکروگرم بر میلی‌لیتر در دمای ۴درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرار داده شدند.

جنین‌هایی که به روش فوق تثبیت و رنگ‌آمیزی شده بودند روی لام‌های شیشه‌ای که حاوی یک قطره گلیسرول بود قرار داده شد و به آرامی با یک لامل به حالت پهن شده در آمدند. سپس تعداد سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (قدرت Excitation فیلترها برای سلول‌هایی که به رنگ آبی بودند ۴۶۰ نانومتر و برای قرمز ۵۶۰ نانومتر است) (شکل ۱).

آنالیز آماری

اختلاف مشاهده شده بین گروه‌ها آزمون t-test و یا chi-square توسط نرم‌افزار SPSS بررسی و تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها در $p\leq ۰/۰۵$ درصد محاسبه شد.

یافته‌ها

آزمون ۱: مقایسه وضعیت کروماتین تخمک‌های بالغ شده در حضور سلول‌های vero و گروه کنترل

این نتایج که در جدول ۱ خلاصه شده است، بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار (Chi-square $p\leq ۰/۰۵$ درصد) در درصد تخمک‌های بالغ واقع در مراحل MII, MI, GVBD, GV بین دو گروه است.

جدول ۱ : وضعیت هسته‌ای تخمک‌های بالغ شده در حضور یا عدم حضور سلول‌های vero با استفاده از رنگ‌آمیزی triton X-۱۰۰/DAPI. نتایج سه تکرار ارائه شده است. GV (عدم رخداد بلوغ)، GVBD (مراحل ابتدای شروع روند بلوغ)، MI (مرحله میانی بلوغ) و MII (بلوغ کامل هسته‌ای اووسیت). نتایج هیچ اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان نمی‌دهد ($p\leq ۰/۰۵$)

بلوغ در	وضعیت هسته‌ای			
	GV (٪)	GVBD (٪)	MI (٪)	MII (٪)
حضور سلول‌های vero	۲/۲۵	۳/۷۵	۵	۸۹
عدم حضور سلول‌های vero	۲/۱	۳	۷/٤	۸۷/۵

آزمون ۲: توان تکامل تخمک‌های بالغ شده در شرایط حضور یا عدم حضور سلول‌های vero

جدول ۲ تعداد و درصد تخمک‌های لقاح یافته هر دو گروه را که قادر به تسهیم و پیشرفت تا مراحل مختلف تکوین جنینی بوده‌اند نشان می‌دهد.

این نتایج بیانگر آن است که میانگین تسهیم روز دوم کشت جنینی در تخمک‌هایی که در حضور سلول‌های vero بالغ شده‌اند به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل است (۸۶/۳۲ درصد در مقابل ۷۶/۳۲درصد در t-test $p\leq ۰/۰۵$ درصد). از روز سوم به بعد، درصد تکوین جنین در COCهای بالغ شده در حضور سلول‌های vero بیشتر از گروه کنترل بود. هر چند که این تفاوت‌ها معنی‌دار نبود (شکل ۲).

جدول ۲: درصد کلیواژ، تعداد کلی بلاستوسیست و بلاستوسیست های شکوفا حاصل از COCهای بالغ شده در شرایط حضور یا عدم حضور سلول های vero

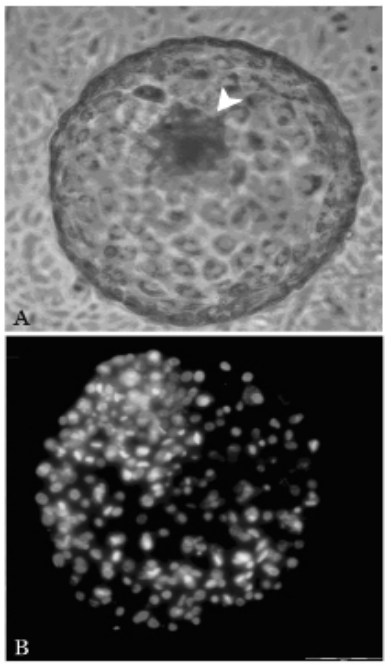
بلوغ در	تعداد زیگوت‌های فرضی	کلیواژ (%±SD)	کلیواژ/تعداد بلاستوسیست (%±SD)	کلیواژ/تعداد جنین شکوفا (%±SD)
حضور سلول های vero	۳۴۵	۸۶/۳۲±۹/۰۱[a]	۴۳/۰۷±۷/۴۴	۱۹/۸۸±۱۰/۶۹
عدم حضور سلول های vero	۳۶۱	۷۶/۳۲±۱۰/۷۱[b]	۳۵/۸۵±۱۳/۴۴	۱۶/۲۸±۱۰/۳۲

a و b: اختلاف معنی داری ($p\leq ۰/۰۵$)

جدول ۳: تعداد سلول های توده داخلی (ICM)، تروفکتودرم (TE) و تعداد کلی سلولی (TCN) در بلاستوسیست های (Bis) حاصل از بلوغ تخمک ها در شرایط حضور یا عدم حضور سلول های vero روز نهم بعد از لقاح

درمان ها	متسع یافته/بلاستوسیست در حال اتساع		شکوفا/بلاستوسیست در حال شکوفا	
سلول vero	عدم حضور	حضور	عدم حضور	حضور
تعداد بلاستوسیست	۲۰	۲۲	۱۹	۲۵
تعداد کل سلول	۲۴۵/۵±۹/۲[a]	۲۸۹/۷±۶/۶[b]	۳۱۶/۳±۷/۴[a]	۳۵۷/۵±۱۳[b]
تعداد ICM	۴۲±۱/۴[a]	۶۵/۲۵±۲/۸[b]	۵۱/۳±۲/۰۸[a]	۶۷/۷۵±۲/۷۵[b]
تعداد TE	۲۰۳/۵±۷/۸[a]	۲۲۴/۵±۵/۴[b]	۲۶۵±۵/۵۷[a]	۲۸۹/۷۵±۱۱/۸[b]
ICM/TCN(٪)	٪۱۷/۱	٪۲۲/۵	٪۱۶/۲	٪۱۸/۹۵
نسبت ICM به TE	۱:۴/۸۴	۱:۳/۴۳	۱:۵/۱۶	۱:۴/۲۸

a و b: اختلاف معنی داری (p≤ ۰/۰۵)



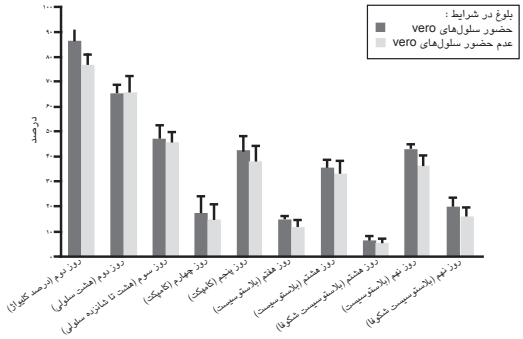
تصویر ۱: (A) تصویر یک جنین بلاستوسیست شکوفا (Hatched) در روز نهم، که بر روی سلول‌های Vero کشت داده شده است. پیکان سفید نشان‌دهنده inner cell mass است. (B) تصویری از همان جنین که با استفاده از Triton X-100/propidium iodide و Ethanol/Hoechst رنگ‌آمیزی افتراقی شده است.

در روز نهم، درصد کلی تعداد بلاستوسیست‌ها و نیز تعداد بلاستوسیست‌های متسع و شکوفا حاصل از گروه درمان به ترتیب ۴۳/۰۸ و ۱۹/۸۸ درصد بود که به میزان اندک ولی غیرمعنی‌داری بیشتر از گروه کنترل (به ترتیب ۳۵/۸۵ و ۱۶/۲۸ درصد) بود. به نظر می‌رسد که بلوغ تخمک‌های گاو در حضور سلول‌های vero توان لقاحی آنها را افزایش داده است.

آزمون ۳: اثر هم کشتی سلول‌های vero در طی بلوغ تخمک‌های گاو بر تعداد سلول‌های توده داخلی (Inner Cell Mass)، تروفکتودرم و تعداد کل سلول‌های جنینی

کیفیت جنین‌های متسع (Expanding/expand) و شکوفا (Hatching/hatched) حاصله در روز نهم کشت در هر دو گروه با محاسبه تعداد کلی سلول‌های جنینی (Total cell number: TCN) حاصل از مجموع تعداد سلول‌های توده داخلی (ICM) و تروفکتودرم (TE) بررسی شد.

همان‌گونه که در جدول ۳ دیده می‌شود تعداد سلول‌های ICM و نیز TE در جنین‌های حاصله از تخمک‌هایی که در حضور سلول‌های vero بالغ شده بودند بالاتر از گروه کنترل است. جالب توجه آن که نسبت ICM/TE و نیز درصد ICM/TCN بلاستوسیت‌های متسع و نیز شکوفا۰ (روز نهم کشت جنین) در COCهای بالغ شده در حضور سلول‌های vero بالاتر از گروه مقابل است.



تصویر ۲: مراحل مختلف پیشرفت جنینی، پس از بلوغ آنها در شرایط حضور و یا عدم حضور سلول‌های Vero، از روز دوم تا نهم بعد از لقاح. (a, b) با هم اختلاف معنی دار دارند (p≤۰/۰۵).

بحث

تک لایه (Monolayer) سلول‌های vero به جهت سهولت دست‌یابی و کشت و نیز به دلیل اثرات مفید آن بر رشد جنین، به فراوانی جهت افزایش توان تکامل آزمایشگاهی جنین به کار رفته است (۲۸). افزون بر این، هم‌کشتی جنین یک سیستم مناسب برای تولید جنین با مقاصد اقتصادی است (۱۶). همچنین سلول‌های بنیادی جنینی نیز روی ماتریکس حاصله از سلول‌های فیبروبلاست کشت داده می‌شوند. در همین راستا اولین رده سلول‌های بنیادی انسان بر روی سلول‌های غیرفعال شده فیبروبلاست جنین موش که به عنوان سلول‌های تغذیه کننده (Feeder cells) استفاده شده بودند کشت داده شد (۲۹). این سلول‌های تغذیه کننده محیطی ایده‌آل برای رشد و نگهداری سلول‌های بنیادی جنینی انسان تولید می‌کنند. چرا که، ضمن سم‌زدایی (Detoxification) محیط کشت، قادر به ترشح پروتئین‌های

گوناگون هستند، و نیز ماتریکس خارج سلولی را بازسازی (Remodel) می‌کنند (۳۰).

برخی از مطالعات به بررسی اثر هم‌کشتی بر بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک‌های اولیه (Primary) که جهت برنامه‌های IVF به کار می‌روند در چند گونه محدود از جمله اسب (۳۱)، سگ (۳۲) و تخمک‌های فاقد کومولوس مرحله GV انسان (۳۳) پرداخته‌اند. نتایج این محققان بیانگر آن است که متعاقب هم‌کشتی تخمک‌ها در طی بلوغ با سلول‌های سوماتیک، درصد لقاح و تکوین آزمایشگاهی بهبود می‌یابد.

بر پایه اطلاعات موجود به نظر می‌رسد، مطالعه حاضر نخستین مورد در جهت بررسی اثر هم‌کشتی سلول‌های vero طی بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های گاو است. COCهای نابالغ در شرایط حضور یا عدم حضور سلول‌های vero به مدت ۲۴ ساعت کشت و سپس تمام زیگوت‌های فرضی در محیط TCM در حضور سلول‌های vero قرار داده شدند. بنابراین، تنها تفاوت بین دو گروه در روند بلوغ در حضور شرایط یا عدم حضور تک لایه سلول‌های vero نهفته بود (شکل ۳). نتایج این مطالعه مبین آن است که بلوغ تخمک‌ها در حضور سلول‌های vero منجر به بهبود توان لقاح و یا میزان تسهیم آنها می‌شود و لذا تعداد زیگوت‌های تسهیم یافته با احتساب تعداد تخمک‌های لقاح یافته افزایش می‌یابد (شکل ۲، جدول ۲).

نتایج شمارش تعداد کلی سلول در جنین‌های حاصل از گروه درمان به طور چشم‌گیری بالاتر از گروه کنترل است. افزون بر این، نسبت ICM/TE در این گروه بالاتر از گروه کنترل است که مبین کیفیت بهتر جنین‌های تولید شده در گروه درمان است (جدول ۳).

افزایش چشم‌گیر تعداد زیگوت‌های تسهیم شده در گروه درمان در مقایسه با گروه کنترل میتواند مرتبط با بهبود بلوغ هسته‌ای یا سیتوپلاسمی تخمک باشد. ولی با توجه به اینکه هیچ تفاوتی در میزان بلوغ هسته‌ای دو گروه مشاهده نشده، نقش بلوغ سیتوپلاسمی بهتر گروه درمان در بهبود میزان لقاح و تکوین جنینی مشخص‌تر می‌شود. در همین ارتباط، لی و همکارانش (۳۱) به بررسی اثر هم‌کشتی در زمان بلوغ تخمک‌های اسب بر توان آنها بعد از تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم پرداختند. به طور مشابه آنها نیز تفاوت چشم‌گیری در، درصد تخمک‌های مرحله متافاز II(MII) در تخمک‌هایی که در محیط TCM 199 در شرایط حضور یا عدم حضور هم‌کشتی بالغ شده بودند مشاهده نکردند. به زعم آنان، بلوغ تخمک در حضور هم‌کشتی با ایجاد تقارن مناسب بین بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی می‌تواند تداخل اثر اسپرم-تخمک را بهبود بخشد. به همین ترتیب بالابان و اورامان (۳۴) نیز پیشنهاد کرده‌اند که خصوصیات سیتوپلاسمی تخمک‌ها اثر تعیین کننده‌تری بر لقاح و تکوین بعدی آن خواهد داشت تا عوامل خارج سیتوپلاسمایی از قبیل حضور جسم قطبی، فضای اطراف زرده‌ای (perivitelline space) و تیرگی زوناپلوسیدا (dark zona pelucida). بنابراین میزان لقاح بالاتر و نیز کیفیت بهتر بلاستوسیت‌های مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از اثر هم‌کشتی بر بلوغ سیتوپلاسمی باشد.

تعداد کلی سلول‌های جنینی (TCN) به عنوان یکی از مهمترین معیارهای توان تکوین پس از لانه‌گزینی (post-implantation developmental capacity) جنین‌های تولید شده در آزمایشگاه است (۳۵). از آنجا که نتایج شمارش سلولی در جنین‌های حاصل از تخمک‌های بالغ شده در حضور سلول‌های vero بالاتر از گروه کنترل است می‌توان گفت که بلوغ تخمک در حضور سلول‌های vero می‌تواند باعث بهبود توان آن برای لقاح و تکوین شود و نیز کنیتیک تکوین جنین بسته به سیستم کشت متفاوت خواهد بود. با نگاه به تصویر شماره ۲ نیز مشخص می‌شود که در طی مطالعه حاضر، گروه درمان دارای یک میل نسبی برای تولید بلاستوسیت‌های بیشتر در مقایسه با گروه کنترل است هر چند که این تفاوت چشم‌گیر نیست.

علی‌رغم گزارش‌های متعدد موجود در زمینه اثرات مفید هم‌کشتی سلول‌های vero بر تکوین جنین انسان و حیوان، مکانیسم دقیق القای این گونه اثرات هنوز مشخص نیست. یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی در این زمینه مربوط به غلبه برتوقف تکاملی (Developmental block) است (۳۶) که معمولا در طی دوره‌های اول تکوین آزمایشگاهی جنین اکثر پستانداران اتفاق میافتد (۷، ۳۷). این ایست تکاملی ممکن است به واسطه ترشح فاکتورهای رشد جنین و یا از طریق خنثی‌سازی و سم‌زدایی محیط کشت توسط هم‌کشتی باشد (۳۸). بنابراین، به نظر می‌رسد مکانیسم مذکور باعث افزایش میزان کلیواژ مشاهده شده گردیده است. جالب آن که جانسن ویلن و همکارانش (۳۳) نشان داده‌اند هم‌کشتی با سلول‌های vero می‌تواند باعث بهبود بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های فاقد کومولوس (Cumulus-free) انسانی واقع در مرحله GV شود. تحقیقات مختلف بیانگر آن است که سلول‌های vero در تولید و رهاسازی اینترلوکین، فاکتور رشد مشتق از پلاکت (Platelet Derived Growth Factor: PDGF)، (Leukemia Inhibitory Factor: LIF) و نیز فاکتور رشد شبه انسولین (Insulin–Like Growth Factor: ILGF) نقش داشته (۱۷) و نیز COC گاو همانند جنین آن گیرنده‌هایی برای انسولین، IGF-1، IGF-2R و فاکتور رشد اپیدرمی دارد (۳۶). همچنین در گونه‌هایی از پستانداران از قبیل موش، رت، خرگوش، خوک و گاو تنظیم بلوغ تخمک توسط فاکتورهای رشد شرح داده شده است (۳۹). در همین راستا IGF-I باعث تحرک بلوغ تخمک‌های دوزیستان (Xenopus)، بهبود بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک گاو (۴۰، ۴۱) و نیز تحریک تکوین بلاستوسیست خرگوش (۴۲) می‌شود. این ماده نقش مهمی در بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک‌ها دارد. در این مطالعات، بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای با معیارهای تسهیم پارتنوژنیک و شکل‌گیری بلاستوسیست ارزیابی شده بود (۴۲). لذا می‌توان گفت که فاکتورهای رشدی از قبیل IGF-1 و فاکتور رشد اپیدرمی می‌تواند باعث بهبود بلوغ سیتوپلاسمی و نیز هسته‌ای در بسیاری از گونه‌ها از جمله تخمک‌های گاو شود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصله در مجموع موید آن است که استفاده از سلول‌های vero یک روش مناسب برای بلوغ تخمک‌های گاو و تولید جنین‌های مرغوب است. اعتقاد مولف آن است که هم‌کشتی اولیه تخمک‌های نابالغ گاو با سلول‌های vero با ایجاد مسیرهای خاص منجر به بهبود کیفیت جنینی با احتساب تعداد بیشتر سلول‌های ICM در مقایسه به TE می‌شود. همچنین ارزیابی قابلیت انتقال (Transferability)، لانه‌گزینی (Implantation) و آبستنی متعاقب انتقال جنین‌های حاصله از تخمک‌های بالغ شده در

حضور سلول‌های vero می‌تواند راهبردی باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با استفاده از حمایت مالی پژوهشکده رویان انجام پذیرفت. مولفین ضمن درود به روان دکتر سعید کاظمی آشتیانی، از کمک‌های بی‌دریغ دکتر احمد وثوق معاون محترم پشتیبانی پژوهشکده رویان قدردانی می کنند.

References

1. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol Reprod, 1982; 27: 147-158
2. Khurana NK, Niemann H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. Theriogenology, 2000; 54: 741-756
3. Kreysing U, Nagai T, Niemann H. Male dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine in vitro fertilization systems and the effects of casein phosphopeptides (CPPs). Reprod Fertil Dev, 1997; 9: 465-474
4. Krisher RL, Lane M, Bavister BD. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. Biol Reprod, 1999; 60: 1345-1352
5. Wright RW Jr, Elington J. Morphological and physiological differences between in vivo and in vitro produced preimplantation embryos from livestock species. Theriogenology, 1995; 44: 1167-1189
6. Thompson JG, Sherman ANM, alen Nw, Mc Gowan LT, Tervit HR. Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. Mol Reprod Dev, 1998; 50: 139-145
7. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Hum Reprod Update, 1995; 1: 91-148
8. Abdoon ASS, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T. Influence of oocyte quality, culture media and gonadotropins on cleavage rate and development of in vitro fertilized buffalo embryos. Anim Reprod Sci, 2001; 65: 215-223
9. Myers MW, Broussard JR, Menezo Y, prough SG, Blackwell J, Jodke RA, Thibodeaux JK. Established cell lines and their in vitro conditioned media support bovine embryo development during in-vitro culture. Hum Reprod, 1994; 9(10): 1927-1931
10. Menezo YJ, Sakkas D, Janny L. Co-culture of the early human embryo: factors affecting human blastocyst formation in vitro. Microsc Res Tech, 1995; 32: 50-56
11. Fong CY, Bongso A. Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential culture media with or without co-culture. Hum Reprod, 1999; 14: 774-781
12. Camous S, Heyman Y, Meziou W, Menezo Y. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. J Reprod Fertil, 1984; 72: 479-485
13. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. Hum Reprod, 1998; 13: 3434–3440
14. Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH. Bovine 1-2 –cell embryo development using a single medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. Biol Reprod, 1990; 43: 97-104
15. Menezo YJR, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayers of vero cells. Biol Reprod, 1990; 42: 301-306
16. Rief S, Sinowatz F, Stojkovic M, Einspainer R, Wolf E, Prelle K. Effect of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro. Reproduction, 2002; 124: 543-556
17. Joo BS, Kim MK, Na YJ, Moon HS, Lee KS, Kim HD. The mechanism of action of co-culture on embryo development in the mouse model: direct embryo- to-cell contact and the removal of deleterious components. Fertil Steril, 2001; 72: 193-199
18. Kim YB, Ahn SH, Chang DY, Chung KN, Koh JW. Vero cell co-culture counteracts the detrimental effects of hydrosalpinx fluid on the development of mouse embryos in vitro. J Korean med sci, 2002; 17: 217-219
19. Maeda J, Kotsuji F, Negami A, Kamitani N, Tominaga T. In vitro development of bovine embryos in conditioned media from bovine granulosa cells and vero cells cultured in exogenous protein and amino acid-free chemically defined human tubal fluid medium. Biol Reprod, 1996; 54: 930-936
20. Lee YL, Xu JS, Chan ST, Ho PC, Yeung WS. Vero cells, but not oviductal cells, increase the hatching frequency and total cell count of mouse blastocysts partly by changing energy substrate concentrations in culture medium. J Assist Reprod Gen, 2001; 18(10): 566-574
21. Menck MC, Guyader-Joly C, Peynot N, Le Bourhis D, Lobo RB, Renard JP, Heyman Y. Beneficial effects of vero cells for developing IVF bovine eggs in two different co culture systems. Reprod Nutr Dev, 1997; 37: 141-150
22. Duszewska AM, Reklewski Z, Pienkowski M, Karasiewicz J, Modlinski JA. Development of bovine embryos on vero/BRL cell monolayers (mixed co-

culture). Theriogenology, 2000; 54: 1239-1247
23. Pegoraro LMC, Thuard JM, Delalleau N, Guerin B, DeschampsJC, Marquant-Le- Guienne B, Humblot P. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with vero cells. Theriogenology, 1998; 49: 1579-1590
24. Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of Growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. Mol reprod dev, 1996; 45: 327-377
25. Mori C, Hashimoto H, Hoshino K. Fluoresence microscopy of nuclear DNA in oocytes and zygotes during in vitro fertilization and development of early embryos in mice. Biol Reprod, 1988; 39: 737-742
26. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Liebfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, 1986; 25: 591-600
27. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and Trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod Biomed Online (web paper), 2001; 149: 25-29
28. Turner K, Lenton EA. The influence of vero cell culture on human embryo development and chorionic gonadotrophin production in vitro. Hum Reprod, 1996; 11: 1966-1974
29. Lysdahl H,Gabrielsen A, Minger SL, et al. Derivation and characterization of four new human embryonic stem cell lines: the Danish experience. Reprod BioMed Online, 2006; 12: 119-126
30. Rodriguez CI, Galan A, Valbuena D, Simon C. Derivatin of clinical-grade human embryonic stem cells. Reprod BioMed Online, 2006; 12: 112-118
31. Li X, Morris HA, Allen WR. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Reproduction, 2001; 121: 925-932
32. Hewitt DA, England GCW. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell co-culture for canine oocyte maturation in vitro. Anim Reprod Sci, 1999; 55: 63-75
33. Janssenswillen C, Nagy ZP, Van Steirteghem A. Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II by co-culture with monolayer of vero cells. Hum Reprod, 1995; 10(2): 375-378
34. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. Reprod BioMed Online, 2006; 12: 608-615
35. Brinsko SP, Ball BA, Miller PG. In vitro development of day 2 embyos obtained from young, fertile mares and aged, subfertile mares. J Reprod Fertil, 1994; 102: 371-378
36. Chen HF, Ho HN, Chen SU, Chao Kh, Lin HR, Huang SC, Lee TY, Yang YS. Peptides extracted from Vero cell cultures overcomes the blastocyst block of mouse embryos in a serum-free medium. J Assist Reprod Gen, 1994; 11(3): 165-171
37. Carnegie JA, Morgan JJ, McDiarmid N, Durnford R. Influence of protein supplements on the secretion of leukemia inhibitory factor by mitomycin-pretreated vero cells: possible application to the in vitro production of bovine blastocysts with high cryotolerance. J Reprod Fertil, 1999; 117: 41-48
38. Schillaci R, Ciriminna R, Cefalu E. Vero cell effect on in-vitro human blastocyst development: preliminary results. Hum Reprod, 1994; 9: 1131-1135
39. Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte IVM with the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-1. J Reprod Fertil, 1994; 101: 697-701
40. Herrler A, Lucas-Hann A, Niemann A. Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro production of bovine embryos. Theriogenology, 1992; 37: 1213-1224
41. Lorenzo PL, Illera MJ, Sanchez J, Silvan G, Illera JC, Illera M. Bovine oocyte maturation and fertilization in vitro with growth factors and estrous cow serum. Theriogenology, 1993; 39: 262
42. Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, Ball B, Anderson G, Liu I. Influence of Insulin-Like Growth Factor-I and Its Interaction with Gonadotropins, Estradiol, and Fetal Calf Serum on In Vitro Maturation and Parthenogenic Development in Equine Oocytes.Biol Reprod, 2001; 65: 899-905