

## قابلیتهای سلولهای فیبروبلاست جنین موش و انسان در حفاظت جنینهای موش از آثار ناشی از دمای آزمایشگاه

سید نورالدین نعمت‌اللهی ماهانی **Ph.D.\***، حسن باهنک **M.Sc.\*\***، محمد علی کیانی نژاد **B.Sc.\*\***

\*گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی افضلی پور و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان

\*\* دانشکده پزشکی بجنورد

وصول: خردادماه ۸۵، پذیرش: مردادماه ۸۵

### چکیده

**هدف:** بررسی قابلیت سیستمهای هم کشتی در غلبه بر آثار سوء ناشی از نگهداری جنینهای ۲- سلولی موش در دمای پایین.  
**مواد و روشها:** جنینهای ۲-سلولی موش از لوله رحم موشهای نژاد NMRI پس از تحریک تخمک گذاری با گونادوتروپینها به داخل محیط HTF (Human Tubal Fluid) با ۱۵٪ FBS (Fetal Bovin serum) آزاد شدند. جنینهای طبیعی پس از سه بار شستشو با HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) همراه با ۱۵ درصد BSA (Bovin serum Albumin) به مدت ۱، ۳ و ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۲-۲۵°C) قرارداد شدند. سپس جنینهای هر گروه به طور همزمان به محیطهای HTF، MEM- $\alpha$  (Minimum Essential Medium Modification) به عنوان شاهد و HEF (Human Embryonic Fibroblast) و MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) به عنوان هم کشتی منتقل و به مدت ۱۲۰ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آزمایشها ۶ بار تکرار و تکوین جنینها هر ۲۴ ساعت به مدت ۵ روز بررسی شد. اطلاعات به دست آمده به کمک آزمون مجذور کای آنالیز آماری شد و حد معنی داری اختلافات بین گروهها  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** تکوین جنینهایی که به مدت ۵ ساعت در حرارت آزمایشگاه نگهداشته شده بودند در هر دو گروه HTF و MEM- $\alpha$  به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود. هم کشتی جنینها با MEF یا HEF میزان تکوین به مرحله بلاستوسیت را در تمام گروههای مورد مطالعه که در دمای آزمایشگاه قرار گرفته بودند افزایش داده بود. اختلاف آماری معنی داری بین گروههای شاهد و آزمون هم کشتی دیده نشد؛ در حالی که جنینهایی که به مدت ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و سپس به محیطهای هم کشتی منتقل شده بودند تکوین چشمگیری در روزهای چهارم و پنجم نسبت به جنینهایی که در محیط MEM- $\alpha$  (شاهد) قرار داشتند، نشان دادند ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** از یافتههای پژوهش حاضر می توان نتیجه گیری کرد که جنینهای ۲- سلولی موش قادرند شرایط نامساعد دمای آزمایشگاه را به مدت سه ساعت تحمل کنند. به هر حال، نگهداری جنینها به مدت ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه اثرات جبران ناپذیری بر تکوین جنینها بر جا می گذارد. هر دو نوع سلولی که در مطالعه حاضر به کار گرفته شده بود توانستند تکوین بهتر جنینها را، به خصوص جنینهایی که در حرارت آزمایشگاه قرارداد شده بودند تامین کنند.

**کلیدواژه‌ها:** هم کشتی، جنین موش، فیبروبلاست جنینی، دمای آزمایشگاه

✉ آدرس مکاتبه: کرمان، دانشکده علوم پزشکی کرمان، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه تشریح  
E-mail: drbahrammemar@yahoo.com

## مقدمه

فرایند لقاح و به دنبال آن تکوین جنین پستانداران و از جمله انسان، در شرایط مناسب درون بدن صورت می‌گیرد. در فناوریهای کمکی تولید مثل Assisted Reproductive Technology (ART) تلاش شده و می‌شود تا آثار سوء عوامل محیطی مانند تغییر pH، تغییر میزان گازهای موجود در محیط، نور مرئی و تغییرات دمای محیط به حداقل رسانده شود تا بدینوسیله کیفیت جنین افزایش یافته و احتمال بارداری نیز بیشتر شود. مطالعات چندی به تاثیر تغییرات دما در حین دستکاریهای تخمک و جنین در آزمایشگاه پرداخته اند. نوسانات دما در مراحل اولیه تکامل منجر به کاهش کیفیت و در مواردی ایست تکوینی جنین در آزمایشگاه می‌شود. وقتی جنینهای یک سلولی موش فقط حدود ۵ دقیقه در معرض دمای اتاق باشند تسهیم آنها مهار می‌شود و اگر این زمان به حدود ۱۰ تا ۱۵ دقیقه افزایش یابد درصد جنینهایی که به مرحله بلاستوسیست می‌رسند نسبت به گروه کنترل حدود ۵۰ درصد کاهش می‌یابد [۱]. همچنین نگهداری جنینهای خرگوش به مدت حدود ۳ ساعت در دمای اتاق باعث کاهش تسهیم آنها شده بود [۲]. نگهداری تخمک انسان در دمای اتاق می‌تواند به دوکهای میوزی آسیبهای جبران ناپذیری وارد کند [۳]. مطالعات نشان داده که جنینهای ۱ روزه خرگوش به نور مرئی حساسیت بیشتری دارند، در صورتی که جنینهای ۳ روزه بیشتر به دمای اتاق حساسند. دمای اتاق منجر به تخریب اسکلت سلول و انتقال نا هماهنگ ارگانلهای داخل سلولی می‌شود در صورتی که نور مرئی منجر به مرگ سلولی می‌شود. نگهداری مورولای خرگوش به مدت ۸ ساعت در دمای اتاق باعث تأخیر در تسهیم جنین شد و بعد از ۱۰ ساعت تمام بلاستومرها در مرحله متافاز متوقف شده بودند. هرچند که مورفولوژی بلاستومرها تغییر زیادی نکرده بود ولی دمای اتاق باعث تخریب دستگاه گلژی شده بود [۴].

پیش هسته‌های نر و ماده در مقایسه با سیتوپلاسم نسبت به دماهای پائین مقاومت بیشتری دارند و اگر پیش هسته‌ها به

یک سیتوپلاسم نگهداری شده در دمای پائین منتقل شوند هیچ کدام از جنینها به مرحله بلاستوسیست نمی‌رسند. درحالیکه اگر پیش هسته‌های نگهداری شده در دمای پائین به یک سیتوپلاسم نگهداری شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل شوند بهتر می‌توانند مراحل تکوینی خود را طی کنند [۵]. از سویی اگر جنینهای گاو برای مدت زمان کوتاهی در دمای ۴۱° نگهداری شوند تکامل آنها مختل می‌شود. علت متوقف شدن جنینهای دو سلولی گاو در مرحله هشت سلولی در دمای بالا به تخریب میتوکندریها نسبت داده شده است [۶]. وقتی جنینهای دو سلولی موش به مدت ۳۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد در لوله رحم نگهداری شدند و سپس میزان تکوین آنها تا مرحله خروج از زوناپلوسیدا و تولد نوزادان بررسی شد مشاهده کردند که حدود ۳۰ درصد از جنینها زنده متولد شدند. نگهداری جنینها در دمای اتاق همراه با افزایش فشار هیدروستاتیک محیط باعث زنده ماندن تعدادی از جنینها شد [۷]. به نظر می‌رسد حساس ترین مرحله تکوینی جنین موش، مرحله دو سلولی است که بیشترین تخریب در اثر نوسانات گرمایی در این مرحله صورت می‌گیرد [۸]. مطالعات دیگری نیز نشان داده که مقاومت در برابر شوکهای گرمایی (دمای ۴۱ درجه) به مرحله تکوینی جنین و شرایط محیط کشت (*in vitro* یا *in vivo*) بستگی دارد [۹]. در جریان ART و نیز مطالعات جنین شناسی پستانداران، حتی در بهترین شرایط نیز جنین در معرض زمانهای متفاوتی از دمای آزمایشگاه قرار می‌گیرد که با توجه به مطالعات انجام شده آثار متفاوتی بر کیفیت و میزان تکوین جنین بر جا می‌گذارد و جستجوی راه‌های مقابله با این آثار میزان موفقیت ART را بهبود خواهد بخشید.

مطالعات بسیاری به بررسی راه‌های کاهش صدمات ناشی از عوامل محیطی بر تخمک و جنین پستانداران پرداخته اند. از جمله تغییر در نوع و میزان ترکیبات محیط کشت و پالایش آنها [۹ و ۱۰]، به‌کارگیری میزان مشخص گازهای محیط در انکوباتور و استفاده از گرمکنهای ۳۷ درجه سانتیگراد نیز

استفاده شد. HBSS به صورت ماهانه در آزمایشگاه تهیه شد. محیط کشت HTF در محیط آزمایشگاه تهیه [۱۸] و قبل از استفاده به میزان ۱۵ درصد سرم FBS Gibco, uk به آن اضافه می شد. محیط کشت (MEM- $\alpha$ ) بصورت پودر Sigma خریداری و پس از تهیه با روشی که دستورالعمل سازنده مشخص کرده بود با افزودن ۱۵ درصد FBS استفاده می شد. قبل از انتقال جنین، هر یک از دو محیط کشت یاد شده، بمدت ۲۴ ساعت در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  و ۵ درصد  $\text{CO}_2$  نگهداری می شدند.

### تحریک تخمک گذاری

موشهای ماده در دسته های ده تایی انتخاب و به مدت دو هفته جدا از موشهای نر نگهداری شدند. پس از اطمینان از باردار نبودن موشها، ۷/۵ واحد Intervet, Denmark ۱PMSG و یا Gonadotropin(hMG) human Menopausal (Organon, Holland) به طریق داخل صفاقی، به آنها تزریق شد. چهل و هشت ساعت بعد ۱۰ واحد human Chorionic Gonadotropin (hCG) (Organon, Holland) به همان روش تزریق شد و بلافاصله موشهای ماده کنار موشهای نر که توانایی بارورسازی آنها قبلاً کنترل شده بود قرار گرفتند.

### جمع آوری جنینهای دو سلولی

چهل و هشت ساعت پس از تزریق hCG، موشهای ماده ای که جفتگیری کرده بودند (مشاهده پلاک واژن) با کتش کردن کشته شده و در شرایط حتی المقدور استریل، لوله رحم موشها جدا و به قطره محیط کشت FBS ۱۰٪ HTF+ زیر روغن پارافین مایع (Sigma) انتقال داده شد. سپس به کمک میکروسکوپ استریو (stemi. SV6 Zeiss. Germany) و با پاشش حدود ۰/۱ میلی لیتر محیط کشت از انتهای دیستال

پیشنهاد شده است [۱۱]. یکی از راه های غلبه بر عوامل محیطی مضر، استفاده از سیستمهای هم کشتی co-culture است. به کارگیری سلولهای مغذی feeder cells در مطالعات چندی آثار مثبتی را به دنبال داشته است [۱۴ و ۱۵] و بسیاری از مطالعات سیستمهای هم کشتی را روشی مفید برای افزایش توان حیاتی جنین در آزمایشگاه دانسته اند [۱۶]. در حالی که معدودی گزارشها استفاده از سلولهای مغذی را بی اثر و یا کاری وقت گیر و کم اثر دانسته اند [۱۷]. در یک جمع بندی می توان گفت هم کشتی روش مناسبی برای ارتقای کیفیت جنین است، به خصوص زمانی که شرایط برای رشد جنین نامساعد باشد و یا جنین در معرض استرس قرار بگیرد، هم کشتی جنین با سلولهای مغذی باعث تکوین بهتر جنین می شود. مطالعه حاضر به منظور بررسی آثار سوء احتمالی نگهداری جنین موش در دمای آزمایشگاه به عنوان یک مدل آزمایشگاهی طراحی شده و با استفاده از دو سیستم هم کشتی، آثار ناشی از به کارگیری سلولهای فیروبلاست جنینی موش و انسان در تکوین جنینهای دو سلولی موش پس از نگهداری در دمای آزمایشگاه بررسی شده است.

### مواد و روشها

#### حیوان آزمایشگاهی

در آزمایشهای جاری از موش سفید آزمایشگاهی نژاد NMRI که در حیوان خانه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تکثیر می شد استفاده شد. حیوانات ماده در زمان شروع آزمایشات بین ۵ تا ۸ هفته سن داشتند و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص جوندگان نگهداری شدند.

#### تهیه محیط کشت

برای نگهداری جنینها در حرارت آزمایشگاه از (HBSS) که قادر است pH محیط را در غیاب  $\text{CO}_2$  ثابت نگه دارد

1- Pregnant Mares Serum Gonadotropin

### روش تهیه فیبروبلاست جنین انسان

بافت همبند یک جنین سه ماهه انسان پس از اخذ مجوز کتبی از والدین در شرایط حتی المقدور استریل از استخوان و غضروف جدا شد و در بقیه موارد مشابه روش تهیه فیبروبلاستهای جنینی موش عمل شد و برای استفاده از این سلولها در طی آزمایشات از پاساژهای دوم تا هفتم استفاده شد.

### تهیه تک لایه مغذی فیبروبلاست

سلولها به کمک تریپسین و EDTA از کف فلاسک جدا شده و سوسپانسیون حاصل به یک لوله ۵ سی سی منتقل می‌شد. پس از سانتریفیوژ کردن و تخلیه مایع رویی به میزان کافی محیط کشت به آن اضافه شد تا تراکم سلولی به  $5 \times 10^4$  برسد. به کمک سمپلر و سرسمپلر استریل شده در یک پلیت ۶۰ میلی متری حدود ۱۰ قطره ۳۰ میکرولیتری گذاشته و سطح پلیتها با روغن پارافین استریل (Sigma) پوشانده شد. سپس پلیت به انکوباتور CO<sub>2</sub> دار با دمای ۳۷ درجه منتقل شد و تا ۲۴ ساعت قبل از استفاده در همان وضعیت باقی می‌ماند تا فیبروبلاستها به کف پلیت بچسبند.

### نگهداری جنینها در دمای آزمایشگاه

جنینهای دو سلولی موش درون قطرات HBSS با اضافه ۱۵ درصد FBS که روی قطرات با روغن پارافین مایع پوشانده شده بود قرار داده و سپس در زمانهای یک تا ۶ ساعت در محل تاریک در آزمایشگاه (۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. برای کسب زمان مناسب نگهداری جنینها در دمای آزمایشگاه، ابتدا آزمایش در زمانهای یک، دو، سه و چهار و پنج و شش ساعت انجام شد و برای انجام این کار جنینهایی که از نظر ظاهری سالم به نظر می‌رسیدند جدا شدند و پس از سه بار شستشو در محیط بافر فوق و نگهداری در دمای آزمایشگاه، هر یک ساعت تعدادی از آنها

(قیف) لوله رحم توسط سرنگ انسولین و سوزن ۳۰G، جنینها از انتهای پروکسیمال لوله رحم خارج شده و در قطره محیط کشت قرار گرفتند. جنینهایی که از نظر مرفولوژی سالم به نظر می‌رسیدند بکمک پیپت پاستوری که نوک آن به کمک شعله آتش حدود ۱۵۰ میکرون باریک شده بود جمع آوری شده و پس از سه بار شستشو به قطرات HBSS همراه با ۱۵ درصد FBS منتقل شدند.

### روش تهیه فیبروبلاست جنین موش

#### (MEF: Mouse Embryonic Fibroblast)

جنینهای ۱۴-۱۳ روزه موش NMRI در شرایط حتی المقدور استریل از رحم خارج و در یک پلیت بزرگ درون بافر فسفات (PBS) قرار می‌گرفتند. سر و کبد جنینها به دقت جدا می‌شد و بقیه جنینها با اسکالپل و پنس به قطعات کوچک تقسیم و چندین بار با PBS شستشو داده شدند تا حتی المقدور شفاف و عاری از گلوبول قرمز باشند. ۱۰ میلی لیتر محلول تریپسین و ۰/۵ میلی مول EDTA (Ethylene Diamide) Tetra acetic Acid به قطعات جنینی اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس قطعات درشت جدا شده و سوسپانسیون حاصله سانتریفیوژ و پس از دوبار شستشو با BSA+PBS یا (MEM- $\alpha$ +۱۰FBS) با لام نئوبار شمارش و با متیلن بلو ۰/۵ درصد، زنده بودن آنها بررسی شد. سلولهای حاصله به تعداد  $1 \times 10^6$  سلول زنده به فلاسک حاوی ۵ سی سی MEM- $\alpha$ +FBS منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور مرطوب ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد گاز CO<sub>2</sub> نگهداری می‌شدند. چگونگی رشد سلولها به کمک میکروسکوپ معکوس (Nikon TS100) بررسی و پس از دوپاساژ جهت استفاده در آزمایشهای بعدی در نیتروژن مایع منجمد می‌شدند و معمولاً از پاساژهای دوم تا هفتم برای انجام آزمایشهای استفاده می‌شد.

## یافته‌ها

در مجموع تعداد ۳۸۱ جنین در ۶ آزمون به دست آمد که ۳۳۶ جنین سالم به نظر می‌رسیدند و برای ادامه آزمایشهای استفاده شدند. جنینهایی که بدون قرار گرفتن در دمای آزمایشگاه در محیطهای HTF و MEM- $\alpha$  کشت شده بودند تکوین نسبتاً برابری داشتند و بین میزان تکوین در دو محیط تفاوت آماری معنی دار وجود نداشت (جدول ۱). همچنین بین جنینهایی که به مدت ۱، ۳ و ۵ ساعت در دمای اطاق نگهداری و سپس به محیطهای HTF و MEM- $\alpha$  منتقل شده بودند نیز در هر گروه تفاوت آماری معنی داری وجود نداشت. لیکن جنینهایی که به مدت ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداشته شده و سپس در محیطهای HTF و MEM- $\alpha$  کشت شده بودند نسبت به گروه شاهد در روز پنجم اختلاف آماری معنی داری ( $p < 0.05$ ) داشتند. تکوین جنینهایی که در محیط دارای سلول مغذی کشت شده بودند (شاهد هم کشتی) در هر دو محیط HEF و MEM- $\alpha$  نسبت به جنینهایی که به مدت ۱، ۳ و ۵ ساعت در دمای اطاق نگهداشته شده بودند تفاوت آماری معنی دار نداشت و همچنین بین دو محیط هم کشتی (HEF و MEF) نیز تفاوت آماری معنی داری از نظر میزان تکوین در روزهای مختلف وجود نداشت (نمودار ۱). ولی مقایسه میزان تکوین جنینهایی که در گروه MEM- $\alpha$  قرار داشتند نسبت به گروه‌های هم کشتی نشان داد که میزان تکوین در گروه‌های هم کشتی بوضوح بالاتر از گروه MEM- $\alpha$  بود و در گروه ۵ ساعته در روز چهارم نسبت به MEF و در روز پنجم نسبت به HEF اختلاف آماری معنی دار داشت ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۲). برای روشن تر شدن عملکرد سیستمهای هم کشتی، میزان تکوین جنین در روزهای چهارم و پنجم در هر یک از گروهها با شاهد خودش مقایسه و تفاوت میزان تکوین در جدول ۲ آمده است. بر این اساس گروه‌هایی که دارای سیستم هم کشتی بودند توانسته بودند به تکوین بهتر جنینها در روز چهارم و روز پنجم کمک کنند.

به طور مساوی به محیطهای HTF و MEM- $\alpha$  که از روز قبل تهیه و در انکوباتور نگهداری شده بودند منتقل شدند و این آزمون دوبار تکرار شد. پس از بررسی نتایج آزمون اول، زمانهای یک، سه و پنج ساعت برای انجام آزمایش اصلی انتخاب شدند. در هر آزمون ابتدا جنینهای دو سلولی که ظاهر سالم داشتند جدا شده و در بافر فوق سه بار شستشو داده می‌شدند. سپس جنینهای گروه شاهد به محیطهای HTF و MEM- $\alpha$  و HEF و MEF منتقل شدند. مابقی جنینها در بافر HBSS همراه با ۱۵ درصد سرم نگهداری می‌شدند و در زمانهای یک، سه و پنج ساعت تعدادی از آنها به نسبت مساوی به قطرات جداگانه ای از محیطهای فوق منتقل شدند.

## ارزیابی جنینها

جنینهای گروه آزمون همراه با گروه شاهد (که در دمای آزمایشگاه قرار نگرفته بودند) هر ۲۴ ساعت یکبار به مدت ۱۲۰ ساعت با میکروسکوپ معکوس مشاهده و چگونگی تکوین آنها گزارش شد. گذر جنین از مراحل چهار و هشت سلولی (۲۴ ساعت)، مورولا (۴۸ ساعت)، بلاستوسیست اولیه و بلاستوسیست ثانویه (۷۲ ساعت)، بلاستوسیست در حال خروج از زوناپلوسیدا Hatching Blastocyst (۹۶ ساعت) و بلاستوسیست خارج شده از زونا Hatched Blastocyst (۱۲۰ ساعت) مورد بررسی قرار گرفت.

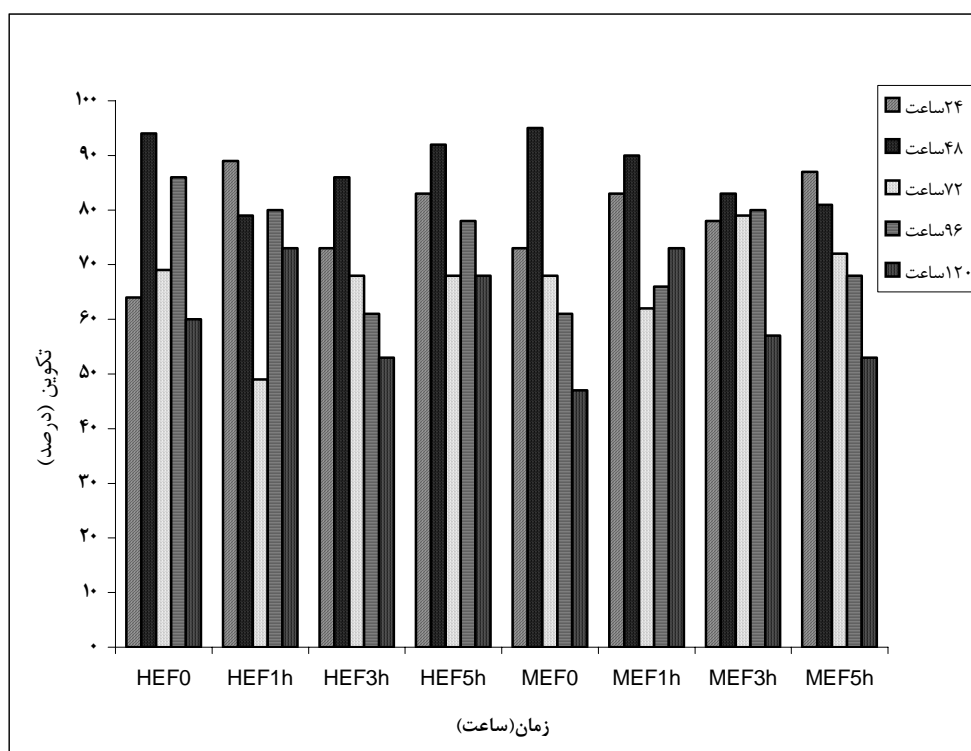
## جمع آوری نتایج و آنالیز آماری یافته‌ها

آزمایشهای ۶ بار تکرار و تعداد جنین تکوین یافته در هر روز گزارش شد. سپس میزان تکوین جنینها در گروه‌های مختلف محاسبه شد. یافته‌ها به صورت تعداد جنین تکوین یافته در هر مرحله و میزان تکوین (%) گزارش شده است. برای آنالیز آماری از آزمون  $\chi^2$  استفاده و  $p \leq 0.05$  حد معنی داری آزمونها در نظر گرفته شد.

جدول ۱. مقایسه تکوین جنینهای دوسلولی موش در محیط کشت MEM- $\alpha$  و HTF پس از نگهداری در دمای آزمایشگاه و کشت به مدت ۱۲۰ ساعت

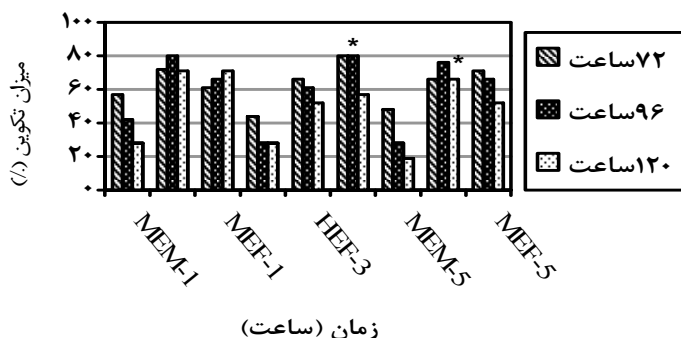
تکوین در روزهای متوالی (ساعت)					تعداد	محیط	شاهد	آزمون	مدت نگهداری
۱۲۰h	۹۶h	۷۲h	۴۸h	۲۴h					
HdB	HB	EB&LB	M	4&8					
۱۱(۵۲)	۱۰(۴۷)	۱۵(۷۱)	۱۶(۷۶)	۱۴(۶۶)	۲۱	HTF			
۱۱(۵۲)	۱۳(۶۱)	۱۳(۶۱)	۱۶(۷۶)	۱۷(۸۰)	۲۱	MEM			
۹(۴۲)	۸(۳۸)	۱۲(۵۷)	۱۶(۷۶)	۱۸(۸۵)	۲۱	HTF	۱ ساعت		
۶(۲۸)	۹(۴۲)	۱۲(۵۷)	۱۵(۷۱)	۱۹(۹۰)	۲۱	MEM			
۷(۳۳)	۷(۳۳)	۱۰(۴۷)	۱۵(۷۱)	۱۲(۵۷)	۲۱	HTF	۳ ساعت		
۶(۲۸)	۶(۲۸)	۷(۳۳)	۱۱(۵۲)	۱۹(۹۰)	۲۱	MEM			
۳(۱۴)*	۶(۲۸)	۹(۴۲)	۱۲(۵۷)	۱۶(۷۶)	۲۱	HTF	۵ ساعت		
۴(۱۹)*	۶(۲۸)	۸(۳۸)	۸(۳۸)	۱۵(۷۱)	۲۱	MEM			

اعداد داخل پرانتز درصد را نشان میدهد. 4&8 = جنینهای ۴ و ۸ سلولی، M = مورولا، EB&LB = بلاستوسیست اولیه و ثانویه، HB = بلاستوسیست در حال خروج از زونا پلوسیدا، HdB = بلاستوسیست خارج شده از زونا پلوسیدا \*  $p < 0.05$  نسبت به گروه شاهد هم گروه



نمودار ۱. مقایسه روند تکوین جنینها در محیطهای HEF و MEF پس از نگهداری در دمای آزمایشگاه.

HEF0,1,3,5 = جنینهایی که بترتیب بمدت ۰، ۳، ۱ و ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و سپس به محیط دارای فیبروبلاستهای جنینی انسان منتقل شده بودند. MEF0,1,3,5 = جنینهایی که بترتیب بمدت ۰، ۳، ۱ و ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و سپس به محیط دارای فیبروبلاستهای جنینی موش منتقل شده بودند.



نمودار ۲. مقایسه میزان تکونین جنینهای ۲-سلولی پس از نگهداری بمدت ۱۰، ۵ و ۳ ساعت در دمای آزمایشگاه و سپس کشت در محیط شاهد (MEM- $\alpha$ ) و محیطهای دارای سلولهای فیبروبلاست جنینی انسان (HEF) و فیبروبلاست جنینی موش (MEF). ( $p < 0.05$ ) نسبت به گروه شاهد.

## بحث

۳ یا ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداشته شده و سپس در دو محیط قرار گرفته بودند تفاوت آماری معنی داری نداشت. لیکن افزایش زمان نگهداری جنین در دمای آزمایشگاه به تدریج موجب کاهش میزان تکونین جنین به خصوص در روزهای چهارم و پنجم شده بود. جنینهای دو سلولی خرگوش نیز همانند جنین موش تا ۳ ساعت دمای محیط را تحمل کرده و پس از آن کاهش تکونین به مرحله مورولا و بلاستوسیت در آنها مشاهده شده بود [۲۰].

اطلاعات اندکی پیرامون تاثیر دمای محیط بر تکونین جنین پستانداران وجود دارد و به خصوص در مورد جنین انسان تاکنون گزارشی منتشر نشده است. به هر حال اگر بتوان یافته‌های مطالعه حاضر را به جنین انسان تعمیم داد می‌توان گفت در جریان دستکاریهای آزمایشگاهی که معمولاً مدت زیادی نیز به طول نمی‌انجامد می‌توان با آسودگی جنین را در حرارت آزمایشگاه قرارداد و نگران عدم تکونین نبود. در عین حال باید هشدار داد که نگهداری طولانی مدت در دمای آزمایشگاه به کاهش تکونین جنینها منجر می‌شود. این امر در مورد تخمک انسان بررسی و نشان داده شده که نگهداری تخمک انسان در دمای آزمایشگاه باعث به هم ریختگی دوکهای میوزی می‌شود [۲۱].

استفاده از سیستمهای هم کشتی با قراردادادن جنین ۱-

یکی از عواملی که به اظهار محققین تکونین جنین را در آزمایشگاه دستخوش تغییر می‌کند تغییرات دما است. در مطالعه حاضر پس از نگهداری جنینهای دو سلولی موش در دمای آزمایشگاه به مدت ۱ و ۳ ساعت تغییر معنی داری در میزان تکونین جنینها رخ نداد و تنها پس از ۵ ساعت میزان تکونین کاهش یافت (جدول ۱ و ۲). در این آزمایشها از بافر HBSS استفاده شد که به دلیل برخورداری از سیستم بافری فسفات و عدم نیاز به  $\text{CO}_2$  برای تنظیم pH می‌تواند در مقابل تغییرات pH محیط مقاومت کند. تغییرات pH محیط یکی از عوامل تاثیر گذار بر کیفیت و میزان تکونین جنین است [۱۹]. ما در آزمایشهای تحقیق حاضر از دو محیط MEM- $\alpha$  و HTF استفاده شد. محیط MEM- $\alpha$  محیطی مرکب و دارای انواع اسیدهای آمینه، نوکلئوتیدها، ویتامینها و منابع انرژی است در حالی که محیط HTF محیط ساده ای است که تنها یونها، منبع انرژی و عوامل تثبیت کننده pH را دارد و به تقلید از مایع لوله رحم انسان ساخته شده است. مقایسه اطلاعات جدول ۱ نشان می‌دهد که این دو محیط توانایی نسبتاً یکسانی در تکونین جنینها در تمام گروه‌های مورد مطالعه داشته اند. ولی باید توجه داشت، هر چند تکونین جنینهایی که به مدت ۱،

سلولی موش داخل لوله رحم موش در آزمایشگاه و تکوین جنینها به بلاستوسیت به دنیا پیشنهاد شد [۲۲]. نزدیک به ۳۰ سال بعد همین روش برای تکوین جنینها مستر به کار گرفته شد [۲۳] و به دنبال آن انواع سلولهای مغذی برای هم کشتی جنینهای حیوانات و انسان بکار گرفته شد. سلولهای اپی تلبالی لوله رحم [۲۴]، سلولهای گرانولوزا [۲۵]، سلولهای اندومتر [۲۶] و انواعی از رده‌های سلولی شناخته شده مانند Vero [۲۷] و MDBK [۲۸] از این جمله‌اند. حتی اخیراً تاثیر قطبی بودن سلولهای مغذی بر میزان تکوین جنین موش بررسی و گزارش شده که سلولهای قطبی بهتر می‌توانند تکوین جنین موش را هدایت کنند [۱۵]. لیکن تاکنون گزارشات اندکی استفاده از سلولهای فیروبلاستی را پیشنهاد کرده‌اند. در آزمایشات جاری ما از سلولهای فیروبلاست جنینی انسان و موش استفاده کردیم. سلولهای فیروبلاستی به سهولت در آزمایشگاه قابل تهیه هستند و در محیطهای مختلف و مقادیر کم (مشاهدات منتشر نشده ما) رشد می‌کنند. این سلولها قادرند در پاساژهای متوالی قابلیت رشد و تکثیر خود را حفظ کرده و پس از انجماد و ذوب نیز مجدداً به راحتی و سرعت در آزمایشگاه تکثیر شوند. سلولهای فیروبلاست جنینی فاکتورهای رشد و سیتوکینهای متعددی بداخل محیط کشت رها می‌کنند [۲۹] که برخی از آنها را در تکوین بهتر جنین دخیل دانسته‌اند [۳۰]. استفاده از سلولهای فیروبلاستی برای هم کشتی با جنینهای دو سلولی موش آثار مثبت روشنی به دنبال داشت. جنینهای گروه شاهد هم کشتی (که در معرض دمای آزمایشگاه قرار نگرفته بودند) نسبت به جنینهایی که فقط در محیط MEM- $\alpha$  قرار داشتند میزان تکوین بالاتری نشان دادند و با گذشت زمان (روزهای چهارم و پنجم) اختلاف بین دو گروه بیشتر شد (نمودار ۲). بین فیروبلاستهای انسانی و موشی تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر افزایش توان تکوینی جنینها وجود نداشت و هر دو سیستم توانسته بودند به

تکوین جنینهای دو سلولی موش کمک کنند. به علاوه سلولهای فیروبلاست توانسته بودند آثار زیانبار ناشی از نگهداری جنین در دمای آزمایشگاه را به حداقل رسانیده و به تکوین بهتر جنینها کمک کنند. جدول شماره ۲ نشان می‌دهد جنینهایی که در گروه شاهد بوده‌اند پس از نگهداری بمدت ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه نسبت به آنهایی که در دمای آزمایشگاه قرار نگرفته بودند در روزهای چهارم و پنجم به ترتیب ۵۵ و ۶۴ درصد کاهش تکوین داشته‌اند. در حالی که جنینهای گروه هم کشتی با سلولهای فیروبلاست جنینی موش در روزهای چهارم و پنجم بترتیب ۱۰ و ۱۵ درصد و جنینهای گروه هم کشتی با سلولهای فیروبلاست جنینی انسان به ترتیب در روزهای چهارم و پنجم ۱۱ و ۱۸ درصد کاهش تکوین داشتند. بدین ترتیب می‌توان گفت سیستمهای هم کشتی استفاده شده در پروژه حاضر به تکوین بهتر جنین کمک کرده‌اند و این امر بخصوص زمانی که جنین در معرض استرس ناشی از کاهش دمای محیط (شرایط نامساعد) قرار گرفته بود به وضوح مشاهده شد. برای توضیح آثار مثبت سیستمهای هم کشتی دو نظریه مطرح است: پالایش مثبت<sup>۱</sup> و پالایش منفی<sup>۲</sup>. در نظریه پالایش مثبت پیشنهاد شده است که سلولهای مغذی با ترشح فاکتورهای مفید برای جنین به رشد و تکوین جنین کمک می‌کنند [۳۱ و ۳۲]. در نظریه پالایش منفی پیشنهاد شده که سلولهای مغذی با جذب و یا تبدیل فاکتورهای مضر برای جنین مانند آنیونهای سوپراکسید، آب اکسیژنه، فلزات سنگین و ... شرایط را برای تکوین مناسب تر جنین فراهم می‌کنند [۳۳]. پذیرش هر دو نظریه نیز بدون اشکال است. بدین معنی که سلولهای مغذی از یک سو فاکتورهای جنین دوست (embryo trophic) ترشح می‌کنند و از سوی دیگر فاکتورهای جنین دوست را از اطراف جنین دور

1-Positive conditioning  
2-Negative conditioning



کشتی چندان متداول نیست و نیاز به تجربه و دانش فنی دارد ولی از سویی افزایش کیفیت جنین که از اهداف ART است ما را و می‌دارد که در مورد استفاده از این قبیل سلولها در ART جدی تر اندیشه کنیم. برخی مطالعات نشان داده در افرادی که چند سیکل IVF نا موفق داشته اند یا سن مادر بالا بوده است با استفاده از سیستم هم کشتی میزان لانه‌گزینی جنین و تولد نوزادان افزایش یافته است [۳۸ و ۳۹]. البته پاره ای گزارشها نیز نشاندهنده بی تاثیر بودن سیستمهای هم کشتی بوده است [۴۰] که این امر دقت بیشتر در بکارگیری سلولهای مغذی را می‌طلبد.

در یک جمع بندی و به‌عنوان نتیجه گیری می‌توان گفت که اولاً نگهداری کوتاه مدت جنین دو سلولی موش در دمای آزمایشگاه تاثیر منفی بارزی بر تکوین بعدی جنین ندارد و ثانياً فیروبلاستهای جنین انسان همچون فیروبلاستهای جنین موش به خوبی قادرند تکوین جنین را تا مرحله خروج از زونا پلوسیدا حمایت کنند و در شرایط نامساعد میزان این حمایت واضح تر است. آزمایشهای تکمیلی روی جنینهای اضافی که در سیکلهای درمانی IVF به دست می‌آید (پس از اخذ مجوز از والدین) و بررسی کیفیت این جنینها که با سلولهای فیروبلاست هم کشت شوند ما را قادر خواهد ساخت در مورد استفاده از سلولهای مغذی برای تکوین مناسب تر جنین انسان با اطمینان بیشتر اظهار نظر و تصمیم‌گیری کنیم.

### تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۸۱/۹ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان است. بخشی از عملیات اجرایی این پروژه تحقیقاتی در مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان و قسمتی در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده پزشکی افضلی پور کرمان انجام شده است که بدینوسیله از همکاری مسئولین مربوط قدردانی می‌شود.

می‌کنند و بدین ترتیب شرایط تکوین مناسب تر جنین را فراهم می‌کنند [۳۴]. در آزمایشهای مطالعه حاضر که عملاً شرایط رشد و تکوین جنین بدنال قرارگرفتن در دمای محیط نامناسب شده بود مشاهده شد (نمودار ۱) که میزان تکوین جنینها با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری ندارد و می‌توان گفت که سلولهای فیروبلاست انسانی و موشی هر دو توانسته‌اند بر فاکتورهای امبریوتوکسیک که بدنال نگهداری جنین در دمای آزمایشگاه وجود آمده بودند غلبه کنند و به بیان دیگر نتایج این تحقیق تأییدی است بر نظریه پالایش منفی توسط سلولهای مغذی.

بکارگیری سیستمهای هم کشتی مخالفینی نیز دارد. مخالفین معتقدند که سیستمهای هم کشتی نیاز به تجربه و آزمایشگاه کشت سلولی مجهز دارد و آماده سازی مداوم سلولها نیز کاری وقت گیر و پر هزینه است. از طرفی سلولهای مغذی بیگانه ممکن است با دخالت در ژنتیک جنین، پروتئینهای جدیدی سنتز و تولید کنند که آثار جایگزینی این قبیل ژنها بعدها معلوم خواهد شد. بعلاوه انتخاب محیط مناسبی که هم برای رشد سلولها کارساز باشد و هم مانع تکوین جنین نشود نیز اهمیت دارد. در پروژه حاضر، ما از محیط MEM- $\alpha$  استفاده کردیم. این محیط در پاره ای از مطالعات جنین شناسی استفاده شده [۳۵ و ۳۶] و مطالعات قبلی نویسندگان حاضر [۳۷] نیز حاکی از قابلیت این محیط در تکوین جنین ۲- سلولی موش است. از طرفی این محیط به خوبی قادر است رشد و تکثیر فیروبلاستهای جنینی موش و انسان را در آزمایشگاه به انجام برساند. استفاده از فیروبلاستهای انسانی به منظور بررسی توان این سلولها در حمایت از جنین دو سلولی موش بود. با این احتمال که بتوان از این سلولها بدون نگرانی از انتقال پروتئین و ژنهای غریبه و ناسازگار، برای افزایش و بهبود کیفیت جنین انسان نیز استفاده کرد. ولی به هر حال نمی‌توان از نظر دور داشت که استفاده از سیستمهای هم

## References

1. **Mahadevan MM, Miller MM.** Deleterious effect of equilibration temperature on the toxicity of propanediol during cryopreservation of mouse zygotes. *J Assist Reprod Genet* 1997;14(1):51-4.
2. **Schumacher A, Fischer B.** Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. *J Reprod Fertil* 1988;84(1):197-204.
3. **Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J.** transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertility sterility* 1990; 54:102-8.
4. **Hegele-Hartung C SA, Fischer B.** Effects of visible light and room temperature on the ultrastructure of preimplantation rabbit embryos: a time course study. *Anat Embryol* 1991; 183:559-71.
5. **Azambuja R KD, Westhusin M.** Effects of low temperatures on in vitro produced bovine zygotes. *Molecular Reprodand Dev* 1997; 47:435-9.
6. **Rivera RM, Hansen PJ.** Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 2001; 121(1):107-15.
7. **Pribenszky C MM, Cseh S, Solti L.** Survival of mouse blastocysts after low temperature preservation under high pressure. *Acta Vet Hung* 2004; 52(4):479-87.
8. **Zhu B WS, Oakey H, Setchell B, Maddocks S.** Effect of paternal heat stress on the development in vitro of preimplantation embryos in the mouse. *Andrologia* 2004; 36(6):384-94.
9. **Arechiga CF, Hansen PJ.** Response of preimplantation murine embryos to heat shock as modified by developmental stage and glutathione status. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998; 34(8):655-9.
10. **Gardner DK.** Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; 54:461-75.
11. **Scot LF, Smith S.** the relevance and use of mouse embryos bioassays for quality control in an assisted reproductive technology program. *Fertil Steril* 1993; 60:559-68.
12. **Nematollahi N, Valojerdi MR.** Effect of Vero cell coculture on the development of frozen-thawed two-cell mouse embryos. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16(7):380-4.
13. **Khatir H, Anouassi A, Tibary A.** In Vitro and in vivo developmental competence of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos produced in vitro using two culture systems (mKSOMaa and oviductal cells). *Reprod Domest Anim* 2005; 40(3):245-9.
14. **Taniguchi F, Harada T, Nara M, Deura I, Mitsunari M, Terakawa N.** Coculture with a human granulosa cell line enhanced the development of murine preimplantation embryos via SCF/c-kit system. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21(6):223-8.
15. **Baghaban Eslami Nejad MR, Rezazadeh**

- Valojerdi M, Kazemi Ashtiani S.** A comparison of polarized and non-polarized human endometrial monolayer culture systems on murine embryo development. *J Exp Clin Assist Reprod* 2005; 2(1):7.
16. **Goldberg JM, Khalifa EA, Friedman CI, Kim MH.** Improvement of in vitro fertilization and early embryo development in mice by coculture with human fallopian tube epithelium. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1802-5.
17. **Bavister BD.** Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Hum Reprod* 1992; 7(10):1339-41.
18. **Quinn P, Kerin JF, Warnes GM.** Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985; 44(4):493-8.
19. **Edwards LE WD, Gardner DK.** Intracellular pH of the pre-implantation mouse embryo: Effect of extracellular pH and weak acids. *Mol Reprod Dev* 1998; 50:434-42.
20. **Fischer B, Schumacher A, Hegele-Hartung C, Beier HM.** Potential risk of light and room temperature exposure to preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1988; 50(6):938-44.
21. **Zhao y BJ.** Bicarbonatechloride exchange and intracellular pH throughout preimplantation mouse embryo development. *Am J Physiol* 1996; 271:1512 .
22. **Biggers JD GR, Brinster RL.** Development of mouse embryo in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature* 1962; 194:747.
23. **Minami N BB, Iritani A.** Development of hamster 2-cell embryos in the isolated mouse oviduct organ culture system. *Gamete Res* 1988; 19:235.
24. **Bongso A FC, Ng SC, Rntnam SS.** Human embryonic behaviour in a sequential human oviduct- endometrial coculture system. *Fertil Steril* 1994b; 61:976-80.
25. **Plachot M AJ, Alvarez S, Firmin C.** granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod* 1993; 8:2133-40.
26. **Jayot S, Parneix I, Verdaguer S, Discamps G, Audebert A, Emperaire JC.** Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril* 1995; 63:109-14.
27. **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(1):50-6.
28. **Leppens G, Gardner DK, Sakkas D.** Co-culture of 1-cell outbred mouse embryos on bovine kidney epithelial cells: effect on development, glycolytic activity, inner cell mass:trophectoderm ratios and viability. *Hum Reprod* 1996; 11(3):598-603.
29. **Fritsch C, Simon-Assmann P, Kedinger M, Evans GS.** Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine. *Gastroenterology* 1997; 112(3):826-38.
30. **Hatoya S, Sugiyama Y, Torii R,**

- Wijewardana V, Kumagai D, Sugiura K, et al.** Effect of co-culturing with embryonic fibroblasts on IVM, IVF and IVC of canine oocytes. *Theriogenology* 2006; 66(5): 1083-90.
31. **Liu LP, Chan ST, Ho PC, Yeung WS.** Partial purification of embryotrophic factors from human oviductal cells. *Hum Reprod* 1998; 13(6):1613-9.
32. **Liu LP, Chan ST, Ho PC, Yeung WS.** Human oviductal cells produce high molecular weight factor(s) that improves the development of mouse embryo. *Hum Reprod* 1995; 10(10):2781-6.
33. **Urman B, Balaban B.** Is there still a place for co-cultures in the era of sequential media? *Reprod Biomed Online* 2005; 10(4):492-6.
34. **Joo BS, Kim MK, Na YJ, Moon HS, Lee KS, Kim HD.** The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertil Steril* 2001; 75(1):193-9.
35. **Noda y, Goto Y, Umaoka Y, Shiotani M, Nakayama T, Mori T.** Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fertil Steril* 1994; 62(5):2022-7.
36. **WUN WS, Wun CC, Grunert GM.** Minimum essential medium alpha (MEM) enhances assisted reproductive technology results. I. Mouse embryo study. *J Assist Reprod Genet* 1994; 11(6):303-7.
37. **Nematollahi N, Saito H, Rezazadeh M, Hiroi M.** Vitrification of mouse cleaved embryos and oocytes with ethylene glycol and trehalose. *Mid East Fertil Soc* 1997; 3(suppl 1):50.
38. **Wiemer KE, Garrisi J, Steuerwald N,.** Beneficial aspects of co-culture with assisted hatching when applied to multiple-failure in-vitro fertilization patients. *Hum Reprod* 1996; 11(11):2429-33.
39. **Wiemer KE, Cohen J, Tucker MJ, Godke RA.** The application of co-culture in assisted reproduction: 10 years of experience with human embryos. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 4:226-38.
40. **Wetzels AM, Bastiaans BA, Hendriks JC, Goverde HJ, Punt-Van der Zalm AP, et al.** The effects of co-culture with human fibroblasts on human embryo development in vitro and implantation. *Hum Reprod* 1998; 13(5):1325-30