Archive of SID

بررسی اثر هم کشتی سلول‌های کومولوس در مایع فولیکولی بر جنین‌های یک سلولی موش

عباسعلي كريمپور (Ph.D.)* امير اسماعيل‌نژاد مقدم (Ph.D.)*

چکیده

سابقه و هدف: علی‌رغم پیشرفت‌های بسیار در روش لقاح آزمایشگاهی(IVF) و کشت جنین در محیط آزمایشگاه (in vitro)، میزان لانه‌گزینی جنین‌های کشت یافته در محیط آزمایشگاه پس از انتقال به حفره رحمی، پایین می‌باشد. استفاده از سیستم هم کشتی (co- culture) یکی از راه‌های در دست مطالعه برای بهبود شرایط محیطی، جهت افزایش کیفیت جنین‌ها در محیط آزمایشگاه می‌باشد. هدف این تحقیق آن است که از مایع فولیکولی انسان به عنوان محیط پایه برای ایجاد سیستم هم کشتی سلول‌های کومولوس استفاده کرده و سپس به مقایسه آن با محیط‌های دیگر بپردازد.

مواد و روش‌ها: جنین‌های یک سلولی مورد استفاده در پژوهش از موش‌های سوری به دنبال تحریک تخمدانی توسط هورمون‌های HMG و hCG به دست آمدند. مایع فولیکولی در جریان بیرون کشیدن فولیکول‌ها از زنانی که پس از تحریک تخمدانی تحت عمل قرار گرفتند، تهیه شد. سلول‌های کومولوس با استفاده از هیالورونیداز ۱ درصد از جنین‌های یک سلولی جدا شده و با استفاده از روش پرکل به طور نسبی از سلول‌های خونی پاک‌سازی شدند. پس از تهیه تک لایه سلول‌های کومولوس در محیط هامز F10 و مایع فولیکولی، جنین‌های یک‌سلولی در این دو سیستم و نیز محیط هامز F10(بدون سلول‌های کومولوس) و محیط مایع فولیکولی به مدت ۱۲۰ ساعت، کشت داده شدند.

یافته‌ها: در محیط هامز(HF) فقط ۱۰ درصد جنین‌ها مرحله توقف رشدی دو سلولی را پشت سرگذاشته و به مزحله ۴ سلولی رسیدند. این نسبت در گروه‌های مایع فولیکولی (FF)، هم کشتی سلول‌های کومولوس در هامز F10 (HC) و هم کشتی سلول‌های کومولوس در مایع فولیکولی (FC) به ترتیب ۲۱،۲۷ و ۶۹ درصد بوده است که هر سه نسبت به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه HF بالاتر بوده‌اند ($P < ۰/۰۵$). نسبت مزبور در گروه FC در مقایسه با دو گروه دیگر نیز بالاتر بوده است($P < ۰/۰۰۱$).

همچنین در محیط FC، ۳۵ درصد جنین‌هایی که مرحله توقف دو سلولی را پشت سر گذاشتند به رشد خود ادامه داده و به مرحله بلاستوسیست رسیدند. این نسبت در گروه‌های HF، HC و FF به طور معنی‌داری کم‌تر و به ترتیب ۰، ۸/۹ و ۷/۷ درصد بوده است($P < ۰/۰۰۱$).

استنتاج: مایع فولیکولی و سلول‌های کومولوس در سیستم هم‌کشتی با تقویت اثر یکدیگر سبب می‌شوند این سیستم در بهبود شرایط محیط کشت، کارآیی بالاتری را در مقایسه با سیستم هم‌کشتی سلول‌های کومولوس در محیط هامز F10 نشان دهد.

واژه‌هاي كليدي: هم‌کشتی، سلول کومولوس، سلول گرانولوزا، مایع فولیکولی، کشت جنین.

* دکترای علوم تشریح، عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران ✉ ساری : بلوار خزر- روبروی انبار برق- دانشکده پزشکی

☜ تاریخ دریافت :۸۳/۲/۵ تاریخ تصویب:۸۳/٤/۳

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

Archive of SID

مقدمه

علی‌رغم پیشرفت‌های بسیاری که در روش‌های لقاح آزمایشگاهی(IVF) و کشت جنین اولیه در محیط آزمایشگاه (in vitro) حاصل شده است، میزان لانه‌گزینی (implantation) این جنین‌ها پس از انتقال به حفره رحمی، نسبتاً پایین می‌باشد(۱). پایین بودن کیفیت (quality) جنین‌های رشد یافته در محیط آزمایشگاه می‌تواند یک دلیل مهم برای تقلیل میزان لانه‌گزینی در رحم و در نتیجه کاهش میزان حاملگی باشد(۲). تلاش بسیاری برای افزایش کیفیت محیط‌های کشت جنین و نزدیک کردن آن به شرایط طبیعی داخل دستگاه تولید مثل ماده، در جریان می‌باشد. ساخت محیط‌های کشت جدید، استفاده از محیط‌های متوالی برای مراحل مختلف رشد جنین، اضافه‌کردن مکمل‌های (supplements) مختلف به محیط‌های کشت و استفاده از سیستم هم‌کشتی (Co- culture) سلول‌های مختلف از جمله این تلاش‌هاست (۵،۴،۳،۱).

اغلب گزارش‌ها تأثیر مثبت سیستم هم‌کشتی سلول‌های بدنی(somatic) بر تکوین جنین‌های اولیه را مورد تأیید قرار می‌دهند(۷،۶،۲)؛ با وجود این به دلیل مشکلاتی، استفاده از سیستم هم‌کشتی در درمانگاه‌های درمان نازایی (ART) به عنوان یک روش مؤثر، جا نیفتاده و مورد توجه درخور قرار نگرفته است. مشکلات تکنیکی و زمان بر بودن آماده‌سازی تک‌لایه (monolayer) سلول‌های هم‌کشتی و نیز مسآله احتمال انتقال عوامل بیماری‌زا از طریق این سلول‌ها به جنین، از مهم‌ترین موانع گسترش استفاده از هم‌کشتی در این درمانگاه‌ها می‌باشد(۲).

سلول‌های کومولوس از این لحاظ یک استثنا محسوب می‌شود؛ چرا که تهیه آن می‌تواند هنگام بیرون کشیدن اووسیت از بیمار صورت پذیرفته و مراحل آماده‌سازی آن نیز ساده می‌باشد. همچنین به دلیل استفاده از سلول‌های کومولوس یک فرد برای جنین‌های خود وی، مسأله انتقال عوامل بیماری‌زا نیز منتفی می‌گردد(۲). به همین دلیل بیش از سایر سلول‌های بدنی برای ایجاد سیستم هم‌کشتی در درمانگاه‌های ART مورد توجه قرار گرفته و برخی جنین شناسان استفاده از آن را برای افزایش میزان حاملگی توصیه می‌کنند(۲).

سلول‌های گرانولوزا در جریان رشد و نمو فولیکول در داخل تخمدان در معرض یک محیط میکرو که توسط مایع فولیکولی فراهم می‌شود، قرار داشته و تحت شرایط مناسب از جمله غلظت مناسب هورمون‌های پروژسترون و استروژن تزاید و تمایز پیدا می‌کند. ما در تحقیقات قبلی نشان دادیم که مایع فولیکولی می‌تواند به عنوان محیط کشت مناسب برای جنین‌های اولیه موش، تکوین آن‌ها را از مرحله دوسلولی تا ایجاد بلاستوسیست به خوبی تضمین کرده و از این لحاظ حتی بر محیط کشت هامز F10 برتری دارد (۹). همچنین تحقیقات، نشان داد که هم‌کشتی سلول‌های گرانولوزا در محیط هامز F10 می‌تواند به طور معنی‌داری درصد بالاتری از جنین‌های یک سلولی موش را از مرحله توقف رشدی مرحله دوسلولی عبور داده و به مرحله بلاستوسیست برساند(۱۰).

تصور این‌که مایع فولیکولی بتواند رشد و نمو سلول‌های کومولوس و ایجاد تک‌لایه‌ای از آن را به خوبی پیش برده و سیستم هم‌کشتی مناسبی را برای استفاده جنین‌های اولیه فراهم آورد، دور از ذهن نمی‌باشد. هدف از این تحقیق، بررسی ایجاد هم‌کشتی سلول‌های کومولوس در مایع فولیکولی و بررسی اثر آن بر جنین‌های یک سلولی موش می‌باشد.

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

Archive of SID

مـواد و روش هـا

حیوان آزمایشگاهی و گرفتن جنین

برای تهیه جنین از موش‌های سوری(NMARI) استفاده شد. سن حیوانات ۶ تا ۱۰ هفته و شرایط نگهداری آن‌ها ۱۲ ساعت در نور و ۱۲ ساعت در تاریکی و دمای ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی‌گراد بوده است. برای گرفتن جنین‌ها به حیوانات ماده، ۷ واحد هورمون HMG و ۴۸ ساعت بعد، ۷ واحد هورمون hCG به طریق داخل صفاقی تزریق می‌شد. بلافاصله پس از تزریق hCG، حیوان ماده با موش نر از همان‌گونه در یک قفس جفت گیری می‌کرد و صبح روز بعد، با معیار پلاک واژنی، حیواناتی را که جفت‌گیری انجام داده بودند، جدا و پس از کشتن به طریق قطع نخاع گردنی، لوله رحمی آن‌ها خارج و به محیط کشت انتقال داده می‌شد. توده کومولوس با پاره‌کردن ناحیه آمپولای لوله رحمی از آن خارج و پس از شست و شو به قطره‌ای تمیز از محیط کشت HTF(حاوی بافر hepes) انتقال داده می‌شدند؛ سپس آن را به مدت ۲ دقیقه در محیط کشت محتوی هیالورونیداز ۱ درصد نگاه داشته و در همین حال با پی‌پت کردن مکرر، جنین از سلول‌های کومولوس جدا می‌شد. جنین‌ها پس از چندبار شست و شو در قطره‌ای درشت از محیط HTF جمع‌آوری می‌شدند تا برای کشت آماده شوند.

کشت سلول‌های کومولوس

آماده کردن سلول‌های کومولوس با استفاده از روش پرکل انجام پذیرفت(۳). برای این کار سلول‌های کومولوس را به همراه قطره محیط کشت جمع‌آوری کرده و پس از انتقال به یک لوله سانتریفوژ استریل با اضافه کردن محیط کشت HTF(به منظور شست و شو) حجم آن رابه ۵^{ml} رسانده و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰×g سانتریفوژ می‌نماییم. پس از دور ریختن مایع رویی، مجدداً محیط تازه به حجم ۳^{ml} به لوله اضافه کرده و با هم زدن پلاک ایجاد شده را به حالت سوسپانسیون در می‌آوریم. به منظور جدا کردن سلول‌های خونی از سلول‌های کومولوس، سوسپانسیون مزبور رابه آرامی به روی پرکل ۵۰ درصد که با حجم ۳^{ml} در داخل یک لوله سانتریفوژ آماده نمودیم، انتقال داده و با سرعت ۳۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می‌نماییم. سلول‌های خونی به طور عمده به ته لوله رفته و سلول‌های کومولوس در فاصله بین محیط کشت و پرکل تجمع پیدا می‌کنند.

محیط ناحیه بینابینی(به حجم ۲^{ml}-۱) را با استفاده از پی‌پت جدا کرده به لوله دیگر انتقال و به منظور شست و شو ۲^{ml} محیط کشت HTF به آن اضافه کرده و با سرعت ۱۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می‌نماییم. مایع رویی، دور ریخته شده و این بار مقدار ۲^{ml} محیط هامز F10 به پلاک اضافه کرده و پس از به هم زدن و آزاد کردن پلاک مجدداً با سرعت ۱۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می‌نماییم. پس از دور ریختن مایع رویی، پلاک را در محیط اندک باقیمانده آزاد نموده و با شمارش تعداد سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار، با اضافه کردن محیط کشت وایجاد حجم مناسب، تعداد سلول‌ها را به ۱×۱۰^{۶} در هر میلی‌متر مکعب رسانده و سپس با استفاده از آن قطراتی به حجم تقریبی ۲۰ میکرون در ظرف کشت نهاده و رویش را با روغن معدنی می‌پوشانیم. برای آماده‌سازی محیط هم‌کشتی سلول‌های کومولوس در مایع فولیکولی (FF)، ضمن تکرار مراحل آماده‌سازی سلول‌های کومولوس در مراحل انتهایی به جای محیط هامز F10 از مایع فولیکولی استفاده شده و در نهایت سلول‌های کومولوس در قطره‌هایی به حجم ۲۰ میکرون از FF کشت داده می‌شدند تا تک‌لایه آن آماده شود.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه مایع فولیکولی

مایع فولیکولی به منظور گرفتن تخمک در زنانی که تحت عمل درمانی IVF یا ICSI در بخش ناباروری بیمارستان امام ساری قرار می‌گرفتند، تهیه می‌شد. تحریک تخمدانی بیماران با استفاده از کلومیفن و HMG و تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از hCG انجام پذیرفته بود. فقط مایع فولیکولی که خونی نبوده و حاوی اووسیت بود، مورد استفاده قرار می‌گرفت. پس از جداکردن اووسیت وذرات و تکه‌های درشت، به منظور جداکردن تمامی ذرات کومولوس، FF به لوله سانتریفوژ انتقال یافته و با سرعت g×۶۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شده و سپس مایع‌رویی را توسط سرنگ کشیده و با استفاده از صافی mm ۲۲٪ آن را غربال می‌نماییم. FF غربال شده به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آبی با دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد تا ترکیباتی آلی‌سمی احتمالی آن غیرفعال شوند (فرآیند غیرفعال سازی، (inactivation)(۹).

گروه‌های مورد تجربه و پیگیری تکوین جنین‌ها

کشت سلول‌های کومولوس در محیط کشت هامز F10 و محیط FF، مدت ۴۸ سال ادامه می‌یافت تا تک‌لایه آن در کف ظرف ایجاد شود؛ آنگاه جنین‌های یک سلولی موش که به تازگی از توده کومولوس جدا شده و در قطره‌ای واحد از محیط HTF شده بودند، تعداد تقریباً مساوی (۱۵-۱۰تایی) به طور تصادفی جدا و پس از دوبار شست و شو در محیط‌های هامز F10 یا FF به قطره‌های مورد نظر انتقال داده شده و سپس ظروف کشت به انکوباتور منتقل می‌شدند. محیط‌های مورد تجربه عبارت بودند از:

محیط کشت هامز F10 (HF)، محیط کشت مایع فولیکولی (FF)، محیط هامز F10 با هم کشتی سلول‌های کومولوس (HC) و محیط FF با هم‌کشتی سلول‌های کومولوس (FC). بررسی تکوین جنین‌ها هر ۲۴ ساعت یک‌بار و برای مدت ۵ روز (۱۲۰ ساعت) انجام پذیرفته و مراحل مختلف نمو جنین ثبت می‌شد.

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی آماری یافته‌ها در نرم‌افزار SPSS انجام پذیرفت. نسبت جنین‌هایی که در هر یک از محیط‌های مورد تجربه، مراحل یک‌سلولی و توقف رشدی دوسلولی را پشت سرگذاشته و به مرحله بلاستوسیست رسیدند، محاسبه و میانگین نسبت‌ها مورد مقایسه آماری قرار گرفت. مقایسه آماری میانگین‌ها با استفاده از ANOVA انجام پذیرفت. ازTukey's test به عنوان آزمون post Hoc استفاده شده است.

یافته‌ها

۹۳۹ جنین یک‌سلولی در چهار محیط کشت مختلف شامل هامز F10(HF)، هامز با هم‌کشتی سلول‌های کومولوس (HC)، مایع فولیکولی (FF) و مایع فولیکولی با هم کشتی سلول‌های کومولوس (FC) به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند. از ۸۶ جنین کشت داده شده در محیط HF، همگی به مرحله ۲ سلولی رسیدند، اما ازاین تعداد فقط ۹ جنین با ردکردن مرحله توقف رشدی به مرحله ۴ الی ۸ سلولی رسیدند (۱۰درصد، جدول شماره ۱).

این نسبت برای گروه‌های HC، FF و FC به ترتیب ۲۰ ، ۲۷ و ۶۹ درصد بوده است که هر سه گروه، اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه HF نشان می‌دهند ($P <$ ۰/۰۵). همچنین نسبت جنین‌هایی که موفق به رد توقف رشدی شدند درگروه FC در مقایسه با دو گروه FF و HC به طور معنی‌داری بالاتر بوده است ($P <$ ۰/۰۰۱).

در محیط FC، ۳۵ درصد جنین‌هایی که مرحله ایست دوسلولی را پشت سرگذاشته به رشد خود ادامه داده و به مرحله بلاستوسیست رسیدند. این نسبت برای

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

Archive of SID

گروه‌های HF، HC و FF به ترتیب ۰، ۸/۹ و ۷/۷ درصد بوده است(جدول شماره ۱)

نسبت بلاستوسیست درگروه FC به طور معنی‌داری بالاتر از سه گروه دیگر بوده است(P <۰/۰۰۱). اختلاف نسبت بلاستوسیست در گروه‌های HC و FF نیز در مقایسه با گروه H معنی‌دار بوده است (P <۰/۰۰۱) ولی نسبت به هم، تفاوت معنی‌داری نداشتند.

جدول شماره ۱: نتایج حاصل از کشت جنین یک سلولی موش در محیط‌های هامز F و CH هامز با هم‌کشتی سلول‌های کومولوس،(HC)، مایع فولیکولی (FF) و مایع فولیکول با هم‌کشتی سلول‌های کومولوس(FC) پس از ۱۲۰ ساعت کشت

محیط کشت	تعداد جنین سلولی کشت داده‌شده	دفعات تکرار	جنین‌هایی که مرحله دوسلولی را پشت سر گذاشته (درصد)	مرحله بلاستوسیست (درصد)
HF	۸۶	۹	۹ (۱۰±۴)[a]	۰ [a]
HC	۳۱۳	۹	۶۷ (۲۱±۶)[b]	۶(۸/۹±۲) [b]
FF	۹۵	۹	۲۶ (۲۷±۳)[b]	۲ (۷/۷±۲) [b]
FC	۴۴۵	۹	۳۰۵ (۶۹±۱۳) [c]	۱۵۶(۳۵±۵) [c]

b. (P <۰/۰۰۱)a معنی‌دار نسبت به گروه

c.(P <۰/۰۰۱)b معنی‌دار نسبت به a و

بحث

یافته‌های تحقیق نشان داد که مایع فولیکولی انسان، شرایط محیطی مناسب‌تری را برای جنین‌های یک سلولی موش در مقایسه با محیط هامز F10 فراهم می‌آورد؛ به گونه‌ای که در این محیط هم نسبت جنین‌هایی که توقف رشدی مرحله ۲ سلولی را پشت سر می‌گذارند، در مقایسه با هامز بیشتر است و هم درصد بالاتری از جنین‌هایی که از این مرحله بحرانی عبور کردند، به رشد خود تا مرحله بلاستوسیست ادامه می‌دهند. استفاده از هم‌کشتی سلول‌های کومولوس در هامز، آشکارا شرایط محیط هامز را بهبود می‌بخشد؛ به گونه‌ای که نسبت رد مرحله توقف رشدی و نیز رسیدن به مرحله بلاستوسیست در HC با FF دیگر تفاوتی را نشان نمی‌دهد. وقتی از مایع فولیکولی به عنوان محیط پایه برای هم‌کشتی سلول‌های کومولوس استفاده شد (FC)، تأثیر سیستم هم‌کشتی در رد توقف رشدی جنین‌های ۲ سلولی وتکوین آنها تا بلاستوسیست به مراتب افزایش یافت که نشان دهنده اثر تقویت‌کنندگی(synergistic) مایع فولیکولی وسلول‌های کومولوس بر یکدیگر در ایجاد شرایط مناسب برای کشت جنین‌های اولیه موش می‌باشد.

یافته‌های این تحقیق در خصوص شرایط مناسب محیط طبیعی مایع فولیکولی برای تکوین جنین‌های اولیه در مقایسه با هامز، تأیید مجدد گزارش پیشین ما می‌باشد(۹). با وجود این‌که در مایع فولیکولی، نسبت بالاتری از جنین‌های یک‌سلولی در مقایسه با محیط هامز F10، مرحله توقف رشدی را پشت سر گذاشته و به مرحله بلاستوسیست رسیدند، این مقدار نسبتاً پایین بوده و نمی‌توان از FF به عنوان یک محیط قابل اعتماد برای پشت‌سر گذاشتن مرحله توقف رشدی جنین‌های موش یاد کرد.گزارش‌های معدود دیگری نیز در خصوص تأثیر مثبت مایع فولیکولی در بهبود شرایط محیط کشت جنین‌های اولیه وجود دارد(۱۲،۱۱). در مقابل kim و همکاران(۱۹۹۶) گزارش کردند که اضافه کردن مایع فولیکولی به نسبت ۱۰ و ۳۰ درصد به محیط ۱۹۹ در تکوین جنین‌های گاو بی‌تأثیر بوده و نسبت بلاستوسیست در محیط ۱۹۹ حاوی ۶۰ درصد مایع فولیکولی در مقایسه با محیط کشت بدون مایع فولیکولی کاهش پیدا کرد (۱۳). شاید دلیل این تفاوت آن باشد که این محققان اووسیت‌های نابالغ را در محیط حاوی FF کشت داده سپس آن را لقاح داده وتا مرحله بلاستوسیست کشت دادند؛ در حالی که در مطالعه حاضر، تکوین جنین‌های

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

www.SID.ir

Archive of SID

یک سلولی موش تا مرحله بلاستوسیست مورد بررسی قرار گرفت. بلوغ اووسیت شامل تغییرات فیزیولوژیک و مولکولی مهمی می‌باشد که علی‌رغم پیشرفت زیادی که در تکنیک کشت اووسیت در محیط آزمایشگاه(IVM) حاصل شده، اووسیت‌هایی که در محیط آزمایشگاه بالغ می‌شوند، توانایی لقاح و ظرفیت ادامه رشد کم‌تری در مقایسه با اووسیت‌هایی که در داخل بدن مراحل بلوغی را پشت سر می‌گذارند، دارند(۱۴).

کاظمی وهمکاران (۱۳۷۶) نیز ضمن تأیید شرایط مطلوبی که مایع فولیکولی بر لقاح تخمک‌ها و رشد و نمو جنین‌های اولیه فراهم می‌آورد، برخلاف یافته‌های این تحقیق، گزارش کردند که FF و نیز محیط هم‌کشتی هامز با سلول‌های گرانولوزا قادر به حمایت از جنین‌های یک سلولی برای پشت سر گذاشتن مرحله توقف رشدی دوسلولی و رساندن آنها به مرحله بلاستوسیت نمی‌باشند.

همچنین این تحقیق، گزارش محققان دیگر در خصوص تأثیر مثبت سیستم هم‌کشتی سلول‌های گرانولوزا در پشت سر گذاردن مرحله توقف رشدی جنین اولیه(۸) و نیز افزایش نسبت بلاستوسیست‌ها (۱۰،۷،۶،۳،۵) را مورد تأیید قرار می‌دهد.

یافته‌های این تحقیق همچنین نشان داد که سیستم هم‌کشتی سلول‌های کومولوس درمایع فولیکولی درایجاد شرایط مناسب برای تکوین جنین‌های اولیه به مراتب بهتر از هم‌کشتی همین سلول‌ها در محیط هامز عمل می‌کند. به عبارت دیگر، سلول‌های کومولوس و مایع فولیکولی در حمایت از تکوین جنین دارای اثر تقویت-کنندگی یکدیگر می‌باشند. این اثر توسط آقای کاظمی و همکاران(۱۳۷۶) نیز گزارش شده بود(۱۱). Fabbri و همکاران (۱۹۹۸) نیز براثر قابل ملاحظه سیستم هم‌کشتی سلول‌های گرانولوزا در مایع فولیکولی بر پارامترهای حرکتی اسپرم، فعالیت انفجاری (hyperactivation) و واکنش آکروزومی آن تأکید کردند (۱۶).

توجیه این‌که مایع فولیکولی می‌تواند شرایط مناسب‌تری را برای هم‌کشتی سلول‌های کومولوس فراهم آورد، مشکل نمی‌باشد. مایع فولیکولی تمام مواد اولیه همانند یون‌های ضروری و منبع انرژی لازم برای رشد سلول‌ها را دارا است(۱۷)؛ و از این لحاظ تفاوت چندانی‌بایک محیط صناعی‌نمی‌کند. اماکشت سلول‌های گرانولوزا این مزیت را نسبت به‌یک محیط کشت‌صناعی داردکه حاوی هورمون‌های‌استروئیدی، فاکتورهای رشد مختلفی چون فاکتور رشد شبه انسولین I وII، پروتئین القاکننده سنتز استروئیدها، فاکتور نکروزه کننده تومور(tumour necrosis factor-α)، فاکتور رشد اندوتلیالی (vascular endothelial growth factor) و سیتوکین‌هایی مثل‌اینترلوکین IL_1 و۱،اینترلوکین۶(IL6) وپروستاگلاندین‌ها می‌باشد(۱۸،۱۶،۱۵). بسیاری از این فاکتورها دارای اثرات میتوژنیک بر سلول‌های بدنی می‌باشند. برخی تحقیقات نیز نشان دادند که درمحیط آزمایشگاه، مایع فولیکولی می‌تواند اثرات میتوژنیکی خود را اعمال کرده و باعث تحریک تزاید سلولی شود(۱۶).

یک‌سیستم هم‌کشتی‌سلول‌های بدنی(somatic cells) همانند سلول‌های کومولوس احتمالاً به طرق مختلف شرایط را برای تکوین جنین‌های اولیه در محیط خارج از بدن مطلوب‌تر می‌نماید. این سلول‌ها ممکن است سموم و فاکتورهای نامطلوب احتمالی موجود درمحیط کشت را خنثی نمایند، سبب خنثی‌شدن رادیکال‌های آزاد به‌وجود آمده درمحیط میکرو جنین‌ها گردند(۷)، فاکتورهای امبریوتروفیک همانند فاکتورهای رشد در محیط، آزاد نمایند(۱۵)، فعالیت متابلیکی جنین‌ها را تسهیل نموده و افزایش دهند(۲) و یا با ترشح فاکتورهای

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

Archive of SID

مهارکننده آپوپتوز، تعداد بلاستومرهای آپوپتوتیک را در جنین‌های اولیه کاهش دهند(۱۹).

بر اساس یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که سیستم هم‌کشتی سلول‌های کومولوس در مایع فولیکولی، سیستم مناسبی برای ایجاد شرایط مطلوب تر برای تکوین جنین‌های اولیه در مقایسه با یک محیط کشت مرکب متداول (هامزF10) محسوب می‌شود. اهمیت این سیستم در آن است که ضمن سهولت ایجاد، در حالی که هم‌کشتی سلول‌های کومولوس و مایع فولیکولی هریک به تنهایی نیز دارای اثرات مطلوب در تکوین جنین اولیه می‌باشند، با در کنار هم قرار گرفتن اثرات مثبت‌آن‌ها،حمایت ازتکوین‌جنین تقویت می‌شود.

فهرست منابع

1. Piekos MW, Frasor J, Mack S, Bior Z, Soltes B, Molo MW, et al. Evalution of co-cultrure and alternative system for promoting in vitro development of mouse embryos. ***Journal of the Society for Gynecologic Investigation***,1995; 2(2): 367.
2. Dirnfeld M, Koifman M, Goldman S, Calderon I, Gonen Y, Abramovici H. A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. ***Fertil Steril,*** 1997; 67(1): 120- 123.
3. Gutierrez- Adan A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B,etal. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ration of bovine embryos. ***Theriogenology*** 2001; 55(5): 1117-1126.
4. Khabaini A, Shen S, Fujimoto UY, Houmard BS, Rainer C, Battaglia DE. Improved embryo quality and rates of cryopreservation with modification in an in vitro fertilization (IVF) culture system. ***Fertil Steril*** 2000; 74(3) supplement 1: S104.
5. Ali J, Shahata MA and Al- natsha SD. Formulation of a protein free medium for human assisted reproduction. ***Hum Reprod,*** 2000; 15(1): 145-156.
6. Minami N.Early embryonic development under oviductal influence in vitro. ***Animal Reproduction Science,*** 1996; 42:361-369.
7. Bongso A, Ng Sc, Fong CY and Ratnam XY. Coculture: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. ***Fertile Steril*** 1991; 56: 179-191.
8. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Sofikitic N, Kallipolitis G, Milingus S, et al. Biological factors in culture media affecting in vitro fertilization, preimplantation embryo development and implantation. ***Ann- N-Y-Acad- Sci,*** 2000; 900: 325- 335.
9. کریم‌پور عباسعلی، حسینی احمد و رضازاده مجتبی. اثر مایع فولیکولر انسان بر رشد و تکامل جنین‌های اولیه موش در محیط آزمایشگاه. پژوهش در پزشکی ***(مجله پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)***، ۱۳۷۴، سال ۱۹، شماره‌های ۴،۳، صفحه ۶۱.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

www.SID.ir

Archive of SID

۱۰. کریم‌پور عباسعلی و اسماعیل نژاد مقدم امیر. تأثیر هم‌کشتی(co-culture) سلول‌های گرانولوزا درتکوین جنین‌های یک سلولی موش در محیط آزمایشگاه (in vitro). ***پژوهش در پزشکی*** (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه‌علوم پزشکی شهیدبهشتی). ۱۳۸۲(در دست چاپ)

۱۱. کاظمی سعید، حسینی احمد و رضازاده ولوجردی مجتبی، بررسی قدرت مایع فولیکولی انسان و co-culture سلول‌های گرانولوزا در لقاح و رشد جنین‌های موش سوری. ***پایان‌نامه دکتری***، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح، اسفند ۱۳۷۶.

12. Hemmings R, Lachapelle MH, Falcone T, Miron P, word L, Guyda H. Effect of follicular fluid supplementation on the in vitro development of human pre-embyos. ***Fertil Steril*** 1994; 62(5): 1018-1021.

13. Kim KS, Mitsumizo N, Fujita K, Utsumi K. The effect of follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. ***Theriogenology*** 1996; 45: 787-799.

14. Bogh IB, Bezard J, Duchamp G, Baltsen M, Gerard N, Daels P, Greve T. Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vitro aspirated equine oocytes. ***Theriogenology***, 2002; 57: 1765-1779.

15. Yuan-qing Yao, Pak- chung Ho, William shu-biu Yeung. Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. ***Fertil Steril,*** 2000; 73(4): 680- 686.

16. R. F, Eleonora P, Anderea L. Loredana G, Tiziana M, Carlo F. Follicaular fluid and human granalosa cell culture: influence on sperm Kinetic parameters hyperactivation, and acrosome reaction. ***Fertile Steril,*** 1998, 69(1): 112- 117.

17. Shalgi R, Kaicer PF, Soferman N. Gases and electrolytes of human follicular fluid. ***J. Reprod. Fert***, 1972; 28: 335- 340.

18. Benifla JL, Bringuier AF, Sifer C, Madelenat P, Feldman GF. Vascular endothelial growth factor, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the follicular fluid of patients undergoing IVF. ***Hum. Reprod,*** 2001; 16(7): 1376-1381.

19. Johnson AL, Langer YS, Bridgham OT. Survivin as a cell cycle- related and antiapoptic protein in granulosa cells. ***Endocrinology***, 2002; 143(9): 3405-3413.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

www.SID.ir