ORIGINAL ARTICLE

Effect of Mitomycin C and Co-culture with Fibroblast and Cumulus Cells on In vitro Maturation of Immature Mouse Oocytes

Mehran Davarifar[1],
Ramazan Khanbabaee[2],
Mahmoud Heidari[3]

[1] MSc in Cellular and Developmental Biology, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran

(Received June 8, 2015 Accepted November 2, 2015)

Abstract

Background and purpose: Mitomycin C (MMC) is used as an antiproliferative agent for feeder cells in cell culture. It may induce destructive effects on these cells and eventually on oocytes maturation. This study was conducted to investigate the effect of MMC and co-culturing with fibroblast and cumulus cells on in vitro maturation (IVM) of mouse immature oocytes.

Materials and methods: In this experimental study, germinal vesicle oocytes (GV) obtained from NMRI mature female mice were cultured in αMEM supplemented by FSH, hCG, fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin, at 37 °C and 5% CO2 in following groups: a control group and four experimental groups; 1– co-cultured with cumulus cells, 2 – co-cultured with mouse embryonic fibroblast (MEF) cells, 3 - co-cultured with cumulus cells treated with MMC, and 4 - co-cultured with MEF treated with MMC. After 24 hours, number of GV, GVBD, MII and degenerated oocytes were determined using invert microscope. Data were analyzed using ANOVA with Tukey test.

Results: The percentages of GV (24±2.75) and MII (51±2.28) oocytes in control group were significantly higher (8±2.25, 10±2.29, 10±2.28, 11±1.19) and lower (64±2.34, 63±2.62, 62±2.86, 62±2.47) than those in all experimental groups, respectively. Nevertheless, no significant difference was observed between experimental groups.

Conclusion: Co-culturing with fibroblast and cumulus cells promoted in vitro maturation of immature oocytes. There was no significant difference among experimental groups, therefore, removal of monolayer inactivation step by MMC from such protocols can be proposed.

Keywords: Mitomycin C, in vitro maturation, mouse embryonic fibroblast, cumulus cells, co-culture

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(133): 218-226 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۳ بهمن سال ۱۳۹۴ (۲۲۶-۲۱۸)

تأثیر میتومایسین C و همکشتی با سلول های فیبروبلاست و کومولوس بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت های نابالغ موش سوری

مهران داوری فر [۱]
رمضان خان بابایی [۲]
محمود حیدری [۳]

چکیده

سابقه و هدف: میتومایسین C که به منظور جلوگیری از تکثیر سلول‌های همکشتی در کشت سلول به کار می‌رود، ممکن است با تأثیر مخرب خود بر این سلول‌ها نهایتاً اثرات نامطلوبی بر بلوغ اووسیت‌ها بگذارد. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر میتومایسین و همکشتی سلول‌های فیبروبلاست و کومولوس بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های نابالغ موش انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، اووسیت‌های مرحله وزیکول زایا به دست آمده از موش‌های سوری در محیط αMEM تکمیل شده با FSH، hCG، سرم جنینی گاوی، پنی‌سیلین و استرپتومایسین در گروه‌های ذیل کشت شدند: گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی ۱: همکشتی با سلول‌های کومولوسی، ۲: همکشتی با فیبروبلاستی جنینی موش، ۳- همکشتی با سلول‌های کومولوسی تیمار شده با میتومایسین C، ۴- همکشتی با فیبروبلاست جنینی موش تیمار شده با میتومایسین C. پس از ۲۴ ساعت، تعداد اووسیت‌های بالغ نشده، متافاز II، GVBD و دژنره شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی شد. آنالیز واریانس و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون Tukey انجام گرفت.

یافته‌ها: درصد اووسیت های مرحله وزیکول زایا (۲/۷۵±۲۴) و متافاز II (۲/۲۸±۵۱) در گروه کنترل با اختلاف معنی‌داری به ترتیب بیش‌تر از ۲/۲۵±۸ و ۲/۲۹±۱۰ و ۲/۲۸±۱۰ و۱/۱۹±۱۱ و کم تر از ۲/۳۴±۶۴ و ۲/۶۲±۶۳ و ۲/۸۶±۶۲ و ۲/۴۷±۶۲ همه گروه‌های آزمایشی بود. با این حال، بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

استنتاج: همکشتی با سلول های فیبروبلاست و کومولوس باعث بهبود بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های نابالغ گردید و با توجه به عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی می‌توان حذف بخش غیرفعال سازی سلول‌های مذکور با میتومایسین را از پروتکل‌های رایج پیشنهاد نمود.

واژه های کلیدی: میتومایسین C، بلوغ آزمایشگاهی، فیبروبلاست جنینی موش، سلول‌های کومولوسی، همکشتی

مقدمه

بلوغ آزمایشگاهی (In Vitro Maturation) اووسیت برای بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (Poly Cystic Ovarian Syndrome) که تخمک‌گذاری به درستی صورت نمی‌گیرد و هم‌چنین بیماران با خطر بالای ناباروری در آینده مانند زنان جوانی که تحت شیمی درمانی مهاجم گونادوتوکسیک قرار دارند،

مولف مسئول: محمود حیدری-گرگان: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان E-mail: mahmodh78@gmail.com
۱. کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائم شهر، قائم شهر، ایران
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائم شهر، قائم شهر، ایران
۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۳/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۴/۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۸/۱۱

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

گزینه‌ای مناسب برای حفظ توان باروری به شمار می‌آید. علاوه بر این ممکن است پروتکل‌های استاندارد درمان ناباروری که از تزریق دوزهای بالای گنادوتروپین جهت افزایش تخمک گذاری بهره‌گیری می‌شود، در بیماران مبتلا به تومورهای حساس به هورمون، منع مصرف هورمونی وجود داشته باشند(۱). تکنیک بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها به شدت مقدار مصرف گنادوتروپین‌های برونزاد را کم کرده و از تاثیرات سوء آن‌ها جلوگیری می‌کند(۲). یکی از مکانیسم‌های موجود جهت بهبود نتایج IVM، استفاده از سیستم‌های همکشتی است. سلول‌های تغذیه کننده، محیطی ایده‌آل را برای رشد و نگهداری سلول‌های بنیادی جنینی انسان تولید می‌کنند(۳). از مزایای سیستم همکشتی می‌توان به ترشح فاکتورهای محرک رشد هم چون مواد مغذی، سوبستراهای گوناگون، فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌ها و حذف مواد سمی از محیط کشت توسط سلول‌های موجود در لایه همکشتی اشاره کرد(۵،۴).

برخی از مطالعات به بررسی اثر همکشتی بر بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی اووسیت‌های اولیه که جهت برنامه‌های IVF به‌کارمی روند، در چند گونه محدود از جمله اسب(۶)، سگ(۷)، و حتی تخمک‌های نابالغ فاقد کومولوس انسان(۸)، پرداخته‌اند. نتایج پژوهش‌هایی مانند مطالعه نام‌آور جهرمی و همکاران که با هدف بررسی اثر همکشتی سلول‌های گرانولوزا بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت انسان صورت گرفت، حاکی از آن است که متعاقب همکشتی تخمک‌ها با سلول‌های سوماتیک طی بلوغ آزمایشگاهی، درصد لقاح و تکوین جنینی نیز بهبود می‌یابد(۹).

میتومایسین C (MMC=Mitomycin C) ترکیبی طبیعی استخراج شده از باکتری گرم منفی *Streptomyces caespitosus* است. MMC می‌تواند به سبب توانایی آلکیله کنندگی خود در حالت احیا، با تشکیل یون‌های کربونیوم، موجب اتصال متقابل دو رشته DNA بین آدنوزین و گوانین در اواخر مراحل G1 و یا S و جلوگیری از جدا شدن دو رشته DNA در طول همانندسازی از یکدیگر و نهایتاً توقف میتوز گردد. MMC به طور گسترده‌ای به عنوان داروی آنتی‌بیوتیک ضد باکتری و شیمی درمانی برای تعدیل تکثیر سلولی و سنتز پروتئین جهت کنترل بیماری‌ها استفاده می‌شود. کاربرد ضد فیبروزی MMC در مجاری تنفسی از طریق مهار رشد فیبروبلاست و مهار سنتز کلاژن آن‌ها مشخص شده است(۱۰). از آن‌جایی که MMC تکثیر انواع مختلف سلول‌ها را در شرایط in vitro مهار می‌کند، می‌توان با به کار بردن دوز و زمان انکوباسیون مطلوب این دارو، بدون صرف هزینه زیاد و سختی و خطر کار با اشعه گاما، کشت‌های طویل المدت انجام داد که در نتیجه رشد سلول‌های تک لایه‌ای تغذیه‌کننده چسبنده‌ای چون سلول های فیبروبلاستی موش مهار می‌شود(۱۱).

در این تحقیق، که در مدل موشی انجام شده و تلاشی برای بهبود روش‌های IVM است، از خاصیت ضد تکثیری MMC جهت کنترل تکثیر و ایجاد بستر تک لایه‌ای از سلول‌های همکشت استفاده شده و علاوه بر بررسی و مقایسه اثرات همکشتی سلول‌های کومولوسی و فیبروبلاستی جنینی بر اووسیت‌های نابالغ (GV=Germinal Vesicle) موش سوری، اثرات در معرض قرارگیری سلول‌های کومولوسی و فیبروبلاستی با MMC در بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این تحقیق تجربی، روغن معدنی و آنتی بیوتیک‌ها از شرکت Sigma، گنادوتروپین سرم مادیان باردار (PMSG با نام تجاری Gonaser) از اسپانیا، هورمون محرکه فولیکولی نوترکیب (rFSH با نام تجاری Gonal-f) از MERC آلمان، گنادوتروپین کوریونی انسان (hCG با نام تجاری pregnyl) از داروپخش ایران، آنزیم DNase1 از Thermo، Mitomycin (Kyowa) و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

محیط‌های کشت، سرم جنینی گاوی، تریپسین، EDTA و فسفات بافر سالین از شرکت Gibco تهیه شدند.

حیوانات

در این مطالعه تجربی تعداد ۴۰ سر موش ماده و ۴ موش نر سوری نژاد NMRI از مؤسسه تحقیقاتی پاستور آمل (پژوهشکده شمال کشور) خریداری و در بخش نگهداری حیوانات آزمایشگاهی این پژوهشکده نگهداری شده و مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌های ماده در سن ۸-۷ هفته و موش‌های نر ۹-۸ هفته با سابقه باروری تأیید شده بودند. تمام موش‌ها در شرایط نور و دمای کنترل شده (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد)، تغذیه با غذای فشرده (pellet) تهیه شده توسط انستیتو پاستور آمل و آب لوله‌کشی همیشه در اختیار و به مقدار کافی، نگهداری شدند.

آماده سازی فیبروبلاست جنینی موش (MEF)

در تهیه فیبروبلاست جنینی موش، از روش Hatoya و همکاران(۱۲) و Jozefczuk و همکاران(۱۳) استفاده شد. تحریک تخمک گذاری موش های ماده با تزریق درون صفاقی ۵ واحد PMSG و ۴۸ ساعت بعد از آن با تزریق ۷/۵ واحد پرگنیل (hCG) صورت گرفت. سپس موش‌های ماده با نرهای هم نژاد قرار گرفته و صبح بعد، برای وجود پلاک واژنی مورد بررسی حاملگی قرار گرفتند. جنین‌ها در روز ۱۲ تا ۱۳ حاملگی جمع‌آوری شدند و در PBS کاملاً شسته شدند. سر و اندام‌های داخلی حذف شدند، نمونه‌ها با تیغ جراحی استریل قطعه قطعه و سپس تریپسینه شده و تحت اثر DNAase1 قرار گرفتند و نهایتاً در محیط DMEM-F12 تکمیل شده با ۱۰ درصد FBS، ۱۰۰ IU/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین در رطوبت ۵ درصد Co2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. پاساژهای متوالی با فاصله زمانی هر دو الی سه روز تا رسیدن به پاساژ چهارم که مورد نظر انجام آزمایش و ایجاد تک لایه سلول‌های فیبروبلاستی جنینی موش بود، ادامه یافت.

آماده سازی سلول کومولوس (CC)

آماده‌سازی تک لایه سلولی کومولوس، بر اساس روش حاجی علیزاده و همکاران(۱۴) با اندکی تغییر انجام شد. ۱۶-۱۴ ساعت بعد از تیمار hCG، مجموعه‌های اووسیت-کومولوس به دست آمدند. سپس مجموعه‌های اووسیت- کومولوس مستقیماً به ظروف پتری کشت ۸ سانتی متری استریل محتوی محیط کشت α MEM تکمیل شده با ۱۰درصد FBS منتقل شدند. هر ۴۸ ساعت، ۵۰ درصد از محیط کشت تعویض گردید. پس از ۶ روز، محیط کشت تخلیه شده و پس از شستشو سلول‌ها با PBS، مجموعه سلول‌های تکثیر یافته با تریپسین-EDTA، تریپسینه و سلول‌های کومولوس موجود با پیپت دهانی استریل از اووسیت‌ها جدا شده و به لوله ی فالکون ۱۵ میلی لیتری حاوی ۳ میلی‌لیتر α MEM منتقل شدند. سوسپانسیون حاصله در ۷۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع فوقانی دور ریخته شد. رسوب سلول‌های کومولوس در α MEM حاوی ۱۰ درصد FBS مجدداً کشت داده شد.

جمع آوری اووسیت‌های نابالغ (GV)

اووسیت‌های نابالغ از موش‌های ماده ۸-۶ هفته‌ای به دست آمدند. موش‌ها ۴۸ ساعت بعد از تزریق درون صفاقی ۵-۱۰ واحد PMSG با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند. سپس تخمدان‌ها خارج و درون محیط کشت αMEM تکمیل شده با ۱۰ درصد FBS قرار داده شدند. اووسیت‌های مرحله GV از فولیکول‌های تخمدانی توسط سوزن‌های سرنگ انسولین استریل زیر استریومیکروسکوپ آزاد شدند. مراحل استحصال اووسیت‌های نابالغ مطابق کار محمودی و همکاران(۱۵) انجام شد. در کل تعداد ۵۰۰ اووسیت به دست آمده از ۴۰ تخمدان، جهت بلوغ آزمایشگاهی در این تحقیق به کار برده شدند.

طراحی آزمایش

اووسیت‌های نابالغ جمع آوری شده به‌طور تصادفی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

در ۵ تیمار مختلف کشت شدند. در اولین گروه (کنترل؛ Con) اووسیت‌ها در محیط αMEM تکمیل شده با گنادوتروپین‌های rFSH و LH، ۱۰ درصد FBS، آنتی بیوتیک (۱۰۰ IU/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین) کشت شدند. سایر گروه‌های آزمایشی (EXP) به ترتیب زیر بودند:

گروه ۱ (EXP1): همکشتی اووسیت‌های نابالغ با تک لایه سلول‌های کومولوسی در محیط فوق؛

گروه ۲ (EXP2): همکشتی اووسیت‌های نابالغ با تک‌لایه سلول‌های فیبروبلاستی جنینی‌موش درمحیط فوق؛

گروه ۳ (EXP3): همکشتی اووسیت‌های نابالغ با تک لایه سلول‌های کومولوسی تیمار شده با میتومایسین C در محیط فوق؛

گروه ۴ (EXP4): همکشتی اووسیت‌های نابالغ با تک لایه سلول‌های فیبروبلاستی جنینی موش تیمار شده با میتومایسین C در محیط فوق؛

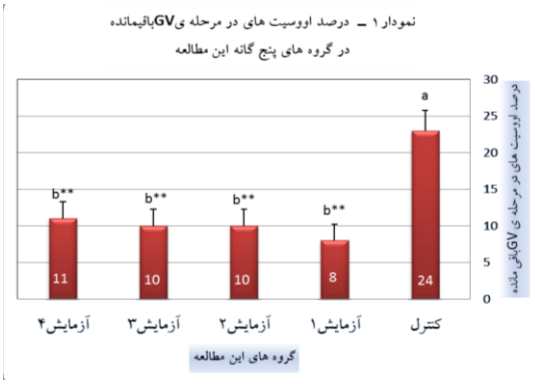
در گروه‌های آزمایشی ۳ و ۴ جهت غیر فعال‌سازی تک لایه‌های سلولی از غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر MMC استفاده شد. اووسیت‌های اختصاص یافته در گروه‌های فوق در محیط مذکور با ۱۰ درصد FBS به مدت ۲۲-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد Co2 در انکوباتور کشت داده شده و سپس با میکروسکوپ‌های‌معکوس‌جهت‌تعیین درصد اووسیت‌های مراحل GV، GVBD، M II و دژنره شده مورد بررسی دقیق قرارگرفتند. ریخت‌شناسی در هسته‌ها و نیز مشاهده اولین جسم قطبی که نمایانگر مرحله متافاز میوز ۲ (M II) است، به عنوان معیارهای تشخیصی در نظر گرفته شد.

تحلیل آماری

تمامی آزمایشات با چهار بار تکرار انجام شد. تحلیل واریانس برای تعیین معنی‌دار بودن تیمارهای آزمایشی و مقایسه میانگین‌ها با آزمون تعقیبی Tukey در سطح ۰/۰۵ با استفاده از نرم افزار SPSS .v16 انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Office Excel 2010 رسم گردید.

یافته ها

همان طور که در نتایج حاصل از آزمایشات مشاهده می شود (جدول شماره ۱)، میزان باقی ماندن اووسیت های مرحله ی GV در گروه کنترل با اختلاف معنی داری ($p<0.05$) بالاتر از گروه های همکشتی است (نمودار شماره ۱). با این حال بین گروه های تجربی تفاوت معنی داری از این نظر مشاهده نشد.



نمودار شماره ۱: درصد اوسیت های در مرحله GV باقی مانده در گروه های پنج گانه این مطالعه

در نمودار شماره ۱ تفاوت معنی دار بین گروه ها با حروف متفاوت و سطح معنی‌داری ۰/۰۱> p با** و ۰/۰۵> p با*مشخص شده اند.

از نظر رسیدن به مرحله شکست وزیکول زایا (GVBD) بین گروه‌های تجربی تغییر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (جدول شماره ۱). از نظر رسیدن به مرحله بلوغ (M II)، افزایشی معنی‌داری بین گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد، با این حال بین گروه های همکشتی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (نمودار شماره ۲).

بحث

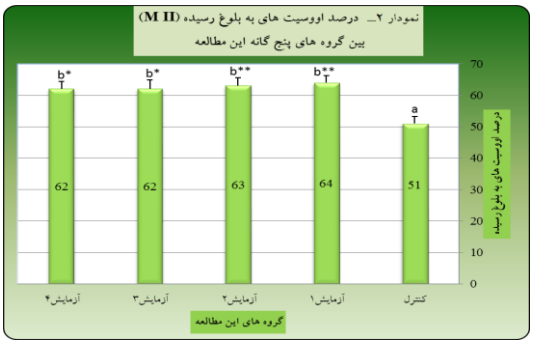
در بسیاری از مطالعات از تک لایه سلول‌های تغذیه کننده به عنوان بستری نگاهدارنده جهت رشد، تمایز و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

جدول شماره ۱: مقایسه نرخ بلوغ آزمایشگاهی اووسیت های نابالغ موش بین گروه های کنترل و همکشت با تک لایه سلول های کومولوسی و فیبروبلاست جنینی تیمار شده و نشده با میتومایسین C.

تیمارها	GVکل	GV	GVBD	M II	deg	MII+GVBD
کنترل	۱۰۰	۲۴±۲/۷۵	۱۹±۲/۷۰	۵۱±۲/۲۸	۶±۲/۱۰	۷۰±۳/۶۹
آزمایش۱	۱۰۰	۸±۲/۲۵	۲۴±۱/۸۳	۶۴±۲/۳۴	۴±۱/۸۳	۸۸±۲/۲۵
آزمایش۲	۱۰۰	۱۰±۲/۲۹	۲۲±۲/۴۷	۶۳±۲/۶۲	۵±۱/۹۸	۸۵±۲/۴۶
آزمایش۳	۱۰۰	۱۰±۲/۲۸	۲۴±۲/۳۴	۶۲±۲/۸۶	۴±۱/۸۳	۸۶±۲/۹۴
آزمایش۴	۱۰۰	۱۱±۱/۱۹	۲۱±۲/۲۸	۶۲±۲/۴۷	۶±۲/۱۰	۸۳±۳
مجموع	۵۰۰					

(نتایج به صورت میانگین درصد± خطای استاندارد (SE) در جدول درج شده اند)



نمودار شماره ۲: درصد اوسیت‌های به بلوغ رسیده (MII) بین گروه‌های پنج گانه این مطالعه

در نمودار شماره ۲، تفاوت معنی‌دار بین گروه ها با حروف متفاوت و سطح معنی‌داری ($p<0/01$) با** مشخص شده است. در مقایسه درصد اووسیت‌های دژنره نیز بین هیچ یک از گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. درصد اووسیت‌هایی سالمی که از توقف میوزی خارج شده‌اند، به صورت مجموع اووسیت‌های بالغ و میوز را از سرگرفته (GVBD+MII)، بین گروه‌های مورد مطالعه مقایسه گردید که بین گروه کنترل و گروه‌های تجربی اختلاف معنی‌داری به دست آمد (جدول شماره ۱).

بلوغ سلول‌های بنیادی استفاده شده است. Park و همکاران نشان دادند که سلول‌های فیبروبلاستی ممکن است فاکتورهایی را ترشح کنند که تکوین جنینی را بهبود ببخشند(۱۶). در مطالعات کریمپور و همکاران(۱۷) و حیدری و همکاران(۱۸) به نقش مثبت همکشتی با فیبروبلاست در نرخ رشد و بقا و تولید استروئید از فولیکول‌های پره آنترال در شرایط آزمایشگاهی اشاره شده است. سلول‌های فیبروبلاستی، سیتوکاین‌ها و فاکتورهای رشدی چون فاکتور مهارکننده لوکمی (LIF)، فاکتور استیل (SLF) و فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی (bFGF) را تولید و ترشح می‌کنند(۱۹،۱۲). bFGF در موش تأثیری معنی‌داری بر GVBD داشته و گیرنده‌های آن نیز در اووسیت‌ها در همه مراحل بلوغ حضور دارند(۱۲). در این مطالعه نیز مشاهده شد که استفاده از سیستم همکشتی با سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (گروه‌های آزمایشی ۲ و ۴) موجب خروج بیش‌تر اووسیت‌های نابالغ از توقف میوزی و از سرگیری میوز نسبت به گروه کنترل گردیده است.

در مطالعه Hatoya و همکاران بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های سگ، در کشت ۴۸ ساعته و ۷۲ ساعته در گروه‌های همکشتی شده با MEF، افزایش معنی‌داری در درصد اووسیت‌های M II مشاهده شد(۱۲). در مطالعه حاضر، مدت کشت ۲۴ ساعت بود و در همکشتی با MEF، افزایش قابل توجهی (۱۲ درصد) در نرخ بلوغ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

حضور سلول‌های گرانولوزا یا سلول‌های کومولوس اطراف تخمک، جزء حیاتی ویژه‌ای جهت رشد سیتوپلاسمی نرمال اووسیت است(۹). تأثیر مفید سلول‌های کومولوسی بر بلوغ و تکوین اولیه اووسیت در گونه‌های مختلف گزارش شده‌اند(۱۵). این سلول‌ها چندین فاکتور شناخته شده و ناشناخته‌ای که برای بلوغ نرمال هسته‌ای و سیتوپلاسمی اووسیت و رشد و نمو جنین پس از لقاح ضروری‌اند را تهیه و منتقل می‌کنند(۲۰). حضور سلول‌های سوماتیکی مشتق از کومولوس در طی IVM اووسیت‌ها، از طریق تغییر الگوی بیان ژن حاصل ازافزایش سطح گلوتاتیون درون سلولی، پتانسیل تکوینی جنین‌های خوک منتج از لقاح آزمایشگاهی را بهبود می‌دهد(۲۱). در دام‌ها، حذف سلول‌های کومولوسی قبل از انجام بلوغ آزمایشگاهی مضر گزارش شده است. بنابراین به نظر می‌رسد که سلول‌های کومولوسی به روش‌های متعدد از جمله حفظ اووسیت متوقف شده در میوز، کمک به از سرگیری میوز و پشتیبانی از بلوغ سیتوپلاسمی نقش مهمی در بلوغ اووسیت داشته باشند. این عملکردها می‌توانند به شبکه اتصالات منفذدار

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

جالب و قابلیت‌های متابولیکی خاص آن‌ها نسبت داده شوند(۲۲). در عوض طی رشد و تکمیل صلاحیت میوزی اووسیت‌ها (قبل از شروع میوز)، سلول‌های کومولوسی از طریق بالا بردن سطح cAMP درون سلولی، مسئول توقف هسته ای اووسیت‌ها در مرحله GV هستند(۲۴،۲۳).

در مطالعه محمودی و همکاران، وجود سلول های کومولوس متصل به اووسیت (COC) با افزایش میزان بلوغ آزمایشگاهی در وزیکول زایای موش همراه بود. به‌طوری که میزان بلوغ (M II) در اووسیت‌های همراه با سلول‌های کومولوسی (۷۸/۲) به طور معنی‌داری نسبت به اووسیت‌های برهنه (۶۵/۱) بیش‌تر بود(۱۵). در مطالعه حاضر نیز همکشتی با سلول‌های کومولوسی باعث افزایش معنی‌داری (حدود ۱۳ درصد) در میزان بلوغ اووسیت‌ها شد. چنین نتیجه‌ای قابل انتظار و مطابق با نتایج حاصله از کار محمودی و همکاران بود. نکته قابل توجه در نتایج این تحقیق، عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های همکشتی تیمار شده و تیمار نشده با MMC بود. در همه گروه‌های همکشتی اعم از تیمار شده و تیمار نشده با MMC، به سبب تأثیر احتمالی عوامل پاراکرینی مانند فاکتورهای رشد و فاکتورهای پیشبرنده میوزی مترشحه از سلول‌های فیبروبلاستی و کومولوسی، می‌توان افزایش قابل انتظاری را در میزان بلوغ اووسیت‌ها نسبت به گروه کنترل شاهد بود. در این رابطه مطالعات نشان داده اند که انواع مختلف سلولی، احتمالاً حساسیت متفاوتی نسبت به MMC دارند و لذا MMC می‌تواند رشد سلول‌های فیبروبلاستی موشی مورد استفاده به عنوان لایه تغذیه‌کننده را در یک کشت طولانی مدت مهار کند، بدون این که مزاحمتی برای تاثیر همکشتی آینده این سلول‌ها ایجاد کند(۱۱). هم‌چنین مشخص شده است که MMC در کشت‌های سلولی طولانی مدت باعث جلوگیری از چند لایه‌ای شدن سلول‌های همکشت می‌شود(۲۵). بر این اساس می‌توان علت عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های همکشتی تیمار شده و تیمار نشده با MMC را این گونه توجیه کرد که احتمالاً به علت کوتاه بودن زمان مورد نیاز (۲۴ ساعت) برای بلوغ اووسیت‌ها و در نتیجه عدم بروز کامل عملکرد MMC، تفاوت معنی‌داری بین گروه های تیمار شده و تیمار نشده با MMC ایجاد نشده است. بنابراین می‌توان این پیشنهاد را مطرح نمود که در صورتی که به همکشتی با سلول‌های سوماتیک همانند سلول فیبروبلاستی به عنوان لایه تغذیه‌کننده در مدت زمانی کم‌تر از ۴۸ ساعت نیاز باشد (به عنوان مثال در بلوغ آزمایشگاهی اووسیت و یا کشت جنین)، از غیر فعال کردن سلول‌های تغذیه‌کننده صرف نظر کرد. چرا که در حال حاضر در مطالعات مبتنی بر کشت و لایه‌های تغذیه کننده سلولی، استفاده از MMC به دلیل در دسترس و کم هزینه بودن، سهولت واحتمال خطرکم‌تر، کار با آن در مقایسه با استفاده از اشعه گاما، به صورت رایج در آمده است. این مطالعه برای اولین بار پیشنهاد حذف MMC را در پروتوکل‌های کوتاه مدت سیستم همکشتی مطرح می‌نماید.

سپاسگزاری

با سپاس از مسئولین انستیتوپاستور آمل (پژوهشکده شمال کشور) که در تمامی مراحل تحقیق از جمله در اختیار گذاشتن آزمایشگاه کشت سلول و کارشناسان آزمایشگاهی مربوطه و نیز تهیه و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی یاری گرمان بودند.

References

1. Lee HJ, Quaas AM, Wright DL, Toth TL, Teixeira JM. In vitro maturation (IVM) of murine and human germinal vesicle (GV)–stage oocytes by coculture with immortalized human fallopian tube epithelial cells. Fertil Steril 2011; 95(4): 1344-1348.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

2. Hardy K, Wright CS, Franks S, Winston RM.In vitro maturation of oocytes.Br Med Bull 2000; 56(3): 588-602.
3. Rodriguez CI, Galan A, Valbuena D, Simon C. Derivatin of clinical-grade human embryonic stem cells. Reprod Biomed Online 2006; 12(1): 112-118.
4. 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; 75(1): 193-199.
5. 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(2): 217-219.
6. 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(6): 925-932.
7. Hewitt DA, England GC. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell co-culture for canine oocyte maturation in vitro. Anim Reprod Sci 1999; 55(1): 63-75.
8. Janssenswillen C, Nagy ZP, Van Steirteghem A. Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II by Coculture with monolayer Vero cells. Hum Reprod 1995; 10(2): 375-376.
9. Jahromi BN, Mosallanezhad Z, Matloob N, Davari M, Ghobadifar MA. The potential role of granulosa cells in the maturation rate of immature human oocytes and embryo development: A co-culture study. Clin Exp Reprod Med 2015; 42(3): 111-117.
10. Li NY, Chen F, Dikkers FG, Thibeault SL. Dose-dependent effect of mitomycin C on human vocal fold Fibroblasts. Head Neck 2014; 36(3): 401–410.
11. Ponchio L, Duma L, Oliviero B, Gibelli N, Pedrazzoli P, Robustelli della Cuna G. Mitomycin C as an alternative to irradiation to inhibit the feeder layer growth in long-term culture assays. Cytotherapy 2000; 2(4): 281-286.
12. 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): 1083–1090.
13. Jozefczuk J, Drews K, Adjaye J. Preparation of Mouse Embryonic Fibroblast Cells Suitable for Culturing Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. J Vis Exp 2012; 21(64):3854
14. Hajializadeh N, Babaei H, Nematollahi-Mahani S. N, Azizollahi S. The development of mouse early embryos in vitro in fibroblasts and cumulus cells co-cultures supplemented with retinoic acid. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University 2008; 9(1): 22
15. Mahmoudi R, Subhani A, Pasbakhsh P, Abolhasani F, Amiri I, Salehnia M, et al. The Effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes. Iranian Journal of Reproductive Medicine 2005; 3(2): 74-78.
16. Park JS,Han YM, Lee CS, Kim SJ, Kim YH, et al. Improved development of DNA-injected bovine embryos co-cultured with mouse embryonic fibroblast cells. Anim Reprod Sci 2000; 59(1-2): 13-22.
17. Karimpour Malekshah A, Heidari M, Parivar K, Azami N. The Effects of Fibroblast Co-Culture and activin A on in vitro Growth of

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

Mouse Preantral Follicles. Iran Biomed J 2014; 18(1): 49-54.

18. Heidari M ,Karimpour Malekshah A , Parivar K, Khanbabaei R, Rafiei A. Effect of Fibroblast Co-culture on In Vitro Maturation and Fertilization of Mouse Preantral Follicles. Int J Fertil Steril 2011; 5(1): 1-8.
19. Moulavi F, Hosseini SM, Ashtiani SK, Shahverdi A, Nasr-Esfahani MH. Can Vero cell co-culture improve in vitro maturation of bovine oocytes? Reprod Biomed Online 2006; 13(3): 404-411.
20. Nikseresht M, Toori MA, Rasti T, Kashani IR, Mahmoudi R. The Nuclear Maturation and Embryo Development of Mice Germinal Vesicle Oocytes with and without Cumulus Cell after Vitrification. J Clin Diagn Res 2015; 9(1): AF01-4.
21. Yoon JD, Jeon Y, Cai L, Hwang SU, Kim E, Lee E, et al. Effects of coculture with cumulus-derived somatic cells on in vitro maturation of porcine oocytes. Theriogenology 2015; 83(2): 294–305.
22. Tanghe S, VanSoom A, Nauwynck H, Coryn M, Dekruif A. Minireview: Function of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. Mol Repord Dev 2002; 61(3): 414-424.
23. Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F.Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. Dev Biol 1994; 164(1): 1-9.
24. Shimada M, Terada T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells, a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. Mol Hum Reprod 2002; 8(7): 612-618.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]