

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

Mehran Davarifar<sup>1</sup>,  
Ramazan Khanbabaee<sup>2</sup>,  
Mahmoud Heidari<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc in Cellular and Developmental Biology, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran

<sup>3</sup> 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  $\alpha$ MEM supplemented by FSH, hCG, fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin, at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> 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).

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

مهران داوری فر<sup>۱</sup>رمضان خان بابایی<sup>۲</sup>محمود حیدری<sup>۳</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** میتومايسين C که به منظور جلوگیری از تکثیر سلول های همکشتی در کشت سلول به کار می رود، ممکن است با تأثیر مخرب خود بر این سلول ها نهایتاً اثرات نامطلوبی بر بلوغ اووسیت ها بگذارد. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر میتومايسين و همکشتی سلول های فیبروبلاست و کومولوس بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت های نابالغ موش انجام گرفت.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، اووسیت های مرحله وزیکول زایا به دست آمده از موش های سوری در محیط  $\alpha$ MEM تکمیل شده با FSH، hCG، سرم جنینی گاوی، پنی سیلین و استرپتومايسين در گروه های ذیل کشت شدند: گروه کنترل و گروه های آزمایشی ۱: همکشتی با سلول های کومولوسی، ۲: همکشتی با فیبروبلاستی جنینی موش، ۳- همکشتی با سلول های کومولوسی تیمار شده با میتومايسين C، ۴- همکشتی با فیبروبلاست جنینی موش تیمار شده با میتومايسين C. پس از ۲۴ ساعت، تعداد اووسیت های 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.

**یافته ها:** درصد اووسیت های مرحله وزیکول زایا ( $24 \pm 2/75$ ) و متافاز II ( $51 \pm 2/28$ ) در گروه کنترل با اختلاف معنی داری به ترتیب بیش تر از  $8 \pm 2/25$  و  $10 \pm 2/29$  و  $10 \pm 2/28$  و  $11 \pm 1/19$  و کم تر از  $64 \pm 2/34$  و  $63 \pm 2/62$  و  $62 \pm 2/86$  و  $62 \pm 2/47$  همه گروه های آزمایشی بود. با این حال، بین گروه های آزمایشی اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

**استنتاج:** همکشتی با سلول های فیبروبلاست و کومولوس باعث بهبود بلوغ آزمایشگاهی اووسیت های نابالغ گردید و با توجه به عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی می توان حذف بخش غیرفعال سازی سلول های مذکور با میتومايسين را از پروتکل های رایج پیشنهاد نمود.

**واژه های کلیدی:** میتومايسين C، بلوغ آزمایشگاهی، فیبروبلاست جنینی موش، سلول های کومولوسی، همکشتی

## مقدمه

به درستی صورت نمی گیرد و هم چنین بیماران با خطر بالای ناباروری در آینده مانند زنان جوانی که تحت شیمی درمانی مهاجم گونادوتوکسیک قرار دارند،

بلوغ آزمایشگاهی (In Vitro Maturation) اووسیت برای بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک (Poly Cystic Ovarian Syndrome) که تخمک گذاری

E-mail: mahmodh78@gmail.com

**مؤلف مسئول:** محمود حیدری - گرگان: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

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

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 (۴، ۵).

برخی از مطالعات به بررسی اثر همکشتی بر بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی اووسیت‌های اولیه که جهت برنامه‌های IVF به کار می‌روند، 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).

میتومايسين C (MMC=Mitomycin C) ترکیبی طبیعی استخراج شده از باکتری گرم منفی *Streptomyces caespitosus* است. MMC می‌تواند به سبب توانایی آلکیله کننده‌ی 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 فیروزی MMC در مجاری تنفسی از طریق مهار رشد فیروپلاست 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 طویل‌المدت انجام داد که در نتیجه رشد سلول‌های تک لایه‌ای تغذیه کننده چسبنده‌ای چون سلول‌های فیروپلاستی 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 فیروپلاستی جنینی بر اووسیت‌های نابالغ (GV=Germinal Vesicle) موش سوری، اثرات در معرض قرارگیری سلول‌های کومولوسی و فیروپلاستی با MMC در بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

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 Gonalf) از MERC آلمان، گنادوتروپین کوریونی انسان (hCG با نام تجاری pregnyl) از داروپخش ایران، آنزیم DNase1 از Thermo، Mitomycin (Kyowa) و

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 ۴۰ 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 ۷-۸ 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  $22 \pm 2$  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.

#### آماده‌سازی فیبروبلاست جنینی موش (MEF)

در تهیه فیبروبلاست جنینی موش، از روش Hatoya و همکاران (۱۲) و Jozefczuk و همکاران (۱۳) استفاده شد. تحریک تخمک‌گذاری موش‌های 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 هم‌نژاد 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  $\mu\text{g/mL}$  استرپتومایسین در رطوبت ۵ درصد  $\text{CO}_2$  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.

#### آماده‌سازی سلول کومولوس (CC)

آماده‌سازی تک لایه سلولی کومولوس، بر اساس روش حاجی‌علیزاده 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 سانتی‌متری استریل محتوی محیط کشت MEM  $\alpha$  تکمیل شده با ۱۰ درصد 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 ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۳ میلی‌لیتر MEM  $\alpha$  منتقل شدند. سوسپانسیون حاصله در ۷۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع فوقانی دور ریخته شد. رسوب سلول‌های کومولوس در MEM  $\alpha$  حاوی ۱۰ درصد FBS مجدداً کشت داده شد.

#### جمع‌آوری 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 MEM  $\alpha$  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.

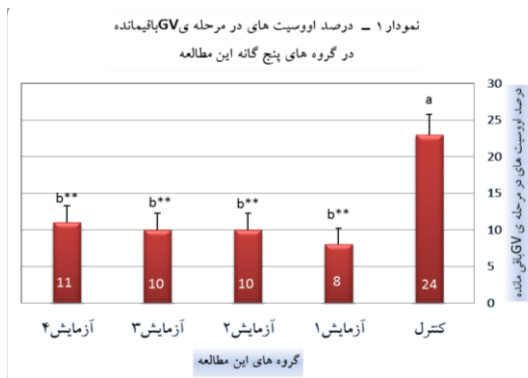
#### طراحی آزمایش

اووسیت‌های نابالغ جمع‌آوری شده به‌طور تصادفی

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 اوسیت های مرحله ی GV در گروه کنترل با اختلاف معنی داری ( $p < 0.05$ ) بالاتر از گروه های همگشتی 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 معنی داری  $p < 0.01$  با\*\* و  $p < 0.05$  با\* مشخص شده اند.

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

## بحث

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

در ۵ تیمار مختلف کشت شدند. در اولین گروه (کنترل؛ Con) اوسیت ها در محیط  $\alpha$ MEM تکمیل شده با گنادوتروپین های rFSH و LH، ۱۰ درصد FBS، آنتی بیوتیک ( $100 \text{ IU/mL}$  پنی سیلین و  $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$  استرپتومايسين) کشت شدند. سایر گروه های آزمایشی (EXP) به ترتیب زیر بودند:

گروه ۱ (EXP1): همگشتی اوسیت های نابالغ با تک لایه سلول های کومولوسی در محیط فوق؛  
گروه ۲ (EXP2): همگشتی اوسیت های نابالغ با تک لایه سلول های فیروبلستی جنینی موش در محیط فوق؛  
گروه ۳ (EXP3): همگشتی اوسیت های نابالغ با تک لایه سلول های کومولوسی تیمار شده با میتومايسين C در محیط فوق؛

گروه ۴ (EXP4): همگشتی اوسیت های نابالغ با تک لایه سلول های فیروبلستی جنینی موش تیمار شده با میتومايسين C در محیط فوق؛

در گروه های آزمایشی ۳ و ۴ جهت غیر فعال سازی تک لایه های سلولی از غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر MMC استفاده شد. اوسیت های اختصاص یافته در گروه های فوق در محیط مذکور با ۱۰ درصد FBS به مدت ۲۲-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد  $\text{CO}_2$  در انکوباتور کشت داده شده و سپس با میکروسکوپ های معکوس جهت تعیین درصد اوسیت های مراحل GV، GVBD، M II و دژنره شده مورد بررسی دقیق قرار گرفتند. ریخت شناسی در هسته ها 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 معنی دار بودن تیمارهای آزمایشی و مقایسه میانگین ها با آزمون تعقیبی Tukey در سطح ۰/۰۵ با استفاده از نرم افزار SPSS v16 انجام

بازی (bFGF) را تولید و ترشح می کنند (۱۲، ۱۹). bFGF در موش تأثیری معنی داری بر GVBD داشته و گیرنده های آن نیز در اووسیت ها در همه مراحل بلوغ حضور دارند (۱۲). در این مطالعه نیز مشاهده شد که استفاده از سیستم همکشتی با سلول های فیبروبلاست جنینی موش (گروه های آزمایشی ۲ و ۴) موجب خروج بیش تر اووسیت های نابالغ از توقف میوزی و از سرگیری میوز نسبت به گروه کنترل گردیده است.

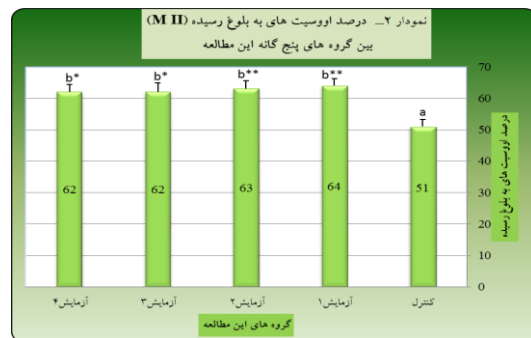
در مطالعه Hatoya و همکاران بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت های سگ، در کشت ۴۸ ساعته و ۷۲ ساعته در گروه های همکشتی شده با MEF، افزایش معنی داری در درصد اووسیت های M II مشاهده شد (۱۲). در مطالعه حاضر، مدت کشت ۲۴ ساعت بود و در همکشتی با MEF، افزایش قابل توجهی (۱۲ درصد) در نرخ بلوغ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

حضور سلول های گرانولوزا یا سلول های کومولوس اطراف تخمک، جزء حیاتی و ویژه ای جهت رشد سیتوپلاسمی نرمال اووسیت است (۹). تأثیر مفید سلول های کومولوسی بر بلوغ و تکوین اولیه اووسیت در گونه های مختلف گزارش شده اند (۱۵). این سلول ها چندین فاکتور شناخته شده و ناشناخته ای که برای بلوغ نرمال هسته ای و سیتوپلاسمی اووسیت و رشد و نمو جنین پس از لقاح ضروری اند را تهیه و منتقل می کنند (۲۰). حضور سلول های سوماتیکی مشتق از کومولوس در طی IVM اووسیت ها، از طریق تغییر الگوی بیان ژن حاصل از افزایش سطح گلوکوتایون درون سلولی، پتانسیل تکوینی جنین های خوک منتج از لقاح آزمایشگاهی را بهبود می دهد (۲۱). در دام ها، حذف سلول های کومولوسی قبل از انجام بلوغ آزمایشگاهی مضر گزارش شده است. بنابراین به نظر می رسد که سلول های کومولوسی به روش های 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 می توانند به شبکه اتصالات منفذدار

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 میتومايسين C.

تیمارها	GV کل	GV	GVBD	M II	deg	MI+GVBD
کنترل	۱۰۰	۲۴±۲/۷۵	۱۹±۲/۷۰	۵۱±۲/۲۸	۶±۲/۱۰	۷۰±۳/۶۹
آزمایش ۱	۱۰۰	۸±۲/۲۵	۲۴±۱/۸۳	۶۴±۲/۳۴	۴±۱/۸۳	۸۸±۲/۲۵
آزمایش ۲	۱۰۰	۱۰±۲/۲۹	۲۲±۲/۴۷	۶۳±۲/۶۲	۵±۱/۹۸	۸۵±۲/۴۶
آزمایش ۳	۱۰۰	۱۰±۲/۲۸	۲۴±۲/۳۴	۶۲±۲/۸۶	۴±۱/۸۳	۸۶±۲/۹۴
آزمایش ۴	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 اووسیت های به بلوغ رسیده (MII) بین گروه های پنج گانه این مطالعه در نمودار شماره ۲، تفاوت معنی دار بین گروه ها با حروف متفاوت و سطح معنی داری ( $p < 0.01$ ) با \*\* مشخص شده است. در مقایسه درصد اووسیت های دژنره نیز بین هیچ یک از گروه ها اختلاف معنی داری مشاهده نشد. درصد اووسیت هایی سالمی که از توقف میوزی خارج شده اند، به صورت مجموع اووسیت های بالغ و میوز را از سر گرفته (GVBD+MII)، بین گروه های مورد مطالعه مقایسه گردید که بین گروه کنترل و گروه های تجربی اختلاف معنی داری به دست آمد (جدول شماره ۱).

بلوغ سلول های بنیادی استفاده شده است. Park و همکاران نشان دادند که سلول های 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 فولیکول های پره آنترال در شرایط آزمایشگاهی اشاره شده است. سلول های فیبروبلاستی، سیتوکاین ها و فاکتورهای رشدی چون فاکتور مهارکننده لوکمی (LIF)، فاکتور استیل (SLF) و فاکتور رشد فیبروبلاستی

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 (۲۳، ۲۴).

در مطالعه محمودی و همکاران، وجود سلول‌های کومولوس متصل به اووسیت (COC) با افزایش میزان بلوغ آزمایشگاهی در وزیکول‌زایی موش همراه بود. به طوری 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 فیروبلستی و کومولوسی، می‌توان افزایش قابل‌انتظاری 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 فیروبلستی موشی مورد استفاده به عنوان لایه تغذیه‌کننده را در یک کشت طولانی مدت مهار کند، بدون این که مزاحمتی برای تأثیر 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 گروه‌های 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 فیروبلستی 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 تغذیه‌کننده سلولی، استفاده از MMC به دلیل در دسترس و کم هزینه بودن، سهولت و احتمال خطر کم‌تر، 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 پروتوکول‌های کوتاه مدت سیستم همکشتی مطرح می‌نماید.

## سپاسگزاری

با سپاس از مسئولین انستیتو پاستور 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 یاری‌گرمان 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.

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. Derivation 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. *Cytherapy* 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. Hajjalizadeh 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



- 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 Reprod 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.