Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 11:26 +0330 on Friday September 22nd 2017

پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
سال ۲۷، شماره ۴، صفحات ۳۱۳ تا ۳۱۸ (زمستان ۸۲)

Original Article

تاثیر هم کشتی (Coculture) سلول های گرانولوزا در تکوین جنینهای یک سلولی موش در محیط آزمایشگاه

دکتر عباسعلی کریم پور، دکتر امیر اسماعیل نژاد مقدم[1]

[1] دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

چکیده

سابقه و هدف: *بهبود شرایط محیط کشت جنین به دلیل اهمیتی که در تکنیک های پیشرفته درمان نازایی دارد ، مورد توجه وسیع محققان می باشد. فراهم آوردن شرایط لازم برای امکان عبور جنین ها از مرحله حساس ایست رشد می تواند به عنوان یکی از معیارهای مهم ارزیابی کیفیت محیط کشت مورد توجه قرار گیرد. یکی از تکنیک های مهم برای بهینه کردن شرایط محیط کشت استفاده از روش هم کشتی (Coculture) می باشد. در این تحقیق تاثیر هم کشتی سلول های گرانولوزا بر تکوین جنین های یک سلولی موش مورد بررسی قرار گرفت.*

مواد و روشها *: جنین های یک سلولی از موش های سوری به دنبال تحریک تخمدانی توسط HMG و hCG به دست آمدند. سلول های گرانولوزا با استفاده از هیالورونیداز ۰/۱ درصد از سلول های تخم جدا شده و با استفاده از روش پرکل به طور نسبی از سلول های خونی پاکسازی‌شدند. جنین ها در محیط هامزF10 (گروه شاهد) و محیط هامز F10 با هم کشتی سلول های گرانولوزا (گروه مورد) به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند.*

یافته‌ها: *۲۲/۴٪ از جنین های کشت داده شده در محیط هم کشتی مرحله ایست رشدی را پشت سرگذاشتند در حالی که این نسبت به طور معنی دار در گروه شاهد کمتر بوده است (۱۲/۸٪ ، $p<۰/۰۵$). همچنین در گروه هم کشتی نسبت بالاتری از جنین هایی که مرحله ایست رشدی را پشت سر گذاشته بودند با ادامه رشد به مرحله بلاستوسیست رسیدند (۱۱/۲٪ در مقابل ۲/۴٪، $p<۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: *بر اساس یافته های این تحقیق می توان گفت که سیستم هم کشتی سلول های گرانولوزا شرایط مناسب تری را درمقایسه با محیط کشت هامز F10 برای تکوین جنین ها فراهم می آورد.*

واژگان کلیدی: *هم کشتی، سلول گرانولوزا، محیط آزمایشگاهی.*

مقدمه

دهها سال از آغاز تکنیک کشت جنین در محیط آزمایشگاه (In vitro) می گذارد. در سال های اول اهمیت آن در انجام برخی تحقیقات و در نهایت ابداع و اصلاح روش های تلقیح مصنوعی برای حیوانات اهلی بود. از سال ۱۹۷۸ با معرفی روش تلقیح مصنوعی (IVF) برای درمان مشکل نازایی زوج های نابارور (۱) اهمیت لقاح تخمک و نیز رشد و نمو جنین اولیه در محیط آزمایشگاه دو چندان شد. علی رغم پیشرفت هایی که در سال های اخیر در تکنیک های مختلف درمان نازایی (ART) روی داد هنوز

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 11:26 +0330 on Friday September 22nd 2017

میزان لانه گزینی و حاملگی متعاقب انتقال جنین های رشد یافته در محیط آزمایشگاه به رحم پائین و سقط خودبخودی و شکست حاملگی های ایجاد شده از این جنین ها بالا می باشد (۲). آنومالی های کروموزومی، کیفیت پائین جنین ها، وضعیت نامناسب اندومتر و عدم همخوانی و همزمانی (Synchronization) مرحله نمو جنین با مرحله فیزیولوژیک اندومتر، به عنوان مهم ترین عوامل احتمالی پائین بودن میزان موفقیت باروری در روش های ART مطرح هستند (۳).

در سالهای اخیر تکنیک های مختلفی برای حل مشکل کیفیت پائین جنین های رشد یافته در محیط آزمایشگاه و فراهم آوردن امکان نگهداری بیشتر آنها با پشت سرگذاشتن مشکل ایست رشدی[1] و ادامه دادن رشد جنین ها تا مراحل بالاتر و تاخیر در انتقال به رحم و در نتیجه ایجاد تطابق زمانی بیشتر بین مرحله نمو جنین و نمو اندومتر مورد توجه قرار گرفت (۴).

جنین اغلب پستانداران به هنگام کشت در آزمایشگاه دارای یک نقطه بحرانی در مراحل اولیه رشد خود می باشد که در این مرحله حساسیت جنین بسیار بالا بوده و غالباً شرایط غیربهینه محیط کشت باعث توقف رشد آن در این مرحله می شود. این پدیده ایست رشدی خوانده می شود (۵). یکی از تکنیک های مهم که به منظور بهینه کردن هر چه بیشتر شرایط محیط کشت برای به دست آوردن جنین های بهتر و با کیفیت تر مورد تحقیق و توجه قرار گرفت استفاده از روش هم کشتی[2] می باشد.

در این روش ابتدا یک نوع سلول سوماتیک پس از آماده سازی، کشت داده شده و به دنبال فراهم آمدن تک لایه[3] آن در ظرف کشت، جنین به روی تک لایه انتقال می یابد. از سلول های مختلفی برای هم کشتی با جنین استفاده شد. سلول های اویداکت، اندومتر، Vero و سلولهای گرانولوزا از جمله آنها است (۳،۶،۷).

علی رغم تاثیرات مفیدی که اغلب محققان برای تکنیک هم کشتی بر روی تکوین جنین های اولیه پستانداران مختلف گزارش کردند (۳،۶،۷،۸،۹)، استفاده از این تکنیک هنوز با مشکلاتی روبرو می باشد؛ از جمله مسئله احتمال انتقال پاتوژنها از این سلولها به جنین مطرح می باشد. استفاده از سلولهای گرانولوزا به دلیل آن که به راحتی می توان آن را از همان فرد دهنده تخمک تهیه کرد و نیز آسان بودن تکنیک آماده سازی آن از مزیت بالایی برخوردار است (۳).

در مطالعات زیادی تاثیر هم کشتی سلول های گرانولوزا بر تکوین جنین های اولیه پستانداران مختلف مورد بررسی قرار گرفت اما نتایج گزارش شده هنوز اختلافات قابل توجهی را نشان می دهد. مثلا در حالی که برخی گزارشها تاثیر هم کشتی سلول های گرانولوزا در پشت سر گذاشتن ایست رشدی را مثبت ارزیابی کرده اند (۹،۱۰)، گزارش های دیگری چنین اثری را مورد تایید قرار نمی دهند (۱۱،۱۲). همچنین تا آنجا که ما می دانیم تمامی محققانی که به بررسی اثرات هم کشتی سلولهای گرانولوزا بر تکوین جنین های اولیه پرداخته اند، ابتدا تک لایه سلول گرانولوزا را تهیه نمودند و سپس جنین ها را به آن انتقال دادند. در این تحقیق ضمن آن که بررسی تاثیر هم کشتی سلولهای گرانولوزا در پشت سرگذاشتن مرحله ایست رشدی و تکوین جنین ها مورد توجه بود کشت جنین ها و سلولهای گرانولوزا به طور هم زمان انجام پذیرفت.

مواد و روشها

در این تحقیق از جنینهای یک سلول موش سوری (N-Mari) استفاده شد. سن حیوانات ۶ تا ۱۰ هفته و شرایط نگهداری آنها در ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی گراد بوده است.

برای گرفتن جنین به حیوانات ماده ۷ واحد هورمون HMG و ۴۸ ساعت بعد ۷ واحد هورمون hCG به طریق داخل صفاتی تزریق می شد. بلافاصله پس از تزریق hCG حیوان ماده با موش نر از همان گونه در یک قفس جفت گذاری می شدند و صبح روز بعد (۲۰ تا ۲۴ ساعت پس از تزریق hCG) با معیار پلاک واژنی حیواناتی را که جفت گیری انجام دادند جدا و پس از کشتن به طریق

[1] Growth block
[2] Coculture
[3] Monolayer

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 11:26 +0330 on Friday September 22nd 2017

قطع نخاع گردنی لوله رحمی آنها خارج و به محیط کشت انتقال داده می شد. توده کومولوس با پاره کردن ناحیه آمپولای لوله رحم از آن خارج و پس از شستشو به قطره ای تمیز از محیط کشت هامز F10 انتقال داده می شد؛ سپس آن را به مدت ۲ دقیقه در محیط کشت محتوی هیالورونیداز ۰/۱ درصد نگاه داشته و در همین حال با پیپت کردن مکرر جنین را از سلول های کومولوس جدا می نمائیم. جنین ها پس از چند بار شستشو در قطره ای درشت از محیط کشت جمع آوری نموده تا برای کشت آماده شوند. آماده کردن سلول های گرانولوزا با استفاده از روش پرکل انجام پذیرفت (۳). برای این کار سلول های گرانولوزای را به همراه قطره محیط کشت جمع آوری و پس از انتقال به یک لوله سانتریفوژ با اضافه کردن محیط کشت (به منظور شستشو) حجم آن را به 5ml رسانده و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت g ×۱۰۰۰ سانتریفوژ می نمائیم. 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 می آوریم. به منظور جدا کردن سلولهای خونی از سلولهای گرانولوزا سوسپانسیون مزبور را به آرامی به روی پرکل ۴۰ درصد که با حجم ۳ml در داخل یک لوله سانتریفوژ آماده نمودیم انتقال داده و با سرعت g ×۳۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ می نمائیم. سلولهای خونی به طور عمده به ته لوله رفته و سلول های گرانولوزا در فاصله بین محیط کشت و پرکل تجمع پیدا می کنند. محیط ناحیه بینابینی (به حجم ۲ml-۱) را با استفاده از پیپت جدا کرده به لوله دیگر انتقال و به منظور جدا کردن پرکل مقدار ۲ml محیط کشت به آن اضافه و با سرعت g ×۱۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می نمائیم. پس از دور ریختن مایع رویی، پلاک را آزاد نموده و با شمارش تعداد سلول ها توسط لام نئوبار، با اضافه کردن محیط کشت و ایجاد حجم مناسب تعداد سلول ها را به $۱×۱۰^{۶}$ در هر میلی متر مکعب رسانده و سپس با استفاده از آن قطرانی به حجم تقریبی ۲۰ میکرون در ظرف کشت نهاده و رویش را با روغن معدنی می پوشانیم.

جنین های گرد آوری شده در قطره ای واحد پس از آماده کردن محیط های لازم برای کشت به تعداد تقریباً مساوی به قطره های مختلف انتقال داده شده و سپس ظروف کشت به انکوباتور منتقل می شدند. محیط های مورد تجربه عبارت بودند از:

محیط هامز F10 (گروه شاهد) و محیط هامز F10 با هم کشتی سلول های گرانولوزا (گروه مورد).

بررسی تکوین جنین ها هر ۲۴ ساعت یکبار و برای مدت ۵ روز (۱۲۰ ساعت) انجام پذیرفته و مراحل مختلف نمو جنین ثبت می شد.

بررسی آماری یافته ها در نرم افزار SPSS انجام پذیرفت. برای مقایسه آماری اختلاف شاخص ها در دو گروه از آزمون t استفاده شد.

یافته‌ها

تعداد ۳۲۸ جنین یک سلولی در محیط هامز F10 (H) و ۳۹۷ جنین یک سلولی در محیط هامز F10 + سلولهای گرانولوزا (HG) به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند. ۲۲/۴٪ از جنین های کشت داده شده در محیط HG با پشت سرگذاشتن مرحله توقف رشدی به مرحله ۴ سلولی یا بالاتر رسیدند. این نسبت در محیط H به طور معنی داری کمتر بود (p <۰/۰۵، جدول شماره ۱). همچنین ۱۱/۲٪ از جنین هایی که در محیط HG مرحله ۲ سلولی را پشت سر گذاشته بودند موفق به ادامه رشد و رسیدن به مرحله بلاستوسیست شدند در حالی که فقط ۲/۴٪ از جنین های مشابه در محیط H توانستند به این مرحله برسند (p<۰/۰۵).

جدول ۱- نتایج حاصل از کشت جنین های یک سلولی موش در محیط هامز F10 (H) و محیط هم کشت سلول های گرانولوزا در هامز(HG)

محیط کشت	تعداد جنین کشت داده شده	دفعات تکرار	جنین هایی که مرحله دو سلولی را پشت سر گذاشتند	مرحله بلاستوسیست
H	۳۲۸	۱۱	۴۲(۱۲/۸٪)	۱(۲/۴٪)
HG	۳۹۸	۱۱	۸۹(۲۲/۴٪)	۱۰(۱۱/۲٪)

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 11:26 +0330 on Friday September 22nd 2017

بحث

علی رغم پیشرفت های بسیار، هنوز تکوین جنین های اولیه اغلب پستانداران در محیط آزمایشگاه با مشکلات مهمی همراه هست. نسبت بالایی از این جنین ها نمی توانند به رشد خود تا مرحله بلاستوسیست ادامه دهند. مهم تر آنکه جنین اغلب پستانداران دارای یک مرحله بحرانی در رشد و نمو خود در مراحل اولیه می باشد که اغلب عبور از آن در محیط آزمایشگاه با دشواری بسیاری همراه است و اغلب جنین ها در این مرحله دچار ایست رشدی می شوند. پدیده ایست رشدی برای جنین های موش و هامستر در مرحله ۲ سلولی و برای جنین های انسان در مرحله ۴ تا ۸ سلولی روی می دهد (۵). در این مرحله حساس، فعالیت ژن جنین شروع می شود تا پیش از این مرحله، جنین از محصولات آلی باقیمانده از اوویست استفاده می کند اما از این مرحله شروع به ساخت و سنتز آنها از روی کدهای ژنی خود می نماید (۵،۶). ایجاد شرایطی در محیط کشت که جنین ها بتوانند مرحله حساس ایست رشدی را پشت سر بگذارند معیار مهمی برای سنجش و ارزیابی کیفیت محیط کشت جنین محسوب می شود (۶). در ده سال گذشته مطالعات زیادی به منظور بهبود شرایط محیط کشت جنین صورت پذیرفته است. استفاده از سیستم هم کشتی سلول های بدنی، یکی از تکنیک های مهمی است که برای ایجاد شرایط بهتر محیطی برای تکوین جنین اولیه پستانداران مورد توجه قرار گرفته است (۵،۷).

یافته های این تحقیق نشان داد که سیستم هم کشتی سلولهای گرانولوزا در مقایسه با محیط کشت هامز F10 شرایط مناسب تری را فراهم آورده و نسبت بالاتری از جنین های کشت یافته در آن توانستند مرحله حساس توقف رشدی دو سلولی را پشت سر گذاشته و به مرحله بلاستوسیست برسند.

این یافته ها موید گزارشات متعدد محققان دیگری است که پیش از این به بررسی اثر سیستم هم کشتی سلولهای گرانولوزا در تکوین جنین های اولیه پستانداران مختلف از جمله موش (۱۳)، رت (۸) و Bovine (۹،۱۰) پرداختند. همچنین Dirnfeld و همکاران از سیستم هم کشتی سلول های گرانولوزا برای کشت جنین های انسان در یک کلینیک IVF استفاده نمودند ولی این کار را برای یک الی دو روز ادامه داده و جنین ها را در مرحله ۴ الی ۸ سلولی به رحم انتقال دادند.

با این وجود گزارش شده است میزان حاملگی بیشتر از گروهی بود که در آن جنین ها از کشت در محیط HTF به دست آمده بودند و نتیجه گرفتند که سیستم هم کشتی بر روی کیفیت جنین ها اثر مطلوب و مثبتی بجای گذشته و صلاحیت لانه گزینی آنها را افزایش می دهد(۳). در گزارش دیگری نیز تاثیر مثبت سیستم هم کشتی سلولهای گرانولوزا در تولید بلاستوسیست از جنین های یک سلولی انسان مورد تائید قرار گرفت (۱۴). Roudebush و همکاران و نیز کاظمی و همکاران که همانند این تحقیق تکوین جنین های یک سلولی موش در سیستم هم کشتی سلول های گرانولوزا را مورد بررسی قرار دادند بر خلاف یافته های این تحقیق گزارش کردند که سیستم هم کشتی سلول های گرانولوزا قادر نیست بیش از محیط هامز F10 این جنین ها را از مرحله بحرانی ایست رشد در مرحله دو سلولی عبور دهد (۱۱،۱۲). تنها تفاوت مهمی که در مطالعه ما در مقایسه با مطالعه محققان مزبور وجود داشته و شاید بتواند توجیه کننده این تفاوت باشد آن است که در این مطالعه،کشت جنین ها همزمان با کشت سلول های گرانولوزا انجام پذیرفت در حالی که آن محققان ابتدا سلول های گرانولوزا را کشت داده و ۲۴ الی ۷۲ ساعت بعد جنینهای یک سلولی موش را به آن انتقال دادند. در هر صورت بنظر می رسد برای اثبات تاثیر سیستم هم کشتی سلولهای گرانولوزا در پشت سرگذاشتن مرحله توقف رشدی مطالعات بیشتری لازم باشد .

علی رغم اختلاف نظری که درخصوص توانایی سیستم هم کشتی سلول های گرانولوزا در عبور جنین ها از مرحله حساس توقف رشدی وجود دارد تاثیر کلی این سیستم در افزایش کیفیت جنین ها و نسبت تولید بلاستوسیست که مورد تائید این تحقیق نیز قرار گرفت اتفاق نظر بیشتری وجود دارد. در توجیه مکانیسم تاثیر سیستم های هم کشتی تئوری های مختلفی قابل طرح است.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 11:26 +0330 on Friday September 22nd 2017

سلول های کشت کمکی ممکن است باعث خنثی شدن و یا حذف فاکتورها و عوامل نامطلوب مثل Hypoxanthine که به طور معمول در بیشتر محیط های کشت یافت می شود، گردند (۷).

این سلول ها همچنین ممکن است با اثر آنتی اکسیدانت و خنثی کردن رادیکال های آزاد با اثرات نامطلوب آنها بر روی جنین در محیط کشت مقابله نمایند(۷). همچنین گزارش های زیادی نشانگر تولید فاکتورهای رشد مختلف مثل فاکتور رشد شبه انسولین (ILGF-I) ، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) وTGF-ß در محیط کشت سلولهای گرانولوزا می باشد (۸،۹). احتمال دارد این فاکتورها با اثرات امبریوتروفیک روی جنین های اولیه تکوین آنها را بهبود بخشند.

سلول های گرانولوزا قادر به ترشح پروژسترون و استروژن در محیط کشت می باشند (۱۵). شاید استروئیدهای مزبور دارای اثرات مثبتی بر تکوین جنین باشند. همچنین گزارش شده است که سلول های گرانولوزا در محیط کشت اقدام به ترشح فاکتوری بنام Survivin می کنند که این ماده دارای اثر مهار کنندگی روی آپوپتوز می باشد (۱۶). کاهش بلاستومرهای آپوپتوتیک در جنین اولیه می تواند باعث بالا رفتن کیفیت و صلاحیت تکوینی آنها گردد.

افزایش متابولیسم گلوکز در جنین در حضور سلول های کشت کمکی گرانولوزا توجیه دیگری است که می توان برای تاثیر مثبت سیستم هم کشتی این سلول ها ذکر کرد (۳). بالاخره در یکی از جدیدترین تئوری ها برای توجیه اثرات سیستم هم کشتی، Joo و همکارانش با طراحی یک تحقیق گزارش کردند که تماس مستقیم جنین با سلول های هم کشتی باعث حذف و پاکسازی عوامل نامطلوب محیط میکرو اطراف جنین ها و بهبود شرایط برای تکوین آنها می گردند (۱۳). شاید مجموعه این عوامل در بهبود شرایط محیط کشت در سیستم هم کشتی سلول های گرانولوزا برای تکوین جنین های اولیه موثر باشند.

در پایان باید خاطر نشان ساخت سیستم هم کشتی سلول های گرانولوزا شرایط مناسب تری را در مقایسه با محیط کشت هامز **F10** برای تکوین جنین ها فراهم می آورد.

REFERENCES

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the re-implantation of a human embryo. Lancet 1978; 2: 366.

2. Simon C, Landeras J, Zuzuarregui JL, Martin JC, Remohi J. Early pregnancy losses in in vitro fertilization and oocyte donation. Fertil Steril 1999; 72(6): 1061-65.

3. Dirnfeld M, Koifman M, Goldman S, Calderon I, Gonen Y, Abramovici H. A simplified coculture system with luteinized granulose cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. Fertil Steril 1997; 67(1): 120-3.

4. Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. Fertil Steril 2001; 75(6): 1126-30.

5. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, et al. Biological factors in culture media affecting in vitro fertilization, preimplantation embryo development and implantation. Ann N Y Acad Sci 2000; 900: 325-35.

6. Minami N. Early embryonic development under oviductal influence in vitro. Animal Reproduction Science 1996; 42: 361-9.

7. Bongso A, Fong CY, Ratnam XY. Coculture: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Fertil Steril 1991; 56: 179-91.

8. Kim IC, Schomberg DW. The production of transforming growth factor-beta activity by rat granulose cell culture. Endocrinology 1989; 124(3): 1345-51.

9. Kobayashi K, Takagi Y, Satoh T, Hoshi H, Oikawa T. Development of early embryos to the blastocyst stage in serum-free conditioned medium from bovine granulose cells. In Vitro Cell Dev Biol 1992; 28(4): 255-59.

10. Donnay Van Langendonckt A, Auquier P, Grisart B, et al. Effect of coculture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. Theriogenology 1997; 47: 1549-61.

11. Roudebush WE. Human follicular fluid and mouse cumulus cells act synergistically to enhance preimplantation embryo development. J Assist Reprod Genet 1995; 12(10): 733-7.

۱۲. کاظمی س، حسینی ا، رضازاده ولوجردی م. بررسی قدرت مایع فولیکولر انسان و coculture سلولهای گرانولوزا در لقاح و رشد جنینهای موش سوری. پایان نامه، دانشگاه تربیت مدرس، اسفند ۱۳۷۶.

13. Bo Sun J, Mi Kyung K, Yong Jim N, et al. The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deletrious components. Fertil Steril 2001; 75(1): 193-9.

14. Carell DT, Jones KP, Hatasaka HH, Udoff LC, Peterson CM. Autologous cumulus cell coculture improves embryo quality and blastocyst growth of ICSI-derived human embryos. Fertil Steril 2000; 73(4): 515-6.

15. Armstrong DG, Gong G, Garder JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. Steroigenesis in bovine granulose cells: the effect of short-term changes in dietary intake. Reproduction 2002; 123(3): 371-78.

16. Johnson AL, Langer YS, Bridgham OT. Survivin as a cell cycle-related and autiupoptic protein in granulose cells. Endocrinology 2002; 143(9): 3405-13.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 11:26 +0330 on Friday September 22nd 2017