پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی
سال ۲۱، شماره ۴، صفحات ۸۰-۹۰ (دی-اسفند ۱۳۷۶)

تاثیر یاخته‌های Vero بر رشد جنین موش در محیط کشت

سیدنورالدین نعمت‌اللهی*، دکتر مجتبی رضازاده**، دکتر احمد حسینی*** و دکتر حسین مزدارانی**

* دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

** دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

*** دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

خلاصه

در مطالعه حاضر تاثیر کشت همزمان یاخته‌های تک لایه‌ای Vero در جلوگیری از توقف رشد و بهبود کیفیت رشد جنین موش در مراحل پیش لانه‌گزینی طی دو آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول جنین‌های تک یاخته‌ای موش در محیط کشت RPMI-1640 حاوی سلولهای Vero قرار داده شدند و پس از چهار روز نگهداری در محیط آزمایشگاه نتایج به دست آمده - در مقایسه با گروه شاهد - نشان داد که جنین‌های گروه Vero رشد نسبتا" بهتری داشتند (۸۷ درصد برابر ۸۰ درصد؛ P<۰/۰۵) ولی تعداد جنین‌هایی که در دو گروه شاهد و آزمون به مرحله بلاستوسیست رسیدند تقریبا" مساوی بود (۷ درصد برابر ۸ درصد؛ P>۰/۰۵).

در آزمایش دوم جنین‌ها در مرحله دو سلولی از رحم موش خارج و در دو گروه Vero و شاهد قرار داده شدند. ۷۲ ساعت پس از قرار گرفتن در محیط کشت، ۸۰ درصد جنین‌های گروه Vero به مرحله بلاستوسیست و مورولا رسیدند که در مقایسه با گروه شاهد (۷۵ درصد) تفاوت آماری معنی‌داری را نشانداد (P<۰/۰۵). به علاوه، ۴۸ درصد جنین‌های گروه Vero توانستند از زوناپلوسیدا خارج شوند در حالی که در گروه شاهد تنها ۲۷ درصد جنین‌ها به این مرحله رسیدند (P<۰/۰۰۱).

نتایج حاصل نشان می‌دهد که هر چند سلول Vero قادر نیست برای عبور از مرحله توقف رشد جنین تک سلولی موش را به خوبی کمک کند ولی در صورتی که جنین، این مرحله را درون رحم مادر گذرانیده باشد این سلول با فراهم آوردن شرایط مناسب، رشد جنین‌ها را افزایش داده، به علاوه کیفیت جنین‌های به دست آمده را بهبود می‌بخشد.

مقدمه

از سال ۱۹۵۹ که چنگ (Chang) توانست تخمک خرگوش را در محیط آزمایشگاه بارور کند (۵) تاکنون پژوهشهای بسیاری پیرامون لقاح و رشد جنین در آزمایشگاه صورت گرفته است. جنین بسیاری از پستانداران حتی در شرایط مناسب آزمایشگاه در مرحله‌ای از رشد متوقف می‌شود که به آن پدیده توقف رشد (Developmental block) گفته می‌شود. این مسئله ممکن است در پستانداران مختلف و در مراحل گوناگون روی دهد: مثلا" جنین انسان معمولا" در مرحله ۴ تا ۸ سلولی؛ جنین موش در مرحله ۲ سلولی؛ و جنین هامستر در مرحله ۲ تا ۸ سلولی دچار توقف رشد می‌شود (۱۹).

برخی از پژوهشگران توقف رشد را به دلیل دخالت یک ژن مادری می‌دانند (۱۰ و ۲۴) و بر این باورند که عوامل محیط کشت باعث فعال شدن این ژن می‌شود. از سوی دیگر عده‌ای از محققان با تغییر در ترکیبات محیط کشت سعی کرده‌اند مانع از توقف رشد جنین شوند. مطالعات Abramczuk و همکاران (۱) در سال ۱۹۷۷ نشان داد که افزودن اتیلن‌دی‌آمیدتترااستیک اسید (EDTA) به محیط کشت می‌تواند فلزات سنگین را از دسترس جنین خارج کرده، مانع از توقف رشد جنین تک یاخته‌ای موش شود. بعدها نصر اصفهانی و همکاران (۲۵ و ۲۶) ضمن تائید نظریه Abramczuk بیان داشتند که فلزات سنگین موجود در محیط کشت با افزایش رادیکالهای آزاد (HO ∘, H∘) ناشی از سوپراکسیدها به عنوان یک عامل سمی از رشد جنین جلوگیری می‌کنند. افزایش گلوکز نیز به رغم اینکه یکی از منابع تامین انرژی سلولی است می‌تواند مانع از رشد جنین شود (۶ و ۳۷). گلوکز با جلوگیری از فعالیت آنزیم هیپوگزانتین فسفوریل ترانسفراز (HPRT) باعث افزایش رادیکالهای آزاد جنین شده، رشد آنها را متوقف می‌کند (۱۵). اسیدهای چرب نیز به عنوان یک عامل متوقف کننده رشد مطرح هستند (۲۷).

همزمان با تحقیقات بالا عده‌ای از پژوهندگان بر آن شدند که بدون تغییر عوامل محیط کشت شرایطی را فراهم سازند که تا حدامکان مطابق با شرایط In vivo باشد: بدین منظور کشت همزمان جنین و سلولهای پوششی سیستم تناسلی را مطرح کردند و توانستند نتایج مفیدی به دست آورند (۴، ۸، ۹، ۱۲، ۱۸، ۳۰، ۳۴ و ۳۵). در همین راستا مطالعات دیگر پژوهندگان (۲، ۱۴، ۲۱، ۳۲، ۳۹ و ۴۱) نشان می‌دهد که علاوه بر سلولهای پوششی دستگاه تناسلی سلولهای مختلف نیز می‌توانند به رشد جنین کمک کرده، انتخاب آنها وابسته به گونه خاصی نمی‌باشد.

از آنجا که تهیه کشت اولیه از یاخته‌های پوششی دستگاه تناسلی وقت‌گیر و به دست آوردن کشت‌های بعدی از آنها محدود است (۳۰) و امکان آلوده بودن چنین سلولهایی همیشه متصور است، محققان به فکر جایگزینی این سلولها با رده‌های سلولی شناخته شده آزمایشگاهی افتادند؛ چرا که سلولهای شناخته شده آزمایشگاهی به راحتی رشد کرده، فاقد عوامل عفونی هستند. از جمله این یاخته‌ها می‌توان سلول Vero را نام برد که از کلیه نوعی میمون رزوس مشتق شده است. تاکنون پیرامون کشت همزمان جنین برخی از گونه‌های پستانداران با این سلول تحقیقات چندی به عمل آمده است (۱۱، ۲۱، ۳۶ و ۳۹) و نتایج حاصله گویای تاثیر مثبت سلول Vero در سیستم کشت همزمان است. هرچند که ساکاس (Sakkas) و همکاران (۳۳) در سال ۱۹۹۴ با مطالعه پیرامون کشت همزمان جنین انسان و سلول Vero نقش این یاخته را در افزایش میزان حاملگی در سیکل‌های IVF مورد تردید قرار دادند. با توجه به گزارشهای گوناگون در مورد اثر سلول Vero بر جنین پستانداران در

مطالعه حاضر سعی شده است توانایی این سلول در جلوگیری از توقف رشد و بهبود کیفیت جنین موش - که معمولا" در مرحله دو یاخته‌ای متوقف می‌شود- مورد ارزیابی قرار گیرد.

روشها و مواد

الف) جمع‌آوری جنین

حیواناتی که در این پروژه به کار گرفته شدند موشهای سفید نژاد سوئیسی (Swiss Albino mice) بودند که در زمان آزمایش حدود ۵ الی ۸ هفته سن داشتند و از انستیتو پاستور ایران خریداری و یا در محل موسسه رویان تکثیر شده بودند. شرایط حیوانخانه با دمای ۲۲ الی ۲۴ درجه سانتیگراد، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و آب و غذای کافی در دسترس حیوان بود. برای تحریک تخمک‌گذاری از ۷/۵ واحد PMSG (Sigma) و ۷/۵ واحد hCG (Profasi Serono) به ازای هر موش استفاده شد که به روش درون صفاقی ip، با فاصله ۴۸ ساعت از یکدیگر تزریق شد. موشهای ماده پس از تزریق hCG به طور انفرادی درون قفس موشهای نر قرار داده شدند و صبح روز بعد از نظر وجود پلاك واژنی مورد بررسی قرار گرفتند. موشهای دارای پلاك واژن، حامله تلقی و در قفس جداگانه نگهداری شدند. برای به دست آوردن جنین تک سلولی ۲۶ ساعت و جنین ۲ سلولی ۴۴ تا ۴۸ ساعت بعد از تزریق hCG موشها با جابجایی گردن (Cervical dislocation) کشته شدند. در شرایط استریل شکم موشها باز و با پنس و قیچی ظریف لوله و بخش دیستال رحم جدا شد و بلافاصله به قطره محیط کشت Earl's Balanced Salt Solution- که ۱۰ درصد سرم آلبومینار انسانی Albuminar 5 (HS) به آن افزوده شده، به مدت ۲۴ ساعت زیر روغن پارافین در حرارت ۳۷ درجه‌سانتیگراد و ۵ درصد گاز Co_2 متعادل (Equilibrate) شده بود- منتقل و زیر یک میکروسکوپ استریو (Wild heerbruch, Germany) بررسی شدند. سپس جنین‌های موجود در هر یک از لوله‌های رحم با روش Flashing (پاشیدن مایع به درون لوله رحم) توسط سر سوزن 30G و سرنگ انسولین خارج شده، پس از یک بار شستشو در همان محیط کشت به قطرات جدید منتقل شدند. جنین‌های به دست آمده در یک قطره جمع‌آوری و سپس به طور اتفاقی به دو گروه تقسیم شدند. تعدادی از آنها به قطره محیط کشت RPMI (GibcobrL,Paisley) +۱۰ درصد HS منتقل و بقیه به یک محیط کشت- که قبلا" در آن سلولهای Vero کشت داده شده بود- انتقال داده شدند.

ب) تهیه تک لایه از سلولهای Vero

سلولهای Vero (تهیه شده در انستیتو پاستور ایران) در یک فلاسک ۵۰ سی‌سی به آزمایشگاه منتقل شدند. روش تهیه تک لایه که قبلا" توسط منتزو (Menezo) در سال ۱۹۹۲ گزارش شده بود، با اصلاحاتی مورد استفاده قرار گرفت: بدین قرار که از محیط کشت RPMI همراه با ۱۰ درصد Fetal Calf Serum (FCS) (GibcobrL, Paisley)، ۳۶ میلی‌گرم در لیتر پیرووات سدیم (Sigma)، ۶۰ میلی‌گرم در لیتر پنی‌سیلین G (Sigma) و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین سولفات (Sigma) استفاده شد.

به علاوه در روش منتزو جهت کشت ثانویه از سیستم باز استفاده شده بود؛ در حالی که در پژوهش حاضر برای اولین بار سلولهای Vero زیر روغن پارافین و در قطرات محیط کشت رشد داده شدند؛ زیرا کشت سلولها در زیر روغن، کم هزینه‌تر و نیز عملی‌تر است و امکان آلودگی را کاهش می‌دهد. به طور خلاصه پس از آنکه سلولهای Vero حدود ۹۰ درصد سطح فلاسک را پوشانیدند

توسط تریپسین (GibcobrL, Paisley) ۰/۵ درصد در محلول فسفات‌بافر (PBS) که به آن ۰/۲ میلی‌گرم EDTA اضافه شده بود از کف فلاسک کنده و معلق شدند سپس تریپسین به کمک ۱۰ سی‌سی RPMI +۱۰ درصد HS غیرفعال شده، با سانتریفوژ از سلولها جدا شد. یاخته‌ها مجددا" در ۵ سی‌سی از همان محیط کشت معلق شدند و درصد زنده بودن آنها با محلول تولوئیدین بلو ۰/۵ درصد ارزیابی شد. تعداد 1×10^5 سلول زنده در سانتیمترمکعب به قطره محیط کشت RPMI +۱۰ درصد HS در پتری‌دیش منتقل شد و یک قطره به همان حجم از همان محیط کشت به عنوان شاهد مجاور قطره حاوی یاخته قرار داده شد و با روغن پارافین مایع (Merck, Germany) روی قطرات را پوشانیده، سپس پتری‌دیش‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه‌سانتیگراد حاوی ۵ درصد Co_2 منتقل شدند. از سلولهای معلق تعداد 5×10^6 سلول در یک فلاسک ۵۰ سی‌سی ریخته، جهت تهیه تک لایه مجدد در همان انکوباتور قرار داده شدند. تعدادی از یاخته‌های معلق (حدود 10×10^6) با محلول ۱۰ درصد دی‌متیل‌سولفوکساید DMSO در FCS مخلوط و پس از بیست دقیقه به لوله‌های مخصوص انجماد به حجم یک سی‌سی (nunc.,) منتقل و در دستگاه انجماد (Cryotek CTE 808, Germany) قرار داده شدند و با سرعت دو درجه در دقیقه تا دمای منهای ۸۰ درجه‌سانتیگراد سرد شده، به طور مستقیم درون نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه‌سانتیگراد) فرو برده شدند و جهت نگهداری دراز مدت به تانک مخصوص نگهداری نمونه‌های منجمد انتقال یافتند. در این پروژه از کشت اولیه حداکثر دوبار کشت ثانویه تهیه شد. پس از آنکه هفتاد تا هشتاد درصد کف قطره توسط سلولهای Vero پوشیده شد (حدود ۲ الی ۳ روز) محیط سلولها و قطره شاهد با محلول جدید RPMI +۱۰ درصد HS تعویض و پس از ۲۴ ساعت جنین‌ها به قطرات منتقل شدند. رشد جنینها هر ۲۴ ساعت یک بار توسط میکروسکوپ استریو بررسی شد. آزمایشها ۵ الی ۶ بار تکرار و نتایج به دست آمده از نظر آماری با آزمون مجذور خی (X^2) بررسی شدند.

نتایج

الف) تاثیر کشت همزمان سلولهای Vero بر جنین‌های موش مرحله پیش هسته

در آزمایش اول به منظور سنجش توانایی سلولهای Vero در فراهم آوردن شرایطی که بتواند مانع از توقف رشد جنین موشهای سفید نژاد سوئیسی شود از ۳۰۷ جنین که در مرحله پیش هسته از لوله رحم استخراج شده بودند، استفاده شد. این جنین‌ها در مرحله ۲ سلولی در محیط کشت دچار توقف رشد می‌شوند. جنین‌های مورد آزمایش به طور اتفاقی بین قطرات حاوی محیط کشت RPMI و محیط کشت RPMI که قبلا" سلولهای Vero در آن رشد کرده بودند تقسیم شدند. نتایج حاصل از این آزمایش در جدول ۱ آمده است. ۲۴ ساعت پس از قرار گرفتن جنین‌ها در محیط کشت، تعداد زیادتری از جنین‌هایی که در مجاورت سلولهای Vero قرار داشتند مرحله پیش هسته را پشت سر گذاشته، به مرحله ۲ و ۴ سلولی رسیدند: ۸۷ در برابر ۸۰ درصد برای مرحله ۲ سلولی و ۳۷ در برابر ۲۴ درصد برای مرحله ۴ سلولی ($P<0/05$). ولی چهار روز پس از شروع کشت، جنین‌هایی که در مجاورت سلولهای Vero قرار داشتند رشدی نزدیک به گروه شاهد داشتند. در گروه کشت همزمان ۳ جنین از ۱۱ جنینی که به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند از زونا خارج شدند ولی در گروه شاهد هیچ کدام از ۷ بلاستوسیست نتوانستند از زونا خارج شوند.

رشد کلی کلیه جنین‌هایی که توانسته‌اند مرحله توقف رشد ۲ سلولی را پشت سر بگذارند - اعم از اینکه به

مرحله بلاستوسیست رسیده باشند یا خیر- جنین‌های مجاور Vero نسبت به گروه شاهد درصد بالاتری را نشان می‌دهد؛ به طوری که ۶۱ درصد از این جنین‌ها از مرحله ۲ سلولی عبور کرده‌اند. در حالی که در گروه شاهد تنها ۴۸ درصد جنین‌ها رشد داشته‌اند که تفاوت آماری با ضریب اطمینان P<۰/۰۱ را نشان می‌دهد.

ب) تاثیر کشت همزمان یاخته‌های Vero بر جنین‌های ۲ سلولی موش

تعداد ۴۳۶ جنین ۲ سلولی موش که مرحله توقف رشد را درون رحم پشت سر گذاشته بودند به طور اتفاقی به دو گروه تقسیم شدند. ۱۸۷ جنین در قطرات محیط کشت RPMI و ۲۴۹ جنین در مجاورت سلولهای Vero قرار داده شدند (شکل ۱-الف). نتایج به دست آمده در جدول ۲ درج شده است. جنین‌های گروه شاهد پس از ۴۸ ساعت در محیط آزمایشگاه نسبت به جنین‌های کشت همزمان Vero رشد بیشتری داشتند. به طوری که رشد کلی (تعداد جنین‌های مرحله بلاستولا + مورولا) در گروه شاهد ۹۴ درصد و در گروه مجاور Vero تنها ۸۰ درصد بود (P<۰/۰۱). اما جنین‌های گروه Vero پس از ۷۲ ساعت در محیط کشت رشد بیشتری از خود نشان دادند؛ به طوری که ۸۰ درصد جنین‌های گروه Vero به مرحله بلاستوسیست رسیدند (شکل ۱-ج). در حالی که در گروه شاهد ۷۰ درصد آنها وارد مرحله بلاستوسیست شده بودند. از سویی در گروه Vero، ۴۸ درصد از بلاستوسیست‌ها توانستند از زونا خارج شوند (شکل ۱-د) در حالی که در گروه شاهد تنها ۲۷ درصد بلاستوسیست‌ها توانستند به این مرحله تکاملی وارد شوند. مقایسه این دو گروه اختلاف آماری معنی‌داری با ضریب اطمینان P<۰/۰۰۱ را نشان می‌دهد.

بحث

الف) نقش یاخته Vero در عبور از مرحله توقف رشد جنین تک سلولی موش

در مطالعه حاضر مشاهده شد که سلول Vero قادر نبود جنین تک سلولی موش را در محیط کشت آزمایشگاه از مرحله توقف آن که در زمان ۲ سلولی است، عبور دهد. این یافته با نتایج Ouhibi (۳۱) در سال ۱۹۹۰ که جنین تک سلولی موش را با یاخته Vero، به طور همزمان کشت داده بود، مطابقت دارد: با این تفاوت که در آزمایش وی ۸۶ درصد جنین‌های کشت همزمان با Vero به مرحله ۲ سلولی رسیده بودند که در مقایسه با ۸۲ درصد گروه شاهد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت؛ اما، در مطالعه حاضر ۸۷ درصد جنین‌ها به مرحله ۲ سلولی رسیدند. در حالی که در گروه شاهد ۸۰ درصد این مرحله را طی کردند. در آزمایشهای Ouhibi هیچ کدام از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست و خروج از زونا نرسیدند؛ در حالی که در بررسی ما در هر دو گروه آزمون و شاهد - به ترتیب ۸ و ۷ درصد از جنین‌ها- تا مرحله بلاستوسیست پیش رفتند؛ به علاوه، سه جنین در گروه Vero توانستند از زونا خارج شوند. این تفاوتها هر چند که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهند ولی ممکن است مربوط به نوع محیط کشت (M۱۶ در آزمایش Ouhibi و RPMI در آزمایش حاضر) و دخالت عوامل رشدی باشد که در سرم مورد آزمایش ما وجود داشت. Ouhibi همچنین در آزمایش دیگری که در همان سال انجام داد دریافت که اگر به جای سلول Vero از یاخته MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) استفاده شود جنین‌های تک سلولی موش قادرند به راحتی تا پایان مراحل بلاستوسیست پیش رفته، از زونا خارج شوند. وی توقف رشد جنین تک سلولی موش را در کنار Vero، به علت ضعف سنتز مواد امبریوتروفیک می‌داند

جدول ۱) رشد جنینهای مرحله پیش هسته در محیط Vero و شاهد

تعداد جنین گروهها	دفعات آزمایش	مرحله رشد پس از ۴ روز (درصد)					
		۲سلولی	۴سلولی	۸ سلولی+مورولا	بلاستولا	همچینگ	رشد کلی (٪)&
شاهد ۱۳۳	۵	۱۰۶ (۸۰)	۲۸(۲۴)	۱۶(۱۵)	۷(۷)	—	۵۱(۴۸)
آزمون ۱۷۴	۵	۱۵۲(۸۷)*	۵۶(۳۷)*	۲۶(۱۷)	۸(۵)	۳(۲)	۹۳(۶۱)**

& ۴ سلولی+ ۸ سولی + مورولا + بلاستولا + همچینگ

* P<۰/۰۵

** P<۰/۰۱

جدول ۲) رشد جنینهای ۲ سلولی در محیط Vero و شاهد

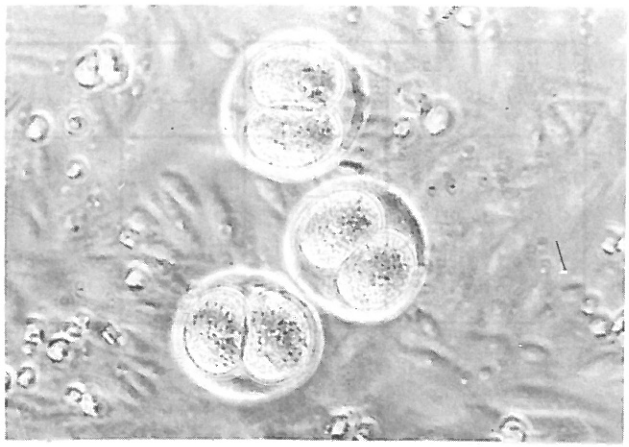
تعداد جنین گروهها	دفعات آزمایش	مرحله رشد پس از ۴۸ ساعت (درصد)			مرحله رشد پس از ۷۲ ساعت (درصد)			
		مورولا	بلاستولا	رشد کلی&	مورولا	بلاستولا	همچینگ	رشد کلی ●
شاهد ۱۸۷	۵	۷۵(۴۰)	۱۰۱(۵۴)**	۱۷۶(۹۴)**	۴(۲)	۹۱(۴۹)**	۵۰(۲۷)	۱۴۱(۷۵)
آزمون ۲۴۹	۶	۹۹(۴۰)	۹۹(۴۰)	۱۹۸(۸۰)	—	۸۰(۳۲)	۱۱۹(۴۸)**	۱۹۹(۸۰)*

& بلاستولا + مورولا

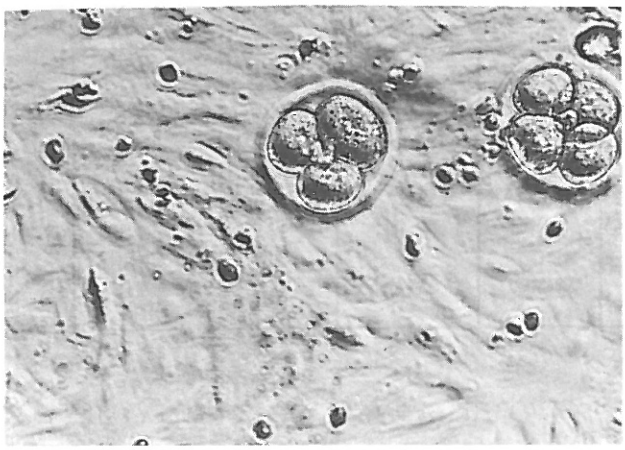
● بلاستولا + همچینگ

* P<۰/۰۵

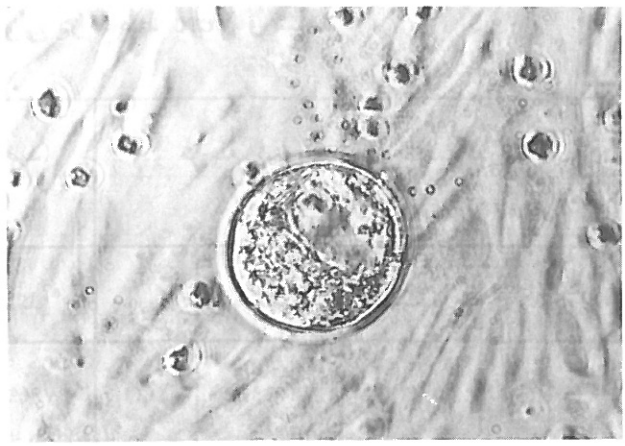
** P<۰/۰۰۱



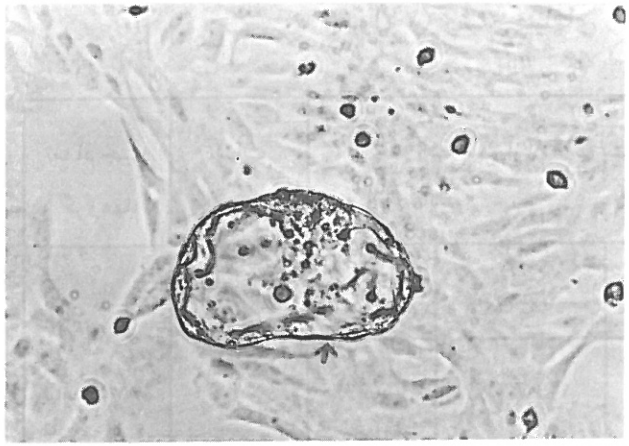
شکل ۱-الف) جنینهای دو سلولی بلافاصله پس از انتقال به قطره محیط کشت حاوی یاخته Vero



شکل ۱- ب) جنینهای سه و چهار سلولی ۱۲ ساعت پس از انتقال به قطره محیط کشت حاوی یاخته Vero



شکل ۱- ج) جنین در مرحله بلاستوسیست اولیه ۴۸ ساعت پس از انتقال به قطره محیط کشت حاوی یاخته Vero



شکل ۱- د) جنین در مرحله خروج از زونا (↑) ۷۲ ساعت پس از انتقال به قطره محیط کشت حاوی سلول Vero

شکل ۱) جنین موش در مراحل مختلف رشد و در کشت همزمان با سلول Vero را نشان می‌دهد

و چنین استدلال می‌کند که Taurine به عنوان متابولیت موثر در رشد جنین از سوی سلولهای Vero نسبت به سلولهای MDBK به میزان کمتری ترشح می‌شود. پذیرش نظریه Ouhibi مبنی بر ضعف سنتز مواد امبریوتروفیک از سوی یاخته Vero قدری مشکل به نظر می‌آید، چرا که همین سلول قادر است جنین گاو (۱۳)، میمون (۱۷) و انسان (۱۶) را تا مراحل بلاستوسیست و حتی خروج از زونا هدایت کند.

از سوی دیگر، اگر بپذیریم که عبور از مرحله توقف جنین به هنگام کشت همزمان با سلولهای مختلف تنها به دلیل نقش ضد سمی است (۱)، باید قبول کنیم که Vero نقش ضدسمی ندارد و یا قادر نیست نقش ضدسمی خود را در مورد جنین موش اعمال کند! قبول این مسئله نیز به دو دلیل میسر می‌باشد: ۱) یاخته‌های Vero در مورد جنین بعضی از گونه‌ها مثبت عمل می‌کنند؛ ۲) یاخته‌های Vero به راحتی گلوکز موجود در محیط کشت را به پیرووات تبدیل کرده، از تشکیل رادیکالهای آزاد که برای رشد جنین مضر می‌باشند، جلوگیری می‌کند (۱۵ و ۳۱). به هر حال هنوز این سوال همچنان مطرح می‌باشد که چه چیز باعث شده است که سلول Vero در مورد پیشرفت جنین تک یاخته‌ای موش ناموفق عمل کند، اما در مورد جنین بعضی از گونه‌ها مثبت واقع شود. در پاسخ به این سوال شاید بتوان گفت که سنتز و یا عدم سنتز عاملی از سوی یک سلول- به هنگام کشت همزمان با جنین یک رده خاص- مانع از فعال شدن ژن مادری جنین شده، رشد آنرا تسهیل می‌کند؛ در حالی که ممکن است سنتز و یا عدم سنتز همان عامل از سوی همان سلول، برای جنین رده‌های دیگر برعکس عمل کرده، ژن مادری را فعال نگاه دارد (۱۹). در این صورت مسیر سنتز RNA تغییر کرده، پروتئینهائی تولید می‌شوند که رشد جنین را تحت‌الشعاع قرار می‌دهند (۳).

ب) نقش یاخته Vero در پیشرفت جنین دو یاخته‌ای موش

مشاهدات ما هنگام آزمایش دوم نشان می‌دهد که سلولهای Vero هر چند قادر نیستند جنین موش را از مرحله توقف رشد در آزمایشگاه عبور دهند اما پس از گذر جنین از مرحله ۲ سلولی سرعت و کیفیت رشد را افزایش می‌دهند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در ۴۸ ساعت اول کشت در آزمایشگاه جنین‌های گروه شاهد نسبت به گروه Vero رشد بیشتری داشته، ولی در پایان ۸۰ درصد جنین‌های گروه Vero توانستند به بلاستوسیست تبدیل شوند؛ در حالی که تنها ۷۵ درصد جنین‌های گروه شاهد به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند. نتایج آزمایشهای Chen (۷) در سال ۱۹۹۴ نشان داد که با استفاده از محیط Human Tubal Fluid به اضافه سرم جنین گاوی (FBS) و کشت همزمان Vero ۶۹/۷ درصد جنین‌های ۲ سلولی موش به مرحله بلاستوسیست رسیدند که در مقایسه با گروه کنترل (۵۹/۴ درصد) رشد بهتری داشتند. بالاتر بودن درصد رشد در گروه آزمایش و شاهد در مطالعه ما ممکن است مربوط به نوع محیط کشت، سرم مورد استفاده و یا زمان انتقال جنین به محیط Vero باشد.

Chen با بررسی پروتئین‌های محیط کشت Vero، پپتیدهائی به وزن ۶/۵ تا ۳۵/۹ کیلو دالتون پیدا کرد که توسط یاخته‌های Vero سنتز شده بودند. او احتمال داد که این پپتیدها به رشد بهتر جنین کمک می‌کنند. نظیر این پروتئین‌ها در سنتز مایع لوله رحمی هامستر (۲۹)، خرگوش (۲۸ و ۳۸)، گوسفند (۴۰)، میمون (۲۰) و انسان (۲۳) شناسایی شده‌اند.

عامل دیگری که در ارزیابی رشد جنین اهمیت دارد و به عنوان یک مولفه رشد مورد نظر است جنین‌هایی هستند که می‌توانند از زونا پلوسیدا خارج شوند و در کف ظرف محیط کشت قرار گیرند. نتایج این پروژه نشان

می‌دهد که ۴۸ درصد جنین‌های گروه Vero توانستند به این مرحله برسند که در مقایسه با گروه شاهد (۲۷ درصد) رشد بسیار خوبی داشتند که احتمال می‌رود این امر به دلایل زیر باشد: ۱) رشد بهتر بلاستومرها که در نتیجه کیفیت جنین را بهبود بخشیده، توانایی آنرا در خروج از زونا افزایش می‌دهد؛ ۲) کم شدن ضخامت زونا پلوسیدا، به طوری که مشاهدات اندازه‌گیری نشده ما نشان داد، جنین‌هایی که در مجاورت یاخته‌های Vero قرار داشتند در خاتمه کشت زونای نازکتری دارند؛ ۳) تاثیر یاخته Vero در فراساختمان زونا پلوسیدا و تغییر آن، به نحوی که بلاستومرها راحت‌تر بتوانند خارج شوند، خروج جنین از زونا پلوسیدا برای لانه‌گزینی اهمیت اساسی دارد. مطالعه شیلاچی (Schillachi) در سال ۱۹۹۴ نشان داد که در مجاورت سلول Vero جنین‌های انسانی بیشتری توانستند مراحل لانه‌گزینی و ایجاد حاملگی را تحقق بخشند (۳۶).

در پایان باید گفت که استفاده از کشت همزمان به عنوان ابزاری برای افزایش سرعت و کیفیت رشد جنین قابل استفاده است و یاخته Vero به لحاظ سهولت کشت، تجدید کشت آسان و سریع و در دسترس بودن آن، برای مطالعات کشت همزمان منبع خوبی است. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که هر چند سلول Vero نتوانست جنین موش را از مرحله ۲ سلولی عبور دهد ولی در هدایت جنین‌های موش از مرحله ۲ سلولی تا بلاستوسیست و خروج از زونا پلوسیدا توانایی خوبی از خود نشان داد.

مراجع

1) Abramczuk J, Solter D, Koprowski H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. Dev Biol 1977; 61:378-83.
2) Ball BA, Miller PG. Survival of equine embryos co-cultured with equine oviductal epithelium from the four-to eight-cell to blastocyst stage after transfer to synchronous recipient mares. Theriogenology 1992; 37:979-991.
3) Bolton VN, Oades PJ, Johnson MH. The relationship between cleavage, DNA replication and Gene expression in the mouse 2-cell embryo. J Embryol Exp Morphol 1984; 79:139-163.
4) Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S. Human embryonic behavior in a sequential human oviduct-endometrial co-culture system. Fertil Steril 1994; 61:976-978.
5) Chang MC. Fertilization of rabbit va in vitro. Nature 1959; 184:466.
6) Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred. 1-cell mouse embryo invitro. J Reprod Fertil 1989; 86:679-688.
7) Chen HF, Ho HN, Chen SU, et al. Peptides extracted from vero cell cultures overcome the blastocyst block of mouse embryos in a serum free medium. J Assist Reprod Genet 1994; 11:165-171.
8) Eyestone, WH & Frist NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J Reprod Fertil 1989; 79:115-123.
9) Gandolfi F & Moor RM. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J Reprod Fertil 1987; 81:23-28.
10) Goddard MJ, Pratt HPM. Control of events during early cleavage of the mouse embryo at analysis of the "2-cell block". J Embryol Exp Morphol 1983; 73:111-133.
11) Goodeaux LL, Voelkel SA, Anzalone CA, Menezo Y, Graves KH. The effect of rhesus epithelial cell monolayers on in vitro growth rhesus embryos. Theriogenology 1989; 39:197-201.
12) Goto K, Iwai N, Takuma Y, Nakanishi Y. Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers. J Anim Sci 1992; 70:1449-1453.
13) Grocholova R, Peter J, Marek J, Tepla O. Beneficial influence of Vero cells on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 1995; 44:199-207.
14) Honda R, Matsuura K, Fukumatsu Y, Kawano T, Okamur H. In vitro enhancement of mouse embryonic development by co-culture with peritoneal macrophages. Hum Reprod 1994; 9:922-936.
15) Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. Radical solutions and cultural problems. Bio Essays 1994; 16:31-38.
16) Kaufmann RA, Menezo Y, Hazout A, Nicollet B, Dumont M, Servy EJ. Co-cultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycle. Fertil Steril 1995; 64:1125-1129.
17) Lanzendorf SE, Gordon K, MA+ony M, Boyd CA, Neely B, Hodgen GD. The effect of co-culture on the postfertilization development of in vitro-matured monkey oocytes. Fertil Steril 1996; 65:420-425.
18) Lavranos TC & Seamark RF. Addition of steroids to embryo-uterin monolyer co-culture enhances embryo survival and implantation invitro. Reprod Fertil Dev 1989; 1:41-46.
19) Leese HJ. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. Oxford Rev Reprod Biol 1991; 13:35-72.
20) Mastroiani L, Urzua M, Stambruch R. Protein paterns in monkey oviductal fluid before and after ovulation. Fertil Steril 1970; 21:817-820.
21) Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayers of Vero cells. Biol Reprod 1990 a; 42:301-306.
22) Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N,

Nicollet B. Co-culture of embryos on vero cells and transfer of blastocysts in humans. Hum Reprod 1992; 7(Suppl 1): 101-106.

23) Moghissi KS. Human fallopian tube fluid. 1. Protein composition. Fertil Steril 1970; 21:821-829.

24) Muggleton Harris A, Whittingham DG, Wilson L. Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse. Nature (London) 1982; 299:460-462.

25) Nasr-Esfahani MH, Johnson MH, Aitken JR. The effect of Iron and Iron chelators on invitro block to development of the mouse embryo: BAT_6 a new medium for improved culture of mouse embryos in vitro. Hum Reprod 1990b; 5:997-1003.

26) Nasr-Esfahani MH, Johnson MH. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. Development 1991; 113:551-560.

27) Nonogaki T, Noda Y, Goto Y, Kishi J, Mori T. Developmetal blokage of mouse embryos caused by fatty acids. J Assist Reprod Genet 1994; 11:482-488.

28) Noske IG, Gooding M. Evidence of an uteroglobin-like protein in epithelial cells of reproductive and non-reproductive tissues of the rabbit. J Reprod Fertil 1974; 54:193-196.

29) Noske IG, Daniel JC. Changes in uterine and oviductal fluid proteins during early pregnancy in the golden hamster. J Reprod Fertil 1974; 38:173-176.

30) Ouhibi N, Menezo Y, Benet J, Nicollet B. Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. Hum Reprod 1989; 4:229-235.

31) Ouhibi N, Hamidi J, Guillad J, Menezo Y. Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. Hum Reprod 1990; 5:737-743.

32) Rexroad CE, Powell AM. Development of ovine embryos Co-culture on oviductal cells, embryonic fibroblasts, or STO cell monolayers. Biol Reprod 1993; 49:789-793.

33) Sakkas D, Jaquenoud N, Leppens G, Campana A. Comparison of results after in vitro fertilized human embryos are culture in routine medium and in co-culture on vero cells: a randomized study. Fertil Steril 1994; 61:521-525.

34) Sakkas D, Trounson AO. Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudo pregnancy. J Reprod Fertil 1990; 90:109-118.

35) Sakkas D, Trounson AO, Kola I. In vivo cleavage rates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in co-culture with oviduct cells. Reprod Fertil Dev 1989; 1:27.

36) Schillaci R, Ciriminna R, Cefalu E. Vero cell effect on in vitro human blastocyst development: Preliminary results. Hum Reprod 1994; 9:1131-1135.

37) Seshagiri PB, Bavister BD. Glucose inhibits the development of hamster 8-cell embryos in vitro. Biol Reprod 1989; 40:599-606.

38) Shapiro SS, Brown NE, Yard AS. Isolation of an acidic glycoprotein from rabbit oviductal fluid and its association with the egg coating. J Reprod Fertil 1974; 40:281-290.

39) Soong YK, Lai YM, Chang SY, Wang ML, Chang MY, Lee CL. A successful pregnancy after subzonal insertion with epididymal sperm and co-culture on vero cell monolayer. Fertil Steril 1993; 59:1308-1310.

40) Sutton R, Nancarrow CD, Wallace ALC, Rigby NW. Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviductal fluid of the sheep. J Reprod Fertil 1984; 72:415-422.

41) Watson AJ, Watson PH, Warnes D, Walker SK, Armstrong DT, Seamark RF. Preimplantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized ovine zygotes: Comparision between co-culture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. Biol Reprod 1994; 50:715-724.

The effect of Vero cells on preimplantation mouse embryo in cultur medium

Ne'amatollahi N, Rezazadeh M, Hoseini A, Mazdarani H

SUMMARY

To study the effect of vero cells on preimplantation mouse embryos two groups of experiment were carried out. In experiment 1, pronuclear stage mouse embryos were co-cultured with Vero cells in RPMI medium and were examined under microscope for 4 days with 24h interval. The results showed co-cultured group developed better compared to control (87% to 80%, $P<0.05$) although, the rate of development to blastocyst was relatively similar (8% to 7%).

In experiment 2 two-cell mouse embryos were co-cultured with Vero cells. 72h. after cultivation more co-cultured embryos developed to expanded blastocysts and moroulae (80% to 75%, $P<0.05$) in addition, more embryos in co-cultured group hatched (48% to 27%, $P<0.001$).

We conclude that although the Vero cell is able to over come the two-cell block but supports the embryos which passed this block invivo.