Original Article

Comparison of the effects of growth factors on mouse embryo preimplantation development resulted vitrification

Ghasemian F., M.Sc., Azarnia M., Ph.D., Faghani M., Ph.D., Bahadori M.H., Ph.D. *

**P.O.Box: 3363, Cellular and Molecular Research Center, Medical Faculty, Medical Sciences Guilan University, Rasht, Iran*

Received: Jun 2011 Accepted: Oct 2011

Abstract

Purpose: The aim of this study is to improve development outcome of vitrified mouse embryos by adding of fibroblast growth factor (FGF) and Hepatocyte growth factor (HGF) into medium culture.

Materials and Methods: Two-cell mouse embryos were obtained from oviduct and then vitrified by cryotop. After warming the embryos, they were cultured in T6 medium supplemented with dose of 20 ng/ml of each FGF and HGF. Embryo developmental rate was compared between vitrified, non vitrified and control groups. Embryos development rate was assessed.

Results: The results showed that cleavage and development rate of vitrified and non-vitrified mouse embryos increased significantly in the culture medium supplemented with growth factors as compared to the control group ($p<0.01$). Also, there is significant difference in morula developmental rates between vitrified and non-vitrified embryos treated with growth factors ($p<0.05$), but this difference has not been observed in blastocyst formation rate ($p>0.05$).

Conclusion: The results of this study demonstrate that enriching the culture medium with growth factors improves preimplantation developmental rates of mouse embryos after vitrification.

Key words: Growth factor, Preimplantation development, Vitrification.

مقاله تحقیقی

مقایسه اثر فاکتورهای رشد بر تکوین جنین‌های پیش از لانه‌گزینی موش حاصل از انجماد شیشه‌ای

فاطمه قاسمیان M.Sc.*، مهناز آذرنیا Ph.D.*، معصومه فغانی لنگرودی Ph.D.، ✍ محمدهادی بهادری Ph.D.*****

* گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم)، تهران، ایران

** گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

*** مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: تیر ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۹۰

چکیده

هدف: بهبودی تکوین جنین‌های منجمد شده موش با اضافه کردن فاکتورهای رشد فیبروبلاست (FGF) و هپاتوسیت (HGF) به محیط کشت

مواد و روش‌ها: جنین‌های دو سلولی موش به دست آمده از لوله رحمی و منجمد شده به روش کرایوتاپ در محیط T6 با دوز ۲۰ نانوگرم بر میلی لیتر از FGF و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از HGF تیمار شده و نتایج کشت آن‌ها با گروه‌های کنترل مقایسه و میزان تکوین جنین‌ها ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان کلیواژ و تکوین جنین‌های منجمد و غیر منجمد موش در محیط کشت با اضافه کردن فاکتورهای رشد به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($p<0.01$). همچنین در میزان تکوین مورولا بین جنین‌های منجمد و غیر منجمد تیمار شده با فاکتورهای رشد اختلاف معنی‌داری دیده شد ($p<0.05$)، اما این اختلاف در میزان تشکیل بلاستوسیست مشاهده نشد ($p>0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که افزودن فاکتورهای رشد در محیط کشت، تکوین قبل از لانه‌گزینی جنین‌های موش را بعد از انجماد شیشه‌ای بهبود می بخشد.

کلید واژه‌ها: فاکتور رشد، تکوین قبل از لانه‌گزینی، انجماد شیشه‌ای

مقدمه

رشد درون آزمایشگاهی (*in vitro*) نسبت به رشد داخل بدن (*in vivo*) تفاوت‌های اساسی دارد؛ چرا که رشد درون بدن مکانیسم‌های حمایت کننده از جنین در برابر فشارهای اساسی موجود را دارد. جنین در حال تکوین در شرایط *in vitro* ممکن است در معرض تعداد زیادی از عوامل زیستی همانند عوامل فیزیکی قرار گیرد درحالی‌که از حمایت‌های لازم در راستای بهبود رشد و بقا که برای تکوین مطلوب جنین ضرورت دارد، محروم است. از جمله این عوامل می‌توان به گونه‌های فعال اکسیژن (ROS; reactive oxygen species) یا آثار ناشی از انجماد– ذوب جنین اشاره نمود که آسیب ناشی از آن‌ها می‌تواند بر رشد پیش از لانه‌گزینی اثر بگذارد [۱]. تحقیقات اخیر نشان‌دهنده نقش فاکتورهای رشد و

✍ **آدرس مکاتبه:** رشت، کیومتر ۱۰ جاده تهران، مجتمع دانشگاهی دانشگاه گیلان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی. صندوق پستی: ۳۳۶۳.

Email: Bahadori@gums.ac.ir

سیتوکین‌ها در تکوین اولیه جنین و لانه‌گزینی آن است [۲ و ۳]. مطالعات متعددی در زمینه سنجش ضرورت حضور فاکتورهای رشد در تکوین جنین‌ها در محیط آزمایشگاه انجام شده است [۱، ٤و٥]. اولین گزارش موفقیت در انجماد جنین‌های انسان مربوط به اوایل دهه ۱۹۸۰ است [٦]. انجماد شیشه‌ای با سرد شدن بسیار سریع و غلظت‌های بالای مواد محافظ انجماد (cryoprotectant agents: CPAs) می‌تواند استفاده شود. حذف کامل تشکیل کریستال یخی [۷]، صرف هزینه‌های پایین، عدم نیاز به دستگاه دمایی قابل برنامه‌ریزی [۸] ، سهولت [۹] و قابل اجرا بودن تنها توسط یک جنین‌شناس [۱۰] از مزیت‌های دیگر این روش است.

از سوی دیگر؛ انجماد جنین و نگهداری طولانی مدت آن امروزه یکی از روش‌های معمول در مراکز درمان ناباروری و آزمایشگاه‌های تحقیقاتی است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که میزان تکوین و لانه‌گزینی در جنین‌های منجمد شده کمتر از جنین‌های غیر منجمد است [۱۱] و در راستای رفع این مشکل مطالعات بسیاری صورت گرفته است. به عنوان مثال دسایی (Desai) و همکارانش نشان دادند که هم‌کشتی (Co-culture) بلاستوسیست‌های منجمد شده انسانی با سلول‌های vero بلافاصله پس از ذوب، سرعت تکوین را افزایش می‌دهد [۱۲]. مقایسه تکوین جنین ٤ روزه موش در محیط کشت و شرایط هم‌کشتی نشان می‌دهد که استفاده از سیستم هم‌کشتی یا کشت به همراه ترشحات حاصل از این سیستم، تکوین جنین‌های منجمد شده را در محیط آزمایشگاه بهبود می‌بخشد [۱۱]. اخیراً با تغییرات در سیستم‌های کشت و روش‌های انجماد به نظر می‌رسد که رشد آزمایشگاهی جنین‌های منجمد بهبود یابد. در این رابطه مطالعات کمی روی اثر فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF: fibroblast growth factor) و فاکتور رشد هپاتوسیت (HGF: Hepatocyte growth factor) صورت گرفته است. فاکتور رشد فیبروبلاست یک تنظیم کننده فیزیولوژیک بالقوه برای رشد و تکثیر سلول است که به عنوان عامل میتوزی قوی برای کشت سلول‌های گرانولوزا در گونه‌های مختلف شناخته شده است [۱۳]. همچنین FGF نقش کلیدی در فرایندهای تکثیری و تمایز تخمک ایفا می‌کند [١٤]. ناندی (Nandi) و همکارانش نیز تاثیر مثبت FGF را بر میزان کلیواژ و تکوین بلاستوسیست جنین‌های بوفالو در مقایسه با گروه کنترل مشاهده کردند [۱۵].

فاکتورهایی مانند فاکتور رشد هپاتوسیت به رشد جمعیت سلول‌های گرانولوزا کمک می‌کند و در راستای عمل هورمون‌های اندوکرینی مانند استروژن و LH بر تکوین فولیکول‌ها اثر گذار بوده و رشد سلول‌های گرانولوزا را در شرایط *in vivo* تحریک می‌کند، اما هیچ یک از این هورمون‌ها (استروژن و luteinizing hormone: LH) به عنوان عامل میتوزی سلول گرانولوزا در شرایط *In vitro* شناخته نشده‌اند. بنابراین آثار استروژن و LH بر رشد *In vivo* فولیکول‌ها، با میانجی‌گری غیرمستقیم فاکتورهای رشدی مثل HGF که به‌طور موضعی تولید می‌شوند، اعمال می‌شود [١٦]. همچنین از مطالعات انجام شده چنین استنباط می‌شود که توان زیستی جنین‌های منتقل شده به رحم گیرنده بسیار ضعیف بوده است. عده‌ای از محققان علت این امر را به محیط کشت نسبت می‌دهند [۱۷]. به همین دلیل در زمینه بهبود کیفیت محیط کشت تحقیقات گسترده‌ای انجام داده‌اند. از این رو مطالعه حاضر برای بررسی اثر فاکتورهای رشد فیبروبلاست و هپاتوسیت بر میزان تکوین جنین‌های دو سلولی موش قبل و بعد از انجماد شیشه ای طراحی شده است. در این راستا برای رسیدن به یک دیدگاه مناسب، کمیت و کیفیت بلاستوسیت‌های حاصل از جنین‌های منجمد و غیر منجمد تیمار شده با فاکتورهای رشد مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

موش‌های ماده نژاد NMRI (Naval Medical Research Institute) با سن ٦ تا ۸ هفته از موسسه سرم سازی رازی تهیه شده و پس از یک هفته قرارگیری در شرایط حیوانخانه (۱۲

ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای ۲۲ درجه سانتی گراد استفاده شدند. موش‌های نر سالم از همین نژاد و با سن حدود ۱۰-۱٤ هفته برای جفت‌گیری استفاده شدند.

تحریک تخمک گذاری و جمع آوری جنین

به منظور القای تخمک گذاری در موش‌های ماده ابتدا ۵ واحد بین المللی PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) و پس از ٤۸ ساعت، ۵ واحد بین المللی hCG (human chorionic gonadotrophin, Organon) به روش درون صفاقی تزریق شد. بلافاصله موش‌ها به صورت یک به یک به منظور جفت گیری در قفس‌های حاوی موش نر قرار داده شدند. صبح روز بعد موش‌های ماده از نظر پلاک واژنی مورد بررسی قرار گرفتند و مو ش‌های حامله جدا شدند. ٤۸ ساعت پس از تزریق hCG موش‌های حامله قطع نخاع و لوله‌های رحمی آن‌ها خارج شدند. لوله‌ها بلافاصله در قطره‌های محیط کشت حاوی سرم قرار داده شدند جنین‌های دو سلولی از لوله‌های رحمی استخراج و جمع آوری شدند.

طراحی آزمایش

مجموع جنین‌های مورد استفاده در این بررسی ۸۲۳ عدد بود که همان‌طور که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود به‌طور تصادفی به ٦ گروه (کنترل، کنترل منجمد شده، غیر منجمد شده تیمارشده با فاکتورهای رشد FGF و HGF، منجمد تیمارشده با FGF و HGF) تقسیم شدند.

جدول ۱. گروه‌بندی جنین‌های به‌دست آمده از لوله رحمی موش به گروه‌های کنترل و آزمون

گروه‌های مورد مطالعه	جنین دو سلولی
۱- کنترل غیرانجمادی	۸۳
۲- کنترل انجمادی	۱۲٤
۳- غیرانجمادی تیمارشده با FGF	۲۸٦
٤- غیرانجمادی تیمار شده با HGF	۱۲۰
۵- انجمادی تیمار شده با FGF	۱۰٤
٦- انجمادی تیمار شده با HGF	۱۰٦

انجماد شیشه‌ای و ذوب

پروتوکل انجماد-ذوب کردن مطابق با روش شرح داده شده توسط کوایاما (kuwayama) انجام شد. جنین‌های مرحله دو سلولی (شکل 1A) در محیط تعادل شامل ۷/۵ درصد اتیلن گلیکول (Sigma, EG) و ۷/۵ درصد دی متیل سولفوکسید (Sigma, DMSO) در محیط Ham's F10 به مدت ۵-۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. بعد از یک چروکیدگی اولیه، جنین‌ها درون محلول انجماد (۱۵ درصد EG، ۱۵ درصد DMSO و سوکروز ۰/۵ مول در لیتر) در محیط Ham's F10 به مدت ۵۰-٦۰ ثانیه در دمای اتاق قرار داده شدند. در حین تیمار با محلول‌های انجمادی چروکیدگی مناسب مشاهده شد (شکل 1B)، جنین‌ها روی کرایوتاپ (Kitazato, Japan) قرار داده شدند (شکل 1C). کرایوتاپ‌ها در نیتروژن مایع برای حداقل دو هفته ذخیره شدند. ذوب کردن جنین‌ها نیز به وسیله قرار دادن کرایوتاپ در محلول ذوب (سوکروز ۱ مول در لیتر) به مدت ۵۰-٦۰ ثانیه در دمای اتاق و سپس درون محلول‌های رقیق (سوکروز ۰/۵ مول در لیتر) به مدت ۳ دقیقه، سوکروز ۰/۲۵ مول در لیتر به مدت ۳ دقیقه و هر دو در دمای اتاق، انجام شد. جنین‌های ذوب شده ٤ تا ۵ بار متوالی در محلول شستشو (Ham's F10) قبل از انکوباسیون شستشو داده شدند. کیفیت جنین‌ها و میزان بقا از روی شکل ظاهری بررسی شد [۱۸].

رنگ آمیزی افتراقی بلاستوسیست‌ها

برای شمارش تعداد سلول‌های توده داخلی روش رنگ‌آمیزی افتراقی یا دو گانه استفاده شد. در این روش ابتدا بلاستوسیست‌های حاصل از کشت هر نمونه به صورت جداگانه در ۵۰۰ میکرولیتر محلول S_1 (شامل محیط کشت، تریتون X100 ۰/۱ درصد و پروپیدیوم یدید: Sigma, PI) به مدت ۱۰ ثانیه نگه داشته شدند. سپس بلافاصله بلاستوسیست‌ها به ۵۰۰ میکرولیتر محلول S2 (این محلول شامل الکل اتانول مطلق و Sigma, Hoechst 33258) منتقل شد و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرار داده

شکل ۱. جنین‌های دو سلولی موش در روند انجماد شیشه ای. A: جنین موش در مرحله دو سلولی B: جنین در مرحله آب‌گیری و چروکیده شدن، C: جنین‌های انتقال داده شده بر روی کرایوتاپ. اندازه بار: ۱۰۰ میکرومتر

شدند. بعد از این مرحله بلاستوسیست‌ها به یک قطره گلیسرول (روی لام میکروسکوپی) انتقال یافته و توسط لامل پوشیده شدند. سپس شمارش سلولی با استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهز به لامپ اشعه ماورای بنفش و فیلتر خروجی با طول موج‌های ٤٢٠ و ٣٦٥ نانومتر انجام گرفت. با این رنگ‌آمیزی سلول‌های توده داخلی (ICM: Inner cell mass) به رنگ آبی و سلول‌های تروفواکتودرم به رنگ قرمز دیده می‌شوند. با توجه به تعداد معدود سلول‌ها، کلیه سلول‌ها با چشم شمرده شده و هر شمارش نیز دوبار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در تمام موارد از نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ و آزمون کای دو به عنوان آزمون آماری استفاده شد و سطح معنی دار بودن، $p<0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأثیر فاکتورهای رشد بر تکوین جنین‌ها

در این مطالعه ٤٨٩ جنین در مرحله دو سلولی جمع آوری شد. از این تعداد به‌طور تصادفی ۸۳ جنین در گروه کنترل و باقی جنین‌ها در دو گروه تیمارشده با فاکتورهای رشد کشت داده شدند تا تأثیر فاکتور رشد فیبروبلاست و هپاتوسیت بر جنین‌هایی که به صورت *in vivo* بلوغ یافته‌اند مشاهده شود. درصد جنین‌های موش که به مرحله مورولا رسیده‌اند در گروه کنترل ۱ و گروه‌های ۳ و ٤ به ترتیب ۷۵/۹، ۸۹/۵۱ و ۸۵ درصد است. به هر حال گروه‌های تیمار شده با فاکتورهای رشد در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p <0.01$). همچنین درصد جنین‌های تکوین یافته به مرحله بلاستوسیست نیز در گروه‌های ۳ و ٤ به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل ۱افزایش پیدا کرده است (۷۹/۷۲، ۷٤/۱٦ و ٦٨/٦٧ درصد؛ $p<0.01$).

تأثیر فاکتورهای رشد بر تکوین جنین‌های دو سلولی پس از انجماد شیشه ای

تعداد ۳۳٤ جنین در مرحله دو سلولی از موش‌های ماده گرفته شد. پس از انجماد، جنین‌ها از انجماد برگردانده شده و جنین‌هایی که از نظر ریخت شناسی ظاهر خود را حفظ کردند، به عنوان جنین‌های بقا یافته پس از فریز محسوب شدند. یگ گروه ۱۱۸ تایی به عنوان گروه کنترل در محیط T6+5%BSA کشت داده شدند. در گروه دوم ۹٦ جنین در محیط T6+5%BSA تیمار شده با۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از فاکتور رشد فیبروبلاست و در گروه سوم ۹٤ جنین در محیط T6+5%BSA تیمار شده با۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از فاکتور رشد هپاتوسیت کشت داده شدند. میزان بقا و تکوین جنین‌ها

به دنبال انجماد شیشه‌ای و ذوب کردن جنین‌ها و کشت دادن در ۳ گروه در جدول ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود میزان تکوین جنین‌ها به مرحله مورولا و بلاستوسیست در گروه ۲ و ۳ افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد ($p<0.01$).

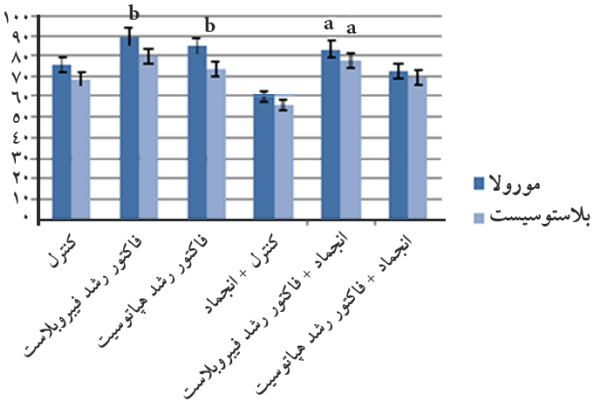
جدول ۲. مقایسه میزان بقا و تکوین جنین‌های تیمار شده با فاکتورهای رشد فیبروبلاست و هپاتوسیت پس از انجماد

گروه‌ها	تعداد جنین‌های زنده پس از فریز	مورلا	بلاستوسیست
گروه کنترل	۱۱۸ (٪۹۵/۱۶)	۷٤ (٪٦۰)	۷۰ (٪٥٦)
گروه آزمون ۲ T6+15%BSA+ 20ng/ml FGF	۹٦ (٪۹۲/۳)	۸٦ (٪۸۳/۱۷)*	۸۱ (٪۷۷/۸۸)*
گروه آزمون ۳ T6+15%BSA+ 20ng/ml HGF	۹٤ (٪۸۸/٦۷)	۷٦ (٪۷۲/۲۲)*	۷۱ (٪٦۹/٤٦)*

میزان تکوین جنین‌ها به مرحله مورولا و بلاستوسیست در گروه ۲ و ۳ افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد ($p<0.01$:*).

مقایسه تأثیر فاکتورهای رشد بر تکوین جنین‌های دو سلولی قبل و بعد از انجماد

نتایج بررسی حاضر نشان می دهد که درصد تکوین جنین‌های دو سلولی به مرحله مورولا در گروه تیمار شده با فاکتور رشد فیبروبلاست قبل و بعد از انجماد به‌ترتیب ۸۹/۵۱ و ۸۳/۱۷ درصد است ($p < 0.05$) و این در حالی است که میزان تشکیل بلاستوسیست در این گروه‌ها به ترتیب ۷۹/۷۲ و ۷۷/۸۸ درصد است که اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود ندارد ($p> 0.05$). همچنین نتایج در مورد گروه‌های تیمار شده با فاکتور رشد هپاتوسیت قبل و بعد از انجماد نشان می‌دهد میزان تکوین مورولا به‌ترتیب ۸۵ و ۷۲/۲۲ درصد ($p< 0.05$) و میزان تکوین بلاستوسیست ۷٤/۱٦ و ٦۹/٤٦ درصد ($p> 0.05$) است (شکل ۲).



شکل ۲. تاثیر فاکتورهای رشد بر میزان تکوین جنین‌های دو سلولی موش حاصل از انجماد شیشه‌ای

a: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در میزان تشکیل بلاستوسیست به دنبال تیمار جنین‌ها با فاکتور رشد فیبروبلاست در مقایسه با جنین‌های منجمد و تیمار نشده است ($p<0.01$). b: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میزان تکوین جنین تیمار شده با فاکتورهای رشد در مقایسه با جنین‌های منجمد و تیمار شده در مرحله تکوین مورولا است ($p <0.05$).

تأثیر فاکتورهای رشد بر کیفیت بلاستوسیست‌ها

با رنگ‌آمیزی بلاستوسیست‌های حاصل از کشت نمونه‌ها و شمارش سلول‌های توده داخلی و خارجی مشاهده شد (جدول ۳) که میزان سلول‌های توده داخلی و تروفواکتودرم در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های دو سلولی منجمد و تیمار شده با فاکتور رشد فیبروبلاست به‌ترتیب ٤۱/۳±۸/۲۱ و ۱۰±٦۸/۱ و جنین‌های غیر منجمد تیمار شده با فاکتور رشد فیبروبلاست ٦/۲٥± ٤۳/٦ و ۹/۱± ٦۹/٥ است که نسبت به هم اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهند. همچنین میزان سلول‌های توده داخلی و تروفواکتودرم در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های دو سلولی منجمد و تیمار شده با فاکتور رشد هپاتوسیت به‌ترتیب ٥/۹±۳۳/۷٦ و ٤۱/۳±۸/۷ و در گروه غیر منجمد تیمار شده با فاکتور رشد هپاتوسیت ٤/۹±۳٥/۷٦ و ٤۲/۳±٦/۷ است که اختلاف معنی‌داری در تعداد سلول‌ها قبل و بعد از انجماد به دنبال تیمار با فاکتورهای رشد مشاهده نشد ($p> 0.05$).

جدول ۳. اثر فاکتورهای رشد هپاتوسیت و فیبروبلاست بر کیفیت بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های دو سلولی منجمد- ذوب شده در مقایسه با گروه کنترل

گروه‌ها (دوز)	جنین (n)	TE (Mean±SD)	ICM (Mean±SD)	TCN (Mean±SD)	Ratio ICM/TE (Mean±SD)
FGF (20 ng/ml)	۲۹	٦٨/١ ± ٨/٢١*	٤١/٣ ± ٨/٢١*	١٠٩/٤ ± ١٢/٣	٠/١٥ ± ٠/٦٠
HGF (20 ng/ml)	۲۵	٥٥/٦٤ ± ٨/٧	٣٣/٧٦ ± ٥/٩	٨٩/٤ ± ١٠/٣٢	٠/١٣ ± ٠/٦٠
کنترل (۰)	۳۳	٥٦ ± ٩/٤	٣٠/٤ ± ٧/٠٣	٨٨/٤ ± ١٢	٠/١٦ ± ٠/٥٢

TCN: تعداد کل سلول، ICM: توده سلول داخلی، TE: تروفواکتودرم.
* :تفاوت معنی‌داری در میزان TE و ICM بین گروه تیمار شده با FGF و گروه کنترل وجود دارد. $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

بحث

ثابت شده است که جنین در مرحله پیش از لانه‌گزینی به فاکتورهای رشد خاصی به منظور تکوین بهتر نیاز دارد. اندومتر و موکوس لوله‌ای سرشار از سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشدی است که برای جنین لازم است [۱]. مسلم است که جنین کشت داده شده در شرایط in-vitro از اکثر این فاکتورها محروم است. به عنوان مثال فاکتور رشد شبه انسولین ۱ از ترشحات رحمی هستند که به عنوان فاکتور رشد بالقوه، تکوین اولیه جنین را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۱۹]. در این مطالعه اثر فاکتورهای رشد فیبروبلاست و هپاتوسیت بر تکوین قبل از لانه‌گزینی جنین‌های انجمادی و غیر انجمادی بررسی شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که فاکتورهای رشد FGF و HGF نسبت به گروه کنترل (تیمار نشده با فاکتورهای رشد) افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. همچنین فاکتورهای مذکور تکوین جنین‌های منجمد-ذوب شده به مرحله بلاستوسیست را در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. با مقایسه نتایج بین تاثیر فاکتورهای رشد فیبروبلاست و هپاتوسیت بر تکوین جنین‌های موش قبل و بعد از انجماد-ذوب مشاهده شد که اگر چه اختلاف معنی‌داری بین تکوین جنین‌های انجمادی و غیر انجمادی وجود داشته اما در مرحله تشکیل بلاستوسیست معنی‌دار نیست. همچنین نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی افتراقی نشان می‌دهد که حضور فاکتورهای رشد بر کیفیت بلاستوسیست حاصل از جنین‌های منجمد تأثیر مثبت دارد. این نتایج نشان می‌دهد که حضور فاکتورهای مذکور در محیط کشت می‌تواند منجر به بهبود تکوین جنین‌ها شود و حتی آسیب‌های ناشی از انجماد را کاهش دهد. به گونه ای که ژانگ (Zhang) و همکارانش [۹] میزان بقای جنین‌های دوسلولی منجمد شده و تشکیل بلاستوسیست را به ترتیب ۹٦ و ۹٦/٤ درصد گزارش کردند که نتایج گزارش شده نزدیک به نتایج گروه کنترل تحقیق حاضر است اما نتایج گروه تیمار شده با FGF-4 و HGF نسبت به نتایج گزارش شده، بالاتر است. بنابراین نتایج بررسی حاضر نشان داد که حضور فاکتورهای رشد فیبروبلاست و هپاتوسیت در محیط تکوین توانایی جنین‌هایی که متحمل کلیواژ می‌شوند و نیز تکوین بلاستوسیست‌های حاصل را بهبود می‌بخشد. این نتایج مشابه با نتایج گزارش شده توسط متانگو (Mtango) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ است که اضافه کردن فاکتور رشد به محیط کشت، میزان تکوین بالاتری را در بلاستوسیست‌های منجمد شده در مقایسه با گروه کنترل ایجاد می‌کند [۲۰]. همچنین میزان تشکیل جنین دو سلولی پس از فریز ۷۹/٤ درصد گزارش داده شده است [۲۱و۲۲].

فاکتور رشد فیبروبلاست یک مولکول است که در همه جا حضور دارد و در بیولوژی تخمدان توجه کمی به آن می‌شود و به‌عنوان عامل میتوزی قوی برای سلول‌های گرانولوزای گونه‌های متنوعی در کشت شناسایی شده است [۲۳]. فاکتور رشد فیبروبلاست یک گروه از زنجیره پلی‌پپتیدهای منفرد اتصال یابنده به هپارین است و با سطح سلول به‌واسطه سولفات هپارین میان کنش می‌دهد که نشان‌دهنده ضرورت حضور bFGF-4 برای انتقال سیگنال است [۱٤] که نقش

اساسی در فرایند تکثیر و تمایز تخمک برعهده دارد. فاکتور رشد فیبروبلاست تمایز سلول‌های گرانولوزا تخمدان [۲٤]، بیان رسپتور هورمون لوتئینزه کننده (LH) توسط سلول‌های گرانولوزا و تکثیر سلول‌های زاینده تخمدان [۲۵] را تحریک می‌کند. به نظر می‌رسد که هورمون‌ها و فاکتورهای رشد که در محیط کشت حضور دارند یا آن‌هایی که از تخمک‌ها ترشح می‌شوند، نقش اساسی در اکتساب توانایی تکوین دارند [۲٦]. بلوک تکوینی in-vitro جنین از تخمک‌های بالغ شده در محیط کشت، بلوک دوسلولی *in vitro* نامیده می‌شود و در اکثر نژادهای موش ظاهر می‌شود، بنابراین به‌نظر می‌رسد که جنین به شرایط کشت استفاده شده برای تکوین بسیار حساس است [۲۷] و محیط کشت برای رهایی تکوین جنین‌ها از بلوکه شدن نژادهای موش برای حمایت تکوین تخمک‌های بالغ شده *in vitro* تنظیم شده است.

فاکتورهایی مانند فاکتور رشد هپاتوسیت (HGF: hepatocyte growth factor) به رشد جمعیت سلول‌های گرانولوزا کمک می‌کند و در راستای عمل هورمون‌های اندوکرینی مانند استروژن و LH بر تکوین فولیکول‌ها عمل کرده و رشد سلول‌های گرانولوزا را در شرایط *in vivo* تحریک می‌کند، چرا که هیچ یک از این هورمون‌ها (استروژن و LH) به عنوان عامل میتوزی سلول گرانولوزا در شرایط *in vitro* شناخته نشده‌اند. بنابراین آثار استروژن و LH بر رشد in-vitro فولیکول‌ها، با میانجی‌گری غیرمستقیم فاکتورهای رشدی مثل HGF که به طور موضعی تولید می‌شوند، اعمال می‌شود [۱٦]. یکی از مشکلات اصلی در کشت آزمایشگاهی جنین‌ها، فرایندی تحت عنوان توقف در مرحله دو سلولی است [۲۸]. از این روبه نظر می‌رسد که بسیاری از تغییرات در محیط کشت ممکن است متعاقبا بر تکوین آزمایشگاهی جنین‌ها نیز مفید باشد [۲۹]. همچنین در این مطالعه آثارسودمندی از فاکتور رشد فیبروبلاست بر تعداد سلول‌های توده داخلی و تروفواکتودرم جنین کشت داده شده بررسی شد. این بدین معنی است که FGF آثار قابل ملاحظه ای بر تکوین جنین‌های پیش از لانه‌گزینی در شرایط *in vitro* دارد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که بهبود شرایط محیط کشت جنین می تواند تا حدودی تکوین جنین موش را به دنبال انجماد-ذوب به وضعیت مطلوب نزدیک نماید و حتی بر کیفیت جنین نیز اثر مثبت می‌گذارد. اما هنوز این سوال مطرح می شود که آیا جنین‌های کشت داده شده پس از انجماد در محیط کشت تیمار شده با فاکتورهای رشد آیا منتج به بارداری و تولد می‌شود یا خیر؟ آیا فاکتورهای مذکور می توانند بر جنین انسان اثرهای درمانی نیز داشته باشد؟ از این رو این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

در مجموع مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اضافه کردن فاکتور رشد فیبروبلاست و هپاتوسیت به محیط تکوین جنین پس از انجماد شیشه‌ای مؤثر است و میزان تشکیل بلاستوسیت را افزایش می‌دهد. اگرچه اطلاعات ما نمی‌تواند به طور مستقیم برای انجماد و تکوین جنین‌های انسان و در نهایت انتقال جنین در شرایط آزمایشگاهی به‌کار برده شود اما ممکن است که شرایط کشت برای چنین برنامه‌هایی را بهبود بخشد.

References

1. **Glabowski W, Wiszniewska B, Kurzawa R.** Protective potential of SCF for mice preimplantation embryos cultured in vitro in suboptimal conditions. J Assist Reprod Genet 2008; 25:395–402.
2. **Pfeifer TL, Chegini N.** Immunohistochemical localization of insulin- like growth factor – I(IGF-I), IGF-I receptor and IGF binding proteins 1-4 in human fallopian fube at various reproductive stages. Biol Reprod 1994; 50:281-9.
3. **Imai T, Kurachi H, Adachi K, Adachi H, Yoshimoto Yoshimoto Y, Homma H, et al.**

Changes in epidermal growth factor receptor and the levels of its ligands during menstrual cycle in human endometrium. Biol Reprod 1995; 52: 928-38.

4. **Chai N, Patel Y, Jacobson K, McMahon J, McMahon A, Rappolee DA.** FGF and its essential regulator of the fifth cell division in preimplantation mouse embryos. Dev Biol 1998; 198: 105-15.
5. **Wei Z, Park KW, Day BN, Prather RS.** Effect of epidermal growth factor on preimplantation development and its receptor expression in porcine embryos. Mol Reprod Dev 2001; 60:457-62.
6. Al-**Hasani S, Ozmen B, Koutlaki N, Schoepper B, Diedrich K, Schultze-Mosgau A.** Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? Reprod Biomed Online 2007;14: 288-93.
7. **Bahadori MH, Soltani B, Mirzajani E, Babaei P, Ansar M.M, Ahmadi JMM.** Cryopreservation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells by two conventional and open-pulled straw vitrification methods. Yakhteh Med 2009;11: 317-26.
8. **Karlsson JO.** Cryopreservation: freezing and vitrification. Science 2002; 296: 655-6.
9. **Zhang J, Cui J, Ling X, Li X, Peng Y, Guo X, et al.** Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method. J Assist Reprod Genet 2009; 26: 621–28.
10. **Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O**. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod Biomed Online 2005; 11: 300–8.
11. **Valojerdi RM, Movahedin M, Hosseini A.** Improvement of development of vitrified 2 cell mouse embryos by Vero cell co- culture. J Assist Reprod Genet 2002; 19: 31-8.
12. **Desai N, Goldfarb J.** Co-cultured human embryos may be subjected to widely different microenvironment: pattern of growth factor/ cytokine release by Vero cell during the co-culture interval. Hum Reprod 1998; 13:1600-5.
13. **Quennell JH, Stanton JAL, Hurst PR.** Basic fibroblast growth factor expression in isolated small human ovarian follicles. Mol Hum Reprod 2004; 10: 623-8.
14. **Pandey A, Gupta N, Gupta SC.** Improvement of in vitro oocyte maturation with lectin supplementation and expression analysis of Cx43, GDF-9, bFGF-4-4 and fibronectin mRNA transcripts in buffalo (Bubalus bubalis). J Assist Reprod Genet 2009; 26: 365-71.
15. **Nandi S, Ravindranatha BM, Gupta PS, Raghu HM, Sarma PV.** Developmental competence and post-thaw survivability of buffalo embryos produced in vitro: effect of growth factors in oocyte maturation medium and of embryo culture system. Theriogenology 2003; 60: 1621-31.
16. **Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K, Kikuchi K.** Up data of in vitro production of porcine embryos. Front Biosci 2006; 11: 2565-73.
17. **Saito S, Niemann H.** Effect of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. Biol Reprod 1991:44:927-36.
18. **Kuwayama M.** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. Theriogenology 2007;67: 73-80.
19. **Thieme R, Ramin N, Fischer S, Püschel B, Fischer B, Santos AN.** Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and insulin-like-growth-factor 1. Mol Cell Endocrinol 2012; 348: 112-9.
20. **Mtango NR**, **Varisanga MD**, **Dong YJ**, **Rajamahendran R**, **Suzuki T**. Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. Theriogenology 2003; 59: 1393-402.

21. Khosravi-Farsani S, Sobhani A, Amidi F, Mahmoudi R. Mouse oocyte vitrification: the effects of two methods on maturing germinal vesicle breakdown oocytes.J Assist Reprod Genet 2010; 27:233-8.

22. Aono N, Abe Y, Hara K, Sasada H, Satoo E, Yoshida H. Production of live offspring from mouse germinal vesicle stage oocytes vitrified by a modified step-wise method, SWEID. Fertil Steril 2005; 84: 1078-82.

23. **Roberts RD, Ellis RC.** Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells in vitro. Biol Reprod 1999; 61: 1387-92.

24. **Adashi EY, Resnick CE, Croft CS, May JV, Gospodarowicz D.** Basic fibroblast growth factor as a regulator of ovarian granulosa cell differentiation: a novel non-mitigenic role. Mol Cell Endocrinol 1988; 55: 7-14.

25. **Gospodarowicz D, Plouet J, Fujii DK.** Ovarian germinal epithelial cells respond to basic fibroblast growth factor and express its gene: implications for early folliculogenesis. Endocrinology 1989; 125: 1266-76.

26. **Gupta PSP, Ravindranatha BM, Nandi S, Sarmap V.** In vitro maturation of buffalo oocytes with epidermal growth factor and fibroblast growth factor. Indian J Anim Sci 2002; 72: 23-6.

27. **Muggleton-Harris A, Whittingham DG, Wilson L.** Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse. Nature 1982;299: 460-2.

28. **Yeo CX, Gilchrist RB, Thompson JG, Lane M.** Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. Hum Reprod 2008; 23(1):67-73.

29. **Papanikolaou EG, D'haeseleer E, Verheyen G, Van de Velde H, Camus M, Van Steirteghem A, et al.** Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. Hum Reprod 2005; 20: 3198-203.