مقاله تحقیقی

# قابلیتهای سلولهای فیبروبلاست جنین موش و انسان در حفاظت جنینهای موش از آثار ناشی از دمای آزمایشگاه

سید نورالدین نعمت اللهی ماهانی .Ph.D*، حسن پاهنگ .M.Sc**، محمد علی کیانی نژاد .B.Sc**

*گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی افضلی پور و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان
** دانشکده پزشکی بجنورد

وصول: خردادماه ۸۵، پذیرش: مردادماه ۸۵

## چکیده

**هدف:** بررسی قابلیت سیستمهای هم کشتی در غلبه بر آثار سوء ناشی از نگهداری جنینهای ۲- سلولی موش دردمای پایین.

**مواد و روشها**: جنینهای ۲-سلولی موش از لوله رحم موشهای نژاد NMRI پس ازتحریک تخمک گذاری با گونادوتروپینها به‌داخل محیط HTF (Human Tubal Feluid) با۱۵٪ FBS (Fetal Bovin serum) آزاد شدند. جنینهای طبیعی پس از سه بار شستشو با HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) همراه با۱۵درصد BSA (Bovin serum Albumin) به مدت ۱، ۳ و ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه(۲۵ºC-۲۲) قرارداده شدند. سپس جنینهای هر گروه به طور همزمان به محیطهای HTF، MEM-α (Minimum Essential Medium Modification) به‌عنوان شاهد و HEF (Human Embryonic Fibroblast) و MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) به‌عنوان هم کشتی منتقل و به‌مدت ۱۲۰ ساعت در انکوباتور $CO_2$ دار ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آزمایشها ٦ بار تکرار و تکوین جنینها هر ٢٤ ساعت به مدت ۵ روز بررسی شد. اطلاعات به‌دست آمده به کمک آزمون مجذور کای آنالیزآماری شد و حد معنی داری اختلافات بین گروهها $p<0.05$ در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** تکوین جنینهایی که به‌مدت ۵ ساعت در حرارت آزمایشگاه نگهداشته شده بودند درهردوگروه HTF و MEM-α به‌طور معنی داری ($p<0.05$) نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود. هم کشتی جنینها با MEF یا HEF میزان تکوین به مرحله بلاستیوسیست را در تمام گروه‌های مورد مطالعه که در دمای آزمایشگاه قرارگرفته بودند افزایش داده بود. اختلاف آماری معنی داری بین گروه‌های شاهد وآزمون هم کشتی دیده نشد؛ در حالی که جنینهایی که بمدت ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و سپس به محیطهای هم کشتی منتقل شده بودند تکوین چشمگیری در روزهای چهارم و پنجم نسبت به جنینهایی که در محیط MEM-α ( شاهد ) قرار داشتند، نشان دادند ($p<0.05$).

**نتیجه‌گیری:** از یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که جنینهای ۲- سلولی موش قادرند شرایط نامساعد دمای آزمایشگاه را به‌مدت سه ساعت تحمل کنند. به هرحال، نگهداری جنینها به‌مدت ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه اثرات جبران ناپذیری بر تکوین جنینها بر جا می‌گذارد. هر دو نوع سلولی که در مطالعه حاضر به‌کار گرفته شده بود توانستند تکوین بهتر جنینها را، به‌خصوص جنینهایی که در حرارت آزمایشگاه قرارداده شده بودند تامین کنند.

**کلیدواژه‌ها:** هم‌کشی، جنین موش، فیبروبلاست جنینی، دمای آزمایشگاه

**آدرس مکاتبه:** کرمان، دانشکده علوم پزشکی کرمان، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه تشریح E-mail: drbahrammemar@yahoo.com

## مقدمه

فرایند لقاح و به‌دنبال آن تکوین جنین پستانداران و ازجمله انسان، درشرایط مناسب درون بدن صورت می‌گیرد. در فناوریهای کمکی تولید مثل Assisted Reproductive Technology (ART) تلاش شده و می‌شود تا آثار سوء عوامل محیطی مانند تغییر pH، تغییر میزان گازهای موجود در محیط، نور مرئی و تغییرات دمای محیط به حداقل رسانده شود تا بدینوسیله کیفیت جنین افزایش یافته و احتمال بارداری نیز بیشتر شود. مطالعات چندی به تاثیر تغییرات دما در حین دستکاریهای تخمک و جنین در آزمایشگاه پرداخته اند. نوسانات دما در مراحل اولیه تکامل منجر به کاهش کیفیت و در مواردی ایست تکوینی جنین در آزمایشگاه می‌شود. وقتی جنینهای یک سلولی موش فقط حدود ۵ دقیقه در معرض دمای اتاق باشند تسهیم آنها مهار می‌شود و اگر این زمان به حدود ۱۰ تا ۱۵ دقیقه افزایش یابد درصد جنینهایی که به مرحله بلاستوسیست می‌رسند نسبت به گروه کنترل حدود ۵۰درصد کاهش می‌یابد [۱]. همچنین نگهداری جنینهای خرگوش به‌مدت حدود ۳ ساعت در دمای اتاق باعث کاهش تسهیم آنها شده بود [۲]. نگهداری تخمک انسان در دمای اتاق می‌تواند به دوکهای میوزی آسیبهای جبران ناپذیری وارد کند [۳]. مطالعات نشان داده که جنینهای ۱ روزه خرگوش به نور مرئی حساسیت بیشتری دارند، در صورتی که جنینهای ۳ روزه بیشتر به دمای اتاق حساسند. دمای اتاق منجر به تخریب اسکلت سلول و انتقال نا هماهنگ ارگانلهای داخل سلولی می‌شود در صورتی که نور مرئی منجر به مرگ سلولی می‌شود. نگهداری مورولای خرگوش به‌مدت ۸ ساعت در دمای اطاق باعث تأخیر در تسهیم جنین شد و بعد از ۱۰ ساعت تمام بلاستومرها در مرحله متافاز متوقف شده بودند. هرچند که مورفولوژی بلاستومرها تغییر زیادی نکرده بود ولی دمای اتاق باعث تخریب دستگاه گلژی شده بود [٤].

پیش هسته‌های نر و ماده در مقایسه باسیتوپلاسم نسبت به دماهای پائین مقاومت بیشتری دارند و اگر پیش هسته‌ها به یک سیتوپلاسم نگهداری شده در دمای پایین منتقل شوند هیچ کدام از جنینها به مرحله بلاستوسیست نمی رسند. درحالیکه اگر پیش هسته‌های نگهداری شده در دمای پایین به یک سیتوپلاسم نگهداری شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل شوند بهتر می‌توانند مراحل تکوینی خود را طی کنند [۵]. از سویی اگر جنینهای گاو برای مدت زمان کوتاهی در دمای °٤١ نگهداری شوند تکامل آنها مختل می‌شود. علت متوقف شدن جنینهای دو سلولی گاودر مرحله هشت سلولی دردمای بالا به تخریب میتوکندریها نسبت داده شده است [٦].

وقتی جنینهای دو سلولی موش به مدت ٣٦ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد در لوله رحم نگهداری شدند و سپس میزان تکوین آنها تا مرحله خروج از زوناپلوسیدا و تولد نوزادان بررسی شد مشاهده کردند که حدود ۳۰درصد از جنینها زنده متولد شدند. نگهداری جنینها در دمای اتاق همراه با افزایش فشار هیدروستاتیک محیط باعث زنده ماندن تعدادی از جنینها شد [۷]. به‌نظر می‌رسد حساس ترین مرحله تکوینی جنین موش، مرحله دو سلولی است که بیشترین تخریب در اثر نوسانات گرمایی در این مرحله صورت می‌گیرد [۸]. مطالعات دیگری نیز نشان داده که مقاومت در برابر شوکهای گرمایی(دمای ٤١ درجه) به مرحله تکوینی جنین و شرایط محیط کشت (*in vivo* یا *in vitro* ) بستگی دارد [۹]. در جریان ART و نیز مطالعات جنین شناسی پستانداران، حتی در بهترین شرایط نیز جنین در معرض زمانهای متفاوتی از دمای آزمایشگاه قرار می‌گیرد که با توجه به مطالعات انجام شده آثار متفاوتی بر کیفیت و میزان تکوین جنین بر جا می‌گذارد و جستجوی راه‌های مقابله با این آثار میزان موفقیت ART را بهبود خواهد بخشید.

مطالعات بسیاری به بررسی راه‌های کاهش صدمات ناشی از عوامل محیطی بر تخمک وجنین پستانداران پرداخته اند. از جمله تغییر در نوع و میزان ترکیبات محیط کشت و پالایش آنها [۹ و ۱۰]، به‌کارگیری میزان مشخص گازهای محیط در انکوباتورو استفاده از گرمکنهای ۳۷ درجه سانتیگراد نیز

پیشنهاد شده است [۱۱]. یکی از راه‌های غلبه بر عوامل محیطی مضر، استفاده از سیستمهای هم کشتی co-culture است. به‌کارگیری سلولهای مغذی feeder cells در مطالعات چندی آثار مثبتی را به‌دنبال داشته است [۱٤ و ۱۵] و بسیاری از مطالعات سیستمهای هم کشتی را روشی مفید برای افزایش توان حیاتی جنین در آزمایشگاه دانسته اند [۱٦]. در حالی‌که معدودی گزارشها استفاده از سلولهای مغذی را بی اثر ویا کاری وقت گیر و کم اثر دانسته اند [۱۷]. در یک جمع‌بندی می‌توان گفت هم کشتی روش مناسبی برای ارتقای کیفیت جنین است، به‌خصوص زمانی که شرایط برای رشد جنین نامساعد باشد و یا جنین در معرض استرس قرار بگیرد، هم کشتی جنین با سلولهای مغذی باعث تکوین بهتر جنین می‌شود. مطالعه حاضر به منظور بررسی آثار سوء احتمالی نگهداری جنین موش در دمای آزمایشگاه به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی طراحی شده و با استفاده از دو سیستم هم کشتی، آثار ناشی از به‌کارگیری سلولهای فیبروبلاست جنینی موش و انسان در تکوین جنینهای دو سلولی موش پس از نگهداری در دمای آزمایشگاه بررسی شده است.

## مواد و روشها

### حیوان آزمایشگاهی

در آزمایشهای جاری از موش سفیدآزمایشگاهی نژاد NMRI که درحیوان خانه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تکثیر می‌شد استفاده شد. حیوانات ماده در زمان شروع آزمایشات بین ۵ تا ۸ هفته سن داشتند و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص جوندگان نگهداری شدند.

### تهیه محیط کشت

برای نگهداری جنینها در حرارت آزمایشگاه از (HBSS) که قادر است pH محیط را در غیاب $CO_2$ ثابت نگه دارد استفاده شد. HBSS به‌صورت ماهانه در آزمایشگاه تهیه شد. محیط کشت HTF در محیط آزمایشگاه تهیه [۱۸] و قبل از استفاده به میزان ۱۵درصد سرم Gibco, uk FBS به آن اضافه می‌شد. محیط کشت (MEM-α) بصورت پودر Sigma خریداری و پس از تهیه با روشی که دستورالعمل سازنده مشخص کرده بود باافزودن ۱۵درصد FBS استفاده می‌شد. قبل از انتقال جنین، هر یک از دو محیط کشت یاد شده، بمدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷°C و ۵درصد CO2 نگهداری می‌شدند.

### تحریک تخمک گذاری

موشهای ماده در دسته‌های ده تایی انتخاب و به‌مدت دو هفته جدا از موشهای نر نگهداری شدند. پس از اطمینان از باردار نبودن موشها، ۷/۵ واحد Intervet,Denmark ۱PMSG و یا Gonadotropin(hMG) human Menopausal ( Organon , Holland) به‌طریق داخل صفاقی، به آنها تزریق شد. چهل و هشت ساعت بعد ۱۰ واحد human Chorionic Gonadotropin (hCG) ( Organon, Holland ) به همان روش تزریق شد و بلافاصله موشهای ماده کنار موشهای نر که توانایی بارورسازی آنها قبلاً کنترل شده بود قرار گرفتند.

### جمع آوری جنینهای دو سلولی

چهل و هشت ساعت پس از تزریق hCG، موشهای ماده ای که جفتگیری کرده بودند( مشاهده پلاک واژن) با کشش گردن کشته شده و در شرایط حتی المقدور استریل، لوله رحم موشها جدا و به قطره محیط کشت HTF+ ٪۱۰ FBS زیر روغن پارافین مایع ( Sigma ) انتقال داده شد. سپس به کمک میکروسکوپ استریو (stemi. SV6 Zeiss. Germany) و با پا شش حدود ۰/۱میلی لیتر محیط کشت از انتهای دیستال

1- Pregnant Mares Serum Gonadotropin

(قیف) لوله رحم توسط سرنگ انسولین و سوزن ۳۰G ، جنینها از انتهای پروکسیمال لوله رحم خارج شده ودر قطره محیط کشت قرار گرفتند. جنینهایی که از نظر مرفولوژی سالم به‌نظر می‌رسیدند بکمک پیپت پاستوری که نوک آن به کمک شعله آتش حدود ۱۵۰ میکرون باریک شده بود جمع آوری شده و پس از سه بار شستشو به قطرات HBSS همراه با ۱۵ درصد FBS منتقل شدند.

## روش تهیه فیبروبلاست جنین موش (MEF: Mouse Embryonic Fibroblast)

جنینهای ۱٤-۱۳ روزه موشNMRI در شرایط حتی المقدور استریل از رحم خارج و در یک پلیت بزرگ درون بافر فسفات(PBS) قرار می‌گرفتند. سر و کبد جنینها به دقت جدا می‌شد و بقیه جنینها با اسکالپل و پنس به قطعات کوچک تقسیم و چندین بار با PBS شستشو داده شدند تا حتی المقدور شفاف و عاری از گلبول قرمز باشند. ۱۰ میلی لیتر محلول تریپسین و ۰/۵ میلی مول EDTA (Ethylene Diamide Tetra acetic Acid) به قطعات جنینی اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس قطعات درشت جدا شده و سوسپانسیون حاصله سانتریفیوژ و پس از دوبار شستشو با BSA+PBS یا(MEM-α+٪۱۰FBS) با لام نئوبار شمارش و با متیلن بلو ۰/۵درصد، زنده بودن آنها بررسی شد. سلولهای حاصله به تعداد ۱×۱۰٦ سلول زنده به فلاسک حاوی ۵ سی سی MEM- α + FBS منتقل و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور مرطوب ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵درصد گاز CO2 نگهداری می‌شدند. چگونگی رشد سلولها به کمک میکروسکوپ معکوس (Nikon TS100) بررسی و پس از دوپاساژ جهت استفاده در آزمایشهای بعدی در نیتروژن مایع منجمد می‌شدند و معمولاً از پاساژهای دوم تا هفتم برای انجام آزمایشهای استفاده می‌شد.

## روش تهیه فیبروبلاست جنین انسان

بافت همبند یک جنین سه ماهه انسان پس از اخذ مجوز کتبی از والدین در شرایط حتی المقدور استریل از استخوان و غضروف جدا شد و در بقیه موارد مشابه روش تهیه فیبروبلاستهای جنینی موش عمل شد و برای استفاده از این سلولها در طی آزمایشات از پاساژهای دوم تا هفتم استفاده شد.

## تهیه تک لایه مغذی فیبروبلاست

سلولها به کمک تریپسین و EDTA از کف فلاسک جدا شده وسوسپانسیون حاصل به یک لوله ۵ سی سی منتقل می‌شد. پس از سانتریفیوژ کردن و تخلیه مایع رویی به میزان کافی محیط کشت به آن اضافه شد تا تراکم سلولی به ۵×۱۰٤ برسد. به کمک سمپلر و سرسمپلر استریل شده در یک پلیت ٦۰ میلی متری حدود ۱۰ قطره ۳۰ میکرولیتری گذاشته و سطح پلیتها با روغن پارافین استریل (Sigma) پوشانده شد. سپس پلیت به انکوباتور CO2 دار با دمای ۳۷ درجه منتقل شد و تا ۲٤ ساعت قبل از استفاده در همان وضعیت باقی می‌ماند تا فیبروبلاستها به کف پلیت بچسبند.

## نگهداری جنینها در دمای آزمایشگاه

جنینهای دو سلولی موش درون قطرات HBSS با اضافه ۱۵درصد FBS که روی قطرات با روغن پارافین مایع پوشانده شده بود قرار داده و سپس در زمانهای یک تا ٦ ساعت در محل تاریک در آزمایشگاه(۲٤-۲۲ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. برای کسب زمان مناسب نگهداری جنینها در دمای آزمایشگاه، ابتدا آزمایش در زمانهای یک، دو ،سه و چهار و پنج و شش ساعت انجام شد و برای انجام این‌کار جنینهایی که از نظر ظاهری سالم به نظر می‌رسیدند جدا شدند و پس از سه بار شستشو در محیط بافر فوق و نگهداری در دمای آزمایشگاه، هر یک ساعت تعدادی از آنها

به طور مساوی به محیطهای HTF و MEM-α کـه از روز قبـل تهیه و در انکوباتور نگهداری شده بودند منتقل شـدند و ایـن آزمون دوبار تکرار شـد. پـس از بررسـی نتـایج آزمـون اول، زمانهای یک، سه و پنج ساعت بـرای انجـام آزمـایش اصـلی انتخاب شدند. در هر آزمون ابتدا جنینهای دو سلولی که ظاهر سالم داشتند جدا شده و در بافر فـوق سـه بـار شستـشو داده می‌شدند. سپس جنینهای گـروه شـاهد بـه محیطهـای HTF و MEM-α و HEF و MEF منتقل شدند. مابقی جنینها در بـافر HBSS همـراه بـا ۱۵درصـد سـرم نگهـداری مـی‌شـدند و در زمانهای یک، سه و پـنج سـاعت تعـدادی از آنهـا بـه نـسبت مساوی به قطرات جداگانه ای از محیطهای فوق منتقل شدند.

## ارزیابی جنینها

جنینهای گروه آزمون همراه بـا گـروه شـاهد (کـه در دمـای آزمایشگاه قرار نگرفته بودند) هر ۲٤ ساعت یک‌بـار بـه‌مـدت ۱۲۰ ساعت با میکروسـکوپ معکـوس مـشاهده وچگـونگی تکوین آنها گزارش شد. گذر جنین از مراحل چهـار و هـشت سلولی (۲٤ ساعت)، مورولا (٤۸ ساعت)، بلاستوسیست اولیه و بلاستوسیست ثانویه (۷۲ سـاعت)، بلاستوسیـست در حـال خـروج از زوناپلوسـیدا Hatching Blastocyst (۹٦ سـاعت) و بلاستوسیست خارج شـده از زونـا Hatched Blastocyst (۱۲۰ ساعت) مورد بررسی قرار گرفت.

## جمع آوری نتایج و آنالیز آماری یافته‌ها

آزمایشهای ٦ بار تکرار و تعداد جنین تکوین یافته در هر روز گزارش شد. سپس میزان تکوین جنینها در گروه‌های مختلف محاسبه شد. یافته‌ها به‌صورت تعداد جنین تکوین یافته در هر مرحله و میزان تکوین (٪) گزارش شـده اسـت. بـرای آنـالیز آماری از آزمون $\chi 2$ استفاده و $p \leq 0.05$ حد معنی داری آزمونهـا در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

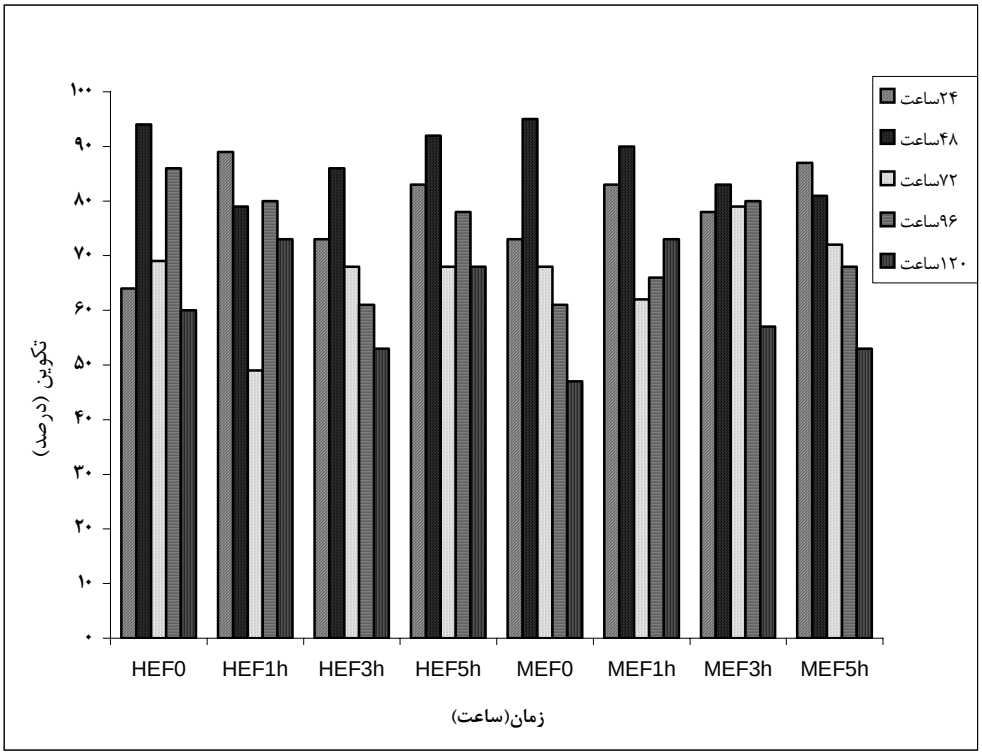
در مجموع تعداد ۳۸۱ جنین در ٦ آزمون به‌دست آمد که ۳۳٦ جنین سالم به‌نظر می‌رسیدند و برای ادامه آزمایشهای اسـتفاده شدند. جنینهایی که بدون قرار گرفتن در دمـای آزمایـشگاه در محیطهای HTF و MEM- α کشت شده بودنـد تکـوین نـسبتا برابری داشتند و بین میزان تکوین در دو محیط تفاوت آمـاری معنی دار وجود نداشت ( جدول ۱). همچنین بـین جنینهـایی که به‌مدت ۱، ۳ و۵ ساعت در دمای اطاق نگهـداری و سـپس به محیطهای HTF و MEM- α منتقل شـده بودنـد نیـز در هـر گروه تفاوت آماری معنی داری وجود نداشت. لیکن جنینهایی که به‌مدت ۵ ساعت در دمـای آزمایـشگاه نگهداشـته شـده و سپس در محیطهای HTF و MEM- α کشت شده بودند نـسبت به گروه شاهد در روز پنجم اختلاف آمـاری معنـی داری ($p< 0.05$) داشتند. تکـوین جنینهـایی کـه در محـیط دارای سـلول مغذی کشت شده بودند (شاهد هم کشتی) در هر دو محـیط HEF و MEM– α نسبت به جنینهـایی کـه بـه‌مـدت ۱، ۳ و۵ ساعت در دمای اطاق نگهداشته شـده بودنـد تفـاوت آمـاری معنی دار نداشت و همجنین بین دو محیط هم کـشتی (HEF و MEF) نیز تفاوت آماری معنی داری از نظر میـزان تکـوین در روزهای مختلف وجود نداشت (نمودار ۱). ولی مقایسه میزان تکوین جنینهایی که در گروه MEM- α قرار داشتند نسبت بـه گروه‌های هم کشتی نشان داد که میزان تکوین در گـروه‌هـای هم کشتی بوضوح بالاتر از گروه MEM- α بود و در گـروه ۵ ساعته در روز چهارم نسبت به MEF و در روز پـنجم نـسبت به HEF اختلاف آماری معنی‌دار داشت ($p< 0.05$) (نمـودار ۲). برای روشن تر شدن عملکرد سیـستمهای هـم کـشتی، میـزان تکوین جنین در روزهای چهارم و پنجم در هر یک از گروهها با شاهد خودش مقایسه و تفاوت میزان تکـوین در جـدول ۲ آمده است. بر این اساس گـروه‌هـایی کـه دارای سیـستم هـم کشتی بودند توانسته بودنـد بـه تکـوین بهتـر جنینهـا در روز چهارم و روز پنجم کمک کنند.

**جدول ۱.** مقایسه تکوین جنینهای دوسلولی موش در محیط کشت MEM-α و HTF پس از نگهداری در دمای ازمایشگاه و کشت به‌مدت ۱۲۰ ساعت

| | | | محیط | تعداد | تکوین در روزهای متوالی (ساعت) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ۲۴h | ۴۸h | ۷۲h | ۹۶h | ۱۲۰h |
| | | | | | 4&8 | M | EB&LB | HB | HdB |
| شاهد | | | HTF | ۲۱ | ۱٤(٦٦) | ۱٦(٧٦) | ۱٥(٧۱) | ۱۰(٤٧) | ۱۱(٥۲) |
| | | | MEM | ۲۱ | ۱۷(۸۰) | ۱٦(٧٦) | ۱۳(٦۱) | ۱۳(٦۱) | ۱۱(٥۲) |
| آزمون | مدت نگهداری | ۱ ساعت | HTF | ۲۱ | ۱۸(۸٥) | ۱٦(٧٦) | ۱۲(٥٧) | ۸(۳۸) | ۹(٤۲) |
| | | | MEM | ۲۱ | ۱۹(۹۰) | ۱٥(٧۱) | ۱۲(٥٧) | ۹(٤۲) | ٦(۲۸) |
| | | ۳ ساعت | HTF | ۲۱ | ۱۲(٥٧) | ۱٥(٧۱) | ۱۰(٤٧) | ۷(۳۳) | ۷(۳۳) |
| | | | MEM | ۲۱ | ۱۹(۹۰) | ۱۱(٥۲) | ۷(۳۳) | ٦(۲۸) | ٦(۲۸) |
| | | ٥ ساعت | HTF | ۲۱ | ۱٦(٧٦) | ۱۲(٥٧) | ۹(٤۲) | ٦(۲۸) | ۳(۱٤)* |
| | | | MEM | ۲۱ | ۱٥(٧۱) | ۸(۳۸) | ۸(۳۸) | ٦(۲۸) | ٤(۱۹)* |

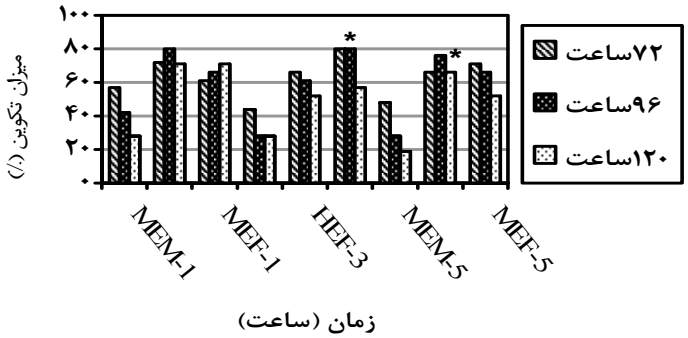
اعداد داخل پرانتز درصد را نشان میدهد. 4&8 = جنینهای ٤ و ۸ سلولی، M = مورولا، EB&LB = بلاستوسیست اولیه و ثانویه، HB = بلاستوسیست در حال خروج از زونا پلوسیدا، HdB = بلاستوسطست خارج شده از زونا پلوسیدا

* $p< 0.05$ نسبت به گروه شاهد هم گروه




**نمودار ۱.** مقایسه روند تکوین جنینها در محیطهای MEF و HEF پس از نگهداری در دمای آزمایشگاه.

HEF0,1,3,5 = جنینهایی که بترتیب بمدت ۰، ۱، ۳ و ٥ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و سپس به محیط دارای فیبروبلاستهای جنینی انسان منتقل شده بودند. MEF0,1,3,5 = جنینهایی که بترتیب بمدت ۰، ۱، ۳ و ٥ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و سپس به محیط دارای فیبروبلاستهای جنینی موش منتقل شده بودند.




**نمودار ۲.**مقایسه میزان تکوین جنینهای ۲-سلولی پس از نگهداری بمدت ۱،۳ و۵ ساعت در دمای آزمایشگاه و سپس کشت در محیط شاهد (MEM- α) و محیطهای دارای سلولهای فیبروبلاست جنینی انسان (HEF) و فیبروبلاست جنینی موش (MEF). ($p<0.05$) نسبت به گروه شاهد.

## بحث

یکی از عواملی که بـه اظهـار محققـین تکـوین جنـین را در آزمایشگاه دستخوش تغییـر مـی‌کنـد تغییـرات دمـا اسـت. در مطالعه حاضر پس از نگهداری جنینهای دو سـلولی مـوش در دمای آزمایشگاه بـه‌مـدت ۱و۳ سـاعت تغییـر معنـی داری در میزان تکوین جنینها رخ نداد و تنهـا پـس از ۵ سـاعت میـزان تکوین کاهش یافت ( جدول ۱و۲ ). در این آزمایشها از بـافر HBSS استفاده شد که به‌دلیـل برخـورداری از سیـستم بـافری فسفات و عدم نیاز به $CO_2$ برای تنظیم pH می‌تواند در مقابل تغییرات pH محیط مقاومت کند. تغییرات pH محیط یکـی از عوامل تاثیر گذار بر کیفیت و میزان تکوین جنین اسـت [۱۹]. مـا در آزمایـشهای تحقیـق حاضـر از دو محـیط MEM –α وHTF استفاده شد. محیط MEM- α محیطـی مرکـب و دارای انواع اسیدهای آمینـه، نوکلئوتیـدها، ویتامینهـا و منـابع انـرژی است در حالی‌که محیط HTF محیط ساده ای اسـت کـه تنهـا یونها، منبع انرژی و عوامل تثبیت کننده pH را دارد و به تقلید از مایع لوله رحم انسان ساخته شده است. مقایـسه اطلاعـات جدول ۱ نشان می‌دهد که این دو محیط توانایی نسبتاً یکسانی در تکوین جنینها در تمام گروه‌های مورد مطالعـه داشـته انـد. ولی باید توجه داشت، هرچند تکوین جنینهایی که به‌مـدت ۱، ۳ یا ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداشته شده و سپس در دو محیط قرار گرفته بودند تفاوت آماری معنی داری نداشـت. لـیکن افـزایش زمـان نگهـداری جنـین در دمـای آزمایـشگاه به‌تدریج موجب کاهش میزان تکـوین جنـین بـه‌خـصوص در روزهـای چهـارم و پـنجم شـده بـود. جنینهـای دو سـلولی خرگوش نیز همانند جنین موش تا ۳ ساعت دمـای محـیط را تحمل کرده و پس از آن کاهش تکوین بـه مرحلـه مـورولا و بلاستوسیت در آنها مشاهده شده بود [۲۰].

اطلاعات اندکی پیرامون تاثیر دمای محیط بر تکوین جنین پستانداران وجود دارد و به‌خـصوص در مـورد جنـین انـسان تاکنون گزارشی منتـشر نـشده اسـت. بـه هرحـال اگـر بتـوان یافته‌های مطالعه حاضر را به جنین انسان تعمیم داد مـی‌تـوان گفت در جریان دستکاریهای آزمایشگاهی کـه معمـولاً مـدت زیادی نیز به‌طول نمی انجامد می‌توان با آسودگی جنـین را در حرارت آزمایشگاه قرارداد و نگران عدم تکوین نبـود. درعـین حال باید هشدار داد کـه نگهـداری طـولانی مـدت دردمـای آزمایشگاه به کاهش تکوین جنینها منجر می‌شـود. ایـن امـردر مورد تخمک انسان بررسـی و نـشان‌داده شـده کـه نگهـداری تخمک انسان در دمـای آزمایـشگاه باعـث بـه هـم ریختگـی دوکهای میوزی می‌شود [۲۱].

استفاده از سیستمهای هـم کـشتی بـا قـراردادن جنـین ۱-

سلولی موش داخل لوله رحم موش در آزمایشگاه و تکوین جنینها به بلاستوسیت به دنیا پیشنهاد شد [۲۲]. نزدیک به ۳۰ سال بعد همین روش برای تکوین جنینها مستر به‌کار گرفته شد [۲۳] و به‌دنبال آن انواع سلولهای مغذی برای هم کشتی جنینهای حیوانات و انسان بکارگرفته شد. سلولهای اپی تلیالی لوله رحم [۲٤]، سلولهای گرانولوزا [۲۵]، سلولهای اندومتر [۲٦] و انواعی از رده‌های سلولی شناخته شده مانندVero [۲۷] و MDBK [۲۸] از این جمله‌اند. حتی اخیراً تاثیر قطبی بودن سلولهای مغذی بر میزان تکوین جنین موش بررسی و گزارش شده که سلولهای قطبی بهتر می‌توانند تکوین جنین موش را هدایت کنند [۱۵]. لیکن تاکنون گزارشات اندکی استفاده از سلولهای فیبروبلاستی را پیشنهاد کرده اند. در آزمایشات جاری ما از سلولهای فیبروبلاست جنینی انسان و موش استفاده کردیم. سلولهای فیبروبلاستی به سهولت در آزمایشگاه قابل تهیه هستند و در محیطهای مختلف و مقدارسرم کم (مشاهدات منتشر نشده ما) رشد می‌کنند. این سلولها قادرند در پاساژهای متوالی قابلیت رشد و تکثیر خود را حفظ کرده و پس از انجماد و ذوب نیز مجدداً به راحتی و سرعت در آزمایشگاه تکثیر شوند. سلولهای فیبروبلاست جنینی فاکتورهای رشد و سیتوکینهای متعددی بداخل محیط کشت رها می‌کنند [۲۹] که برخی از آنها را در تکوین بهتر جنین دخیل دانسته اند [۳۰]. استفاده از سلولهای فیبروبلاستی برای هم کشتی با جنینهای دو سلولی موش آثار مثبت روشنی به‌دنبال داشت. جنینهای گروه شاهد هم کشتی (که در معرض دمای آزمایشگاه قرار نگرفته بودند) نسبت به جنینهایی که فقط در محیط MEM- α قرار داشتند میزان تکوین بالاتری نشان دادند و با گذشت زمان (روزهای چهارم و پنجم) اختلاف بین دو گروه بیشتر شد (نمودار۲). بین فیبروبلاستهای انسانی و موشی تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر افزایش توان تکوینی جنینها وجود نداشت و هردوسیستم توانسته بودند به تکوین جنینهای دو سلولی موش کمک کنند. به‌علاوه سلولهای فیبربلاست توانسته بودند آثار زیانبار ناشی از نگهداری جنین در دمای آزمایشگاه را به حداقل رسانیده و به تکوین بهتر جنینها کمک کنند. جدول شماره ۲ نشان می‌دهد جنینهایی که در گروه شاهد بوده اند پس از نگهداری بمدت ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه نسبت به آنهایی که در دمای آزمایشگاه قرار نگرفته بودند در روزهای چهارم و پنجم به ترتیب ۵۵ و٦٤ درصد کاهش تکوین داشته‌اند. در حالی‌که جنینهای گروه هم کشتی با سلولهای فیبروبلاست جنینی موش در روزهای چهارم و پنجم بترتیب ۱۰ و ۱۵ درصد وجنینهای گروه هم کشتی با سلولهای فیبروبلاست جنینی انسان به‌ترتیب در روزهای چهارم و پنجم ۱۱ و ۱۸ درصد کاهش تکوین داشتند. بدین ترتیب می‌توان گفت سیستمهای هم کشتی استفاده شده در پروژه حاضر به تکوین بهتر جنین کمک کرده‌اند و این امر بخصوص زمانی‌که جنین در معرض استرس ناشی از کاهش دمای محیط (شرایط نامساعد) قرار گرفته بود به‌وضوح مشاهده شد. برای توضیح آثار مثبت سیستمهای هم کشتی دو نظریه مطرح است: پالایش مثبت[1] و پالایش منفی[2]. در نظریه پالایش مثبت پیشنهاد شده است که سلولهای مغذی با ترشح فاکتورهای مفید برای جنین به رشد و تکوین جنین کمک می‌کنند [۳۱ و ۳۲]. در نظریه پالایش منفی پیشنهاد شده که سلولهای مغذی با جذب و یا تبدیل فاکتورهای مضر برای جنین مانند آنیونهای سوپراکسید، آب اکسیژنه، فلزات سنگین و ... شرایط را برای تکوین مناسب ترجنین فراهم می‌کنند [۳۳]. پذیرش هر دونظریه نیز بدون اشکال است. بدین معنی که سلولهای مغذی از یک سو فاکتورهای جنین دوست (embryo trophic) ترشح می‌کنند و از سوی دیگر فاکتورهای جنین دوست را از اطراف جنین دور

1-Positive conditioning
2-Negative conditioning

می‌کنند و بدین ترتیب شرایط تکوین مناسب تر جنین را فراهم می‌کنند [۳٤]. در آزمایشهای مطالعه حاضر که عملاً شرایط رشد و تکوین جنین بدنبال قرارگرفتن در دمای محیط نامناسب شده بود مشاهده شد(نمودار ۱) که میزان تکوین جنینها با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری ندارد و می‌توان گفت که سلولهای فیبروبلاست انسانی و موشی هردوتوانسته‌اند بر فاکتورهای امبریوتوکسیک که بدنبال نگهداری جنین در دمای آزمایشگاه بوجود آمده بودند غلبه کنند و به بیان دیگر نتایج این تحقیق تائیدی است بر نظریه پالایش منفی توسط سلولهای مغذی.

بکارگیری سیستمهای هم کشتی مخالفینی نیز دارد. مخالفین معتقدند که سیستمهای هم کشتی نیاز به تجربه و آزمایشگاه کشت سلولی مجهزدارد وآماده سازی مداوم سلولها نیز کاری وقت گیر و پر هزینه است. از طرفی سلولهای مغذی بیگانه ممکن است با دخالت در ژنتیک جنین، پروتئینهای جدیدی سنتز و تولید کنند که آثار جایگزینی این قبیل ژنها بعدها معلوم خواهد شد. بعلاوه انتخاب محیط مناسبی که هم برای رشد سلولها کارساز باشد و هم مانع تکوین جنین نشود نیز اهمیت دارد. در پروژه حاضر، ما از محیط MEM-α استفاده کردیم. این محیط در پاره ای از مطالعات جنین شناسی استفاده شده [۳۵ و ۳٦] و مطالعات قبلی نویسندگان حاضر [۳۷] نیز حاکی از قابلیت این محیط در تکوین جنین ۲-سلولی موش است. از طرفی این محیط به خوبی قادر است رشد و تکثیر فیبروبلاستهای جنینی موش و انسان را در آزمایشگاه به انجام برساند. استفاده از فیبروبلاستهای انسانی به منظور بررسی توان این سلولها در حمایت از جنین دو سلولی موش بود. با این احتمال که بتوان از این سلولها بدون نگرانی از انتقال پروتئین و ژنها ی غریبه و ناسازگار، برای افزایش وبهبود کیفیت جنین انسان نیز استفاده کرد. ولی به هرحال نمی توان از نظر دور داشت که استفاده از سیستمهای هم کشتی چندان متداول نیست و نیاز به تجربه و دانش فنی دارد ولی از سویی افزایش کیفیت جنین که از اهداف ART است ما را وا می‌دارد که در مورد استفاده از این قبیل سلولها درART جدی تر اندیشه کنیم. برخی مطالعات نشان‌داده در افرادی که چند سیکل IVF نا موفق داشته اند یا سن مادر بالا بوده است با استفاده از سیستم هم کشتی میزان لانه‌گزینی جنین و تولد نوزادان افزایش یافته است [۳۸ و ۳۹]. البته پاره ای گزارشها نیز نشاندهنده بی تاثیربودن سیستمهای هم کشتی بوده است [٤۰] که این امر دقت بیشتر در بکارگیری سلولهای مغذی را می‌طلبد.

در یک جمع بندی و به‌عنوان نتیجه گیری می‌توان گفت که اولاً نگهداری کوتاه مدت جنین دو سلولی موش در دمای آزمایشگاه تاثیر منفی بارزی بر تکوین بعدی جنین ندارد و ثانیا فیبروبلاستهای جنین انسان همچون فیبروبلاستهای جنین موش به خوبی قادرند تکوین جنین را تا مرحله خروج اززونا پلوسیدا حمایت کنند و در شرایط نامساعد میزان این حمایت واضح تر است. آزمایشهای تکمیلی روی جنینهای اضافی که در سیکلهای درمانی IVF به‌دست می‌آید (پس از اخذ مجوز از والدین) و بررسی کیفیت این جنینها که با سلولهای فیبروبلاست هم کشت شوند ما را قادر خواهد ساخت در مورد استفاده از سلولهای مغذی برای تکوین مناسب تر جنین انسان با اطمینان بیشتر اظهار نظر و تصمیم‌گیری کنیم.

## تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۸۱/۹ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان است. بخشی ازعملیات اجرایی این پروژه تحقیقاتی در مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان و قسمتی در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده پزشکی افضلی پور کرمان انجام شده است که بدینوسیله از همکاری مسئولین مربوط قدردانی می‌شود.

## References


1. **Mahadevan MM, Miller MM.** Deleterious effect of equilibration temperature on the toxicity of propanediol during cryopreservation of mouse zygotes. J Assist Reprod Genet 1997;14(1):51-4.
2. **Schumacher A, Fischer B.** Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. J Reprod Fertil 1988;84(1):197-204.
3. **Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J.** transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. Fertility sterility 1990; 54:102-8.
4. **Hegele-Hartung C SA, Fischer B.** Effects of visible light and room temperature on the ultrastructure of preimplantation rabbit embryos: a time course study. Anat Embryol 1991; 183:559-71.
5. **Azambuja R KD, Westhusin M.** Effects of low temperatures on in vitro produced bovine zygotes. Molecular Reprodand Dev 1997; 47:435-9.
6. **Rivera RM, Hansen PJ.** Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. Reproduction 2001; 121(1):107-15.
7. **Pribenszky C MM, Cseh S, Solti L.** Survival of mouse blastocysts after low temperature preservation under high pressure. Acta Vet Hung 2004; 52(4):479-87.
8. **Zhu B WS, Oakey H, Setchell B, Maddocks S.** Effect of paternal heat stress on the development in vitro of preimplantation embryos in the mouse. Andrologia 2004; 36(6):384-94.
9. **Arechiga CF, Hansen PJ.** Response of preimplantation murine embryos to heat shock as modified by developmental stage and glutathione status. In Vitro Cell Dev Biol Anim 1998; 34(8):655-9.
10. **Gardner DK.** Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. J Reprod Fertil Suppl 1999; 54:461-75.
11. **Scot LF,, Smith S.** the relevance and use of miuse embryos bioassays for quality control in an assisted reproductive technology program. Fertil Steril 1993; 60:559-68.
12. **Nematollahi N, Valojerdi MR.** Effect of Vero cell coculture on the development of frozen-thawed two-cell mouse embryos. J Assist Reprod Genet 1999; 16(7):380-4.
13. **Khatir H, Anouassi A, Tibary A.** In Vitro and in vivo developmental competence of dromedary (Camelus dromedarius) embryos produced in vitro using two culture systems (mKSOMaa and oviductal cells). Reprod Domest Anim 2005; 40(3):245-9.
14. **Taniguchi F, Harada T, Nara M, Deura I, Mitsunari M, Terakawa N.** Coculture with a human granulosa cell line enhanced the development of murine preimplantation embryos via SCF/c-kit system. J Assist Reprod Genet 2004; 21(6):223-8.
15. **Baghaban Eslami Nejad MR, Rezazadeh**

**Valojerdi M, Kazemi Ashtiani S.** A comparison of polarized and non-polarized human endometrial monolayer culture systems on murine embryo development. J Exp Clin Assist Reprod 2005; 2(1):7.

16. **Goldberg JM, Khalifa EA, Friedman CI, Kim MH.** Improvement of in vitro fertilization and early embryo development in mice by coculture with human fallopian tube epithelium. Am J Obstet Gynecol 1991; 165:1802-5.
17. **Bavister BD.** Co-culture for embryo development: is it really necessary? Hum Reprod 1992; 7(10):1339-41.
18. **Quinn P, Kerin JF, Warnes GM.** Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril 1985; 44(4):493-8.
19. **Edwards LE WD, Gardner DK.** Intracellular pH of the pre-implantation mouse embryo: Effect of extracellular pH and eeak acids. Mol Reprod Dev 1998; 50:434-42.
20. **Fischer B, Schumacher A, Hegele-Hartung C, Beier HM.** Potential risk of light and room temperature exposure to preimplantation embryos. Fertil Steril 1988; 50(6):938-44.
21. **Zhao y BJ.** Biocarbonatechloride exchange and intracellular pH throughout preimplantation mouse embryo development. Am J Physiol 1996; 271:1512 .
22. **Biggers JD GR, Brinster RL.** Development of mouse embryo in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. Nature 1962; 194:747.
23. **Minami N BB, Iritani A.** Development of hamster 2-cell embryos in the isolated mouse oviduct organ culture system. Gamete Res 1988; 19:235.
24. **Bongso A FC, Ng SC, Rntnam SS.** Human embryonic behaviour in a sequential human oviduct- endometrial coculture system. Fertil Steril 1994b; 61:976-80.
25. **Plachot M AJ, Alvarez S, Firmin C.** granulosa cells improve human embryo development in vitro. Hum Reprod 1993; 8:2133-40.
26. **Jayot S, Parneix I, Verdaguer S, Discamps G, Audebert A, Emperaire JC.** Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. Fertil Steril 1995; 63:109-14.
27. **Menezo YJ, Sakkas D, Janny L.** Co-culture of the early human embryo: factors affecting human blastocyst formation in vitro. Microsc Res Tech 1995; 32(1):50-6.
28. **Leppens G, Gardner DK, Sakkas D.** Co-culture of 1-cell outbred mouse embryos on bovine kidney epithelial cells: effect on development, glycolytic activity, inner cell mass:trophectoderm ratios and viability. Hum Reprod 1996; 11(3):598-603.
29. **Fritsch C, Simon-Assmann P, Kedinger M, Evans GS.** Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine. Gastroenterology 1997; 112(3):826-38.
30. **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 ocytes. Theriogenology 2006; 66(5): 1083-90.

31. **Liu LP, Chan ST, Ho PC, Yeung WS.** Partial purification of embryotrophic factors from human oviductal cells. Hum Reprod 1998; 13(6):1613-9.
32. **Liu LP, Chan ST, Ho PC, Yeung WS.** Human oviductal cells produce high molecular weight factor(s) that improves the development of mouse embryo. Hum Reprod 1995; 10(10):2781-6.
33. **Urman B, Balaban B.** Is there still a place for co-cultures in the era of sequential media? Reprod Biomed Online 2005; 10(4):492-6.
34. **Joo BS, Kim MK, Na YJ, Moon HS, Lee KS, Kim HD.** The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. Fertil Steril 2001; 75(1):193-9.
35. **Noda y, Goto Y, Umaoka Y, Shiotani M, Nakayama T, Mori T.** Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. Fertil Steril 1994; 62(5):2022-7.
36. **WUN WS, Wun CC, Grunert GM.** Minimum essential medium alpha (MEM) enhances assisted reproductive technology results. I. Mouse embryo study. J Assist Reprod Genet 1994; 11(6):303-7.
37. **Nematollahi N, Saito H, Rezazadeh M, Hiroi M.** Vitrification of mouse cleaved embryos and oocytes with ethylene glycol and trehalose. Mid East Fertil Soc 1997; 3(suppl 1):50.
38. **Wiemer KE, Garrisi J, Steuerwald N,.** Beneficial aspects of co-culture with assisted hatching when applied to multiple-failure in-vitro fertilization patients. Hum Reprod 1996; 11(11):2429-33.
39. **Wiemer KE, Cohen J, Tucker MJ, Godke RA.** The application of co-culture in assisted reproduction: 10 years of experience with human embryos. Hum Reprod 1998; 13 Suppl 4:226-38.
40. **Wetzels AM, Bastiaans BA, Hendriks JC, Goverde HJ, Punt-Van der Zalm AP, et al.** The effects of co-culture with human fibroblasts on human embryo development in vitro and implantation. Hum Reprod 1998; 13(5):1325-30