Original Article

The Effect of Granulosa Cells Co-culture and Retinoic Acid on Maturation and Development of Immature Mouse Oocytes In Vitro

Eimani H., Ph.D. *, Tahaei L S., M.Sc., Parivar K., Ph.D. , M. Rezazadeh, Ph.D., Kazemi S., Ph.D., Shahverdi A., Ph. D, Eftekhari P., Ph. D., Baharvand H., Ph.D.

** P.O.Box: 19395 – 4644, Embryology Department, Royan Institute, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: The purpose of this study was to develop an appropriate medium for in vitro maturation (IVM) of immature mouse oocytes.

Materials and Methods: Germinal vesicle of female NMRI mouse oocytes (6-8 weeks old) were collected from ovaries and cultured in maturation medium MEM-α, supplemented with: 100 mlIU/ml rFSH + 7.5 IU/ml hCG + 5% FCS (Control group) and 2 μM all- trans retinoic acid (t-RA) in presence or absent of granulose cells. Ethanol (Sham group) 0.2% (v/v) used as solvent. After 24 hours the matured oocytes were fertilized with spermatozoa in T6 medium and cultured for 5 days. Cultured immature oocytes development to the morula and blastocyst stages was studied.

Results: The retinoic acid supported progression and resumption of meiosis and also increased advancing the oocytes to Metaphase II, formation of morula and blastocyst compared to control group. When there were not 2 μM t-RA and granulose cells in IVM medium, significantly lower maturation rates were observed, followed by a decrease in the percentage of embryos reaching the blastocyst stage. Whereas, when 2 μM t- RA and granulose cells monolayer were present in the IVM medium, better results in comparison with control group were obtained.

Conclusion: Results attest that co-culture of granulose cells with 2 μM all-trance retinoic acid during in vitro maturation enhanced mouse oocytes maturation and improved embryonic development.

Key words: Granulose cells, Retinoic acid, In vitro maturation, Mouse, Oocytes

مقاله تحقیقی

تأثیر هم کشتی سلولهای گرانولوزا و رتینوئیک اسید بر بلوغ و تکوین تخمکهای نارس موش در محیط آزمایشگاه

حسین ایمانی .Ph.D *و ، لیلا السادات طاهایی .M.Sc*و***، کاظم پریور.Ph.D***، مجتبی رضا زاده .Ph.D*، سعید کاظمی آشتیانی .Ph.D*، عبدالحسین شاهوردی .M.Sc*، پوپک افتخاری .Ph.D *، حسین بهاروند .Ph.D ******

*گروه جنین شناسی پژوهشکده رویان

**گروه آنا تومی دانشکده پزشکی دانشگاه بقیه الله

***گروه زیست شناسی جانوری ، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی پونک

****گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: اردیبهشت‌ماه ۸۶ ، تاریخ پذیرش: تیرماه ۸۶

چکیده

هدف: بهبود محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی (IVM) تخمکهای نارس با هم کشتی سلولهای گرانولوزا و رتینوئیک اسید

مواد و روشها: تحقیق حاضر به روش تجربی انجام شد. تخمکهای نابالغ ازتخمدانهای موشهای مادهٔ نژاد NMRI در سن ۸-٦ هفتگی از تخمدانها جمع آوری شدند و در محیط بلوغ (Eagle MEM-α 's Minimum Essential Medium; MEM- α) حاوی ۱۰۰ میلی IU در میلی لیترrFSH (recombinant Follicle Stimulating Hormone)، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG (human Chorionic Gonadotropin) ، ۵ درصدFCS (Fetal Calf Serum)، ۲ میکرومولار رتینوئیک اسید همه ترانس (t- RA: All- trans Retinoic Acid) و سلولهای گرانولوزا کشت شدند. اتانل ۰/۲ درصد (گروه شم) به عنوان حلال انتخاب شد. پس از گذشت ۲٤ ساعت، تخمکهایی که بلوغ یافته بودند، در محیط T6 با اسپرم لقاح یافتند و برای مدت ۵ روز کشت داده شدند. سپس تکوین آنها به مراحل مورولا و بلاستوسیست مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: رتینوئیک اسید پیشرفت و از سرگیری میوز را حمایت می کند و بلوغ تخمک، تشکیل مورولا و بلاستوسیست را نسبت به گروه کنترل افزایش می دهد. زمانی که ۲ میکرو مولار t- RA و سلولهای گرانولوزا در محیط کشت IVM حضور نداشتند از لحاظ آماری میزان بلوغ کمتری مشاهده شد و در پی آن درصد جنینهایی که به مرحلهٔ بلاستوسیست رسیدند کاهش پیدا کردند. در حالی که، با حضور ۲میکرو مولارt- RA و سلولهای گرانولوزا در محیط کشت IVM (In-Vitro Maturation) نتایج بهتری در مقایسه با گروه کنترل به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان می دهد، هم کشتی سلولهای گرانولوزا همراه با ۲ میکرومولار رتینوئیک اسید طی بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش، سبب افزایش بلوغ و بهبود تکوین جنینهای حاصل از آنها می شود.

کلید واژه‌ها: سلولهای گرانولوزا، رتینوئیک اسید، بلوغ آزمایشگاهی، موش، تخمک نارس

آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی، صندوق پستی: ٤٦٤٤-١٩٣٩٥

Email: info@RoyanInstitute .org

مقدمه

در موارد سخت بالینی، مانند بیماران سندرم پلی کیستیک (PCO: Polycystic Ovarian Syndrome) یا پاسخ دهندگان ضعیف که واکنششان به تحریک تخمدانی بسیار ضعیف است، استفاده از تکنولوژیهای تولید مثلی که مستلزم افزایش تحریک تخمدانی یا جمع آوری تخمکهای نابالغ و بلوغ آنها در آزمایشگاه است، سبب اختلال در مراحل بلوغ و منجر به تخمکهایی با کیفیت پایین می شود [۱و ۲] . بنا براین به کارگیری روشهای بلوغ آزمایشگاهی که قابلیت تخمکها را برای لقاح و رویان زایی حفظ کند لازم است [۳]. تعدادی از مطالعات انجام شده حکایت از تأثیر مفید هم کشتی سلولهای سوماتیکی تک لایه ای، بر بلوغ تخمک و تکوین جنینهای پستانداران در آزمایشگاه دارد [٤ و ٥] و باعث برداشت مواد سیتوتوکسیکی از محیطهای کشت به وسیلهٔ این سلولها می شود. از دیگر مزایای سیستم هم کشتی ثابت کردن یا تغییر شرایط فیزیکو شیمیایی محیط کشت همچون pH محیط یا غلظت اکسیژن و دی اکسید کربن است. [٦و ٧] سلولهای سوماتیکی مورد استفاده در هم کشتی، سلولهای اویداکتی، سلولهای رحمی، سلولهای اپیتلیال کبدی میمون سبز آفریقایی (Vero cell) [٥] و سلولهای گرانولوزا است [٨]. این مطالعه در جستجوی روشی برای بهبود بلوغ آزمایشگاهی (IVM) در مدل موشی است. بنابراین تأثیرات هم کشتی با گرانولوزا در بلوغ میوزی بر تخمکهای برهنه بررسی می شود و اصلاحاتی در محیط کشت برای افزایش (IVM) صورت می گیرد مانند استفاده از رتینوئیدها. رتینوئیدها خانواده بزرگی از ترکیبات طبیعی و ترکیبی خویشاوند با ویتامین A (All-trans Retinol) هستند [٩] که به عنوان تنظیم کنندگان مهم رشد و نمو مهره داران ، تمایز سلولی و عملکرد بافت شناخته شده اند [١٠]. نوع همه ترانس، از جمله مهمترین رتینوئیدها در تشکیل جنین مهره داران است. از آنجایی که RA روی سلولها برای تشکیل یا تغییر الگوی فعالیت ژن عمل می کند، می تواند بلوغ سیتوپلاسمی و ظرفیت تخمک را برای پیشرفت در رشد و نمو تحت تأثیر قرار دهد [١١]. افزودن ٥ نانو مولار ٩ سیس رتینوئیک اسید در هنگام پیش بلوغ کمپلکس های تخمک – کومولوس گاوی (COC)[1] در حضور روسکویتین بلوغ سیتوپلاسمی را بهبود می بخشد [٩]. از طرف دیگر سلولهای کومولوس گاوی گیرنده های رتینوئید فعال درون زاد دارند و بنابراین ممکن است قادر به سنتز رتینوئیک اسید به وسیله پیش ساز رتینول باشند [١٢]. بر اساس این مطالعه و مطالعات قبلی [١٣] ، فرض بر این است که سلولهای گرانولوزا ممکن است هدفهایی برای رتینوئیک اسید افزوده شده در هنگام بلوغ تخمک نارس در آزمایشگاه باشد. پس در این مطالعه با به کارگیری همزمان هم کشتی سلولهای گرانولوزا و رتینوئیک اسید درصد اصلاح محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی و میزان بلوغ تخمک نارس و رشد ونمو جنین حاصل بررسی شد.

مواد و روشها

نحوهٔ تهیهٔ مونولایر از سلولهای گرانولوزا

موشهای سوری نژاد NMRI به وزن تقریبی ۳۰ـ۲۵ گرم برای مطالعه، تحریک تخمک‌گذاری و تهیه کمپلکسهای تخمک – کومولوس انتخاب شدند. برای تحریک تخمک‌گذاری PMSG ٧/٥ IU به طریق تزریق درون صفاقی (ip: intraperiteneal) و ٤٨ ساعت بعد نیز به همان روش ٧/٥ IU hCGتزریق شد. ١٦ـ١٤ ساعت بعد، لوله‌های اویداکت به طریق استریل جدا و پس از تشریح ، تخمکها همراه با سلولهای کومولوسی جدا شدند. سپس کمپلکسهای تخمک – کومولوس درون ظروف کشت چهارول حاوی محیط کشت

1. Cumulus-Oocyte Complex

DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM; DMEM F12) قرار داده شدند. پس از گذشت ۳ تا ٤ روز محیط کشت تعویض شد و سلولهای مرده و آنهایی که قادر به چسبیدن به کف چهارول نبودند دفع و سپس محیط تازه اضافه شد. این روند تا رسیدن به مرحلهٔ تشکیل یک بسترهٔ سلولی تک لایه ادامه یافت. سپس محیط کشت قبلی حذف و محیط کشت بلوغ حاوی ۱۰۰ میلی IU در میلی لیترrFSH ، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG ، ۵ درصد FCS، رتینوئیک اسید همه ترانس در دوز ۲ میکرومولار و اتانل مطلق (گروه شم) به عنوان حلال در دوز ۰/۲ درصد(حجمی/ حجمی) به این بسترهٔ مونولایری اضافه شدند.

جداسازی تخمکهای GV نابالغ در موش

در این تحقیق از موشهای ماده نژاد NMRI در سن ٦ تا ۸ هفته‌ای تهیه شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد. موشها به روش جابه‌جایی مهره های گردنی کشته شده و تخمدان آنها در شرایط حتی المقدور استریل از بدن خارج و پس ازانتقال به درون قطرات ۱۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM-α (Sigma, M-0644) حاوی ۵ درصد FCS (Gibco, 10270-106)، چربیهای اضافی اطراف تخمدان حذف و سپس به درون قطرات ۱۳۰ میکرولیتری انتقال داده شد. تخمکهای نارس حاوی ژرمینال وزیکول همراه با سلولهای گرانولوزا جدا شده و سپس با روش پیپت‌کردن سلولهای گرانولوزای اطراف آنها برداشته شدند. با استفاده از لنز مدرج در زیر میکروسکوپ معکوس تخمکهای نارس با اندازهٔ تقریبی ٦۰-٦۵ میکرون و سیتوپلاسم روشن، قشر شفاف (ZP: Zona Pelucida) یکنواخت با فضای پیش زرده‌ای (Pervettline) مناسب به مونولایرهای گرانولوزا حاوی محیط کشت بلوغ مطابق گروههای زیراضافه شدند.

طراحی گروهها

تخمکهای GV نابالغ جمع آوری شده از چندین ماده به طور تصادفی به گروههای آزمایشی اختصاص داده شدند. حد اقل۱۱ تکرار جمع آوری تخمکها ی GV و کشت آنها برای هر گروه انجام شدند.

گروه کنترل ۱: ۵۰۰ تخمک نارس از موشهای طبیعی گرفته و در محیط MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی IU در میلی لیترrFSH ، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG و ۵ درصدFCS ، قرار داده شد.

گروه کنترل۲: ٤۵۱ تخمک نارس در محیط بلوغ MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی IU در میلی لیترrFSH ، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG ، ۵ درصدFCS و تک لایه ای از سلولهای گرانولوزا قرار داده شد.

گروه شم : ۵۲۰ تخمک نارس در محیط بلوغ MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی IU در میلی لیترrFSH ، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG ، ۵ درصدFCS و ۰/۲ درصد (حجمی/ حجمی) اتانل مطلق قرار داده شد.

گروه آزمون ۱: ۵۳٤ تخمک نارس در محیط بلوغ MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی IU در میلی لیترrFSH ، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG ، ۵ درصدFCS و ۲ میکرومولار رتینوئیک اسید همه ترانس قرار داده شد.

گروه آزمون ۲: ٤٤٤ تخمک نارس در محیط بلوغ MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی IU در میلی لیترrFSH ، ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG ، ۵ درصدFCS ، ۲ میکرومولار رتینوئیک اسید همه ترانس و تک لایه ای از سلولهای گرانولوزا قرار داده شد. رتینوئیک اسید همه ترانس در اتانل ۰/۲ درصد (حجمی/ حجمی) حل و درون اپندورف پوشیده با کاغذ آلومینیوم در دمای۲۰ – درجه سانتی گراد درون فریزر نگهداری شد. سپس به کمک محیط کشت MEM-α غلظت ۲ میکرو مولار تهیه و استفاده شد. قابل ذکر است طول عمر نگهداری رتینوئیک اسید در شرایط فعلی یک ماه است. رتینوئیک اسید تنها در مرحلهٔ بلوغ تخمک اعمال شد و تخمکهای هر گروه به مدت ٢٤ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO2 ۵ درصد قرار داده شدند. سپس با میکروسکوپ معکوس،

مراحل بلوغ آزمایشگاهی و ازسرگیری میوز در تمام گروهها بررسی شد. تخمکهای بدون تغییرشکل در هسته را به عنوان GV (Germinal Vesicle)، تخمکهای با هسته شکسته شده و نشانهٔ شروع تقسیم میوز به عنوانGVBD (Germinal Vesicle Break down) و تخمکهای بالغ به عنوان MII شناسایی شد.

لقاح و تکوین تخمکهای بالغ شده

ابتدا موشهای نژاد NMRI به روش جا به‌جایی مهره های گردنی کشته شدند، دم اپیدیدیم آنها جدا و به قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت T6 حاوی ۱۵ میکروگرم سرم آلبومین گاوی (BSA: Bovine Serum Albumin) درهر میلی‌لیتر منتقل شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO_2 ۵ درصد انکوبه شد. با انتقال اسپرمهای فعال و سالم از کناره قطره (در هر میلی‌لیتر ۱۰۶×۲ـ۱ عدد اسپرم) به داخل قطرات T6حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA، تخمکهای بالغ شده نیز به آنها منتقل شد. پس از گذشت ٦ـ٤ ساعت اسپرمها از اطراف تخمکها شستشو شدند. زایگوتهای تشکیل شده از محیط فعلی به قطرات محیط T6 حاوی ٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA منتقل شدند. وضعیت جنینها پس از ٢٤ ، ٤٨، ٧٢ ، ٩٦ و۱۲۰ساعت به وسیله میکروسکوپ معکوس برای ثبت مراحل تکوین جنین مشاهده و جنینهای دژنره از محیط خارج شدند. به همین ترتیب جنینهای متوقف شده، به قطرات دیگر منتقل شدند و جنینهای سالم تا رسیدن به مرحلهٔ بلاستوسیست در محیط خود باقی گذاشته شدند.

آزمون آماری

با توجه به اینکه در این مطالعه متغیرها کیفی بودند و ملاک تعداد کل سلولها بود، برای بررسی ارتباط بین گروهها از برنامهٔ SPSS و با روش آماری Chi-Square استفاده شد، اختلاف با $p < 0/05$ به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

با بررسیهای انجام شده روی گروههای کنترل ۱، کنترل ۲، شم، آزمون ۱و آزمون ۲ نتایج زیر حاصل شد. درصد تخمکهای باقیمانده در مرحلهٔ GV در گروه کنترل ۱، کنترل ۲، شم و گروههای آزمون به ترتیب ۲۳/٦، ۱۵/۲۹، ۲۵/۳۸، ۹/۷۳ و ۵/۸۵ بود که نشان داد، درصد تخمکهای باقیمانده در مرحلهٔGV درگروه ۲ میکرومولار رتینوئیک اسید با هم کشتی سلولهای گرانولوزا نسبت به سایر گروهها کمتر است. درنرخ تخمکهای باقیمانده در مرحلهٔ GV درگروه کنترل ۲ نسبت به گروه کنترل ۱ کاهش معنی داری مشاهده شد ($p<0.001$). همچنین در گروه آزمون ۲ نسبت به گروه آزمون ۱($p<0.05$) و گروه آزمون ۲ نسبت به گروههای (کنترل ۱، کنترل ۲ و شم) کاهش معنی داری مشاهده شد ($p<0.0001$) . درصد ازسرگیری میوز در گروه کنترل ۱و۲، شم و دو گروه آزمون به ترتیب ٧٦/٤ ، ٨٤/٧٠ ، ٧٤/٦١، ٩٠/٢٦، ٩٤/١٤ و بلوغ تخمک ٦٠/٨، ٦٥/١٨، ٦٠، ٧٨/٢٧ و ٨٠/١٨ بود. نرخ از سرگیری میوز در گروه آزمون ۲ نسبت به گروه آزمون ۱ افزایش معنی داری نشان داد ($p<0.05$). همچنین نرخ از سرگیری میوز در گروههای آزمون ۱ و ۲ نسبت به گروههای کنترل (۱،۲) و گروه شم افزایش معنی داری را نشان داد ($p<0.0001$). نرخ بلوغ تخمک در گروههای آزمون ۱ و ۲ نسبت به گروههای کنترل (۱و۲) و شم افزایش معنی‌داری داشت ($p<0.0001$). مقایسهٔ نتایج به دست آمده از لقاح و تکوین جنینهای حاصل از تخمکها در ۵ گروه نشان داد که نسبت جنینهای رسیده به مرحلهٔ ۲ سلولی ٢٤ ساعته در گروه آزمون ۲ نسبت به گروه کنترل ۲ ($p<0.01$) و نسبت به گروه کنترل ۱ ($p<0.001$) و نسبت به گروه شم ($p<0.0001$) افزایش

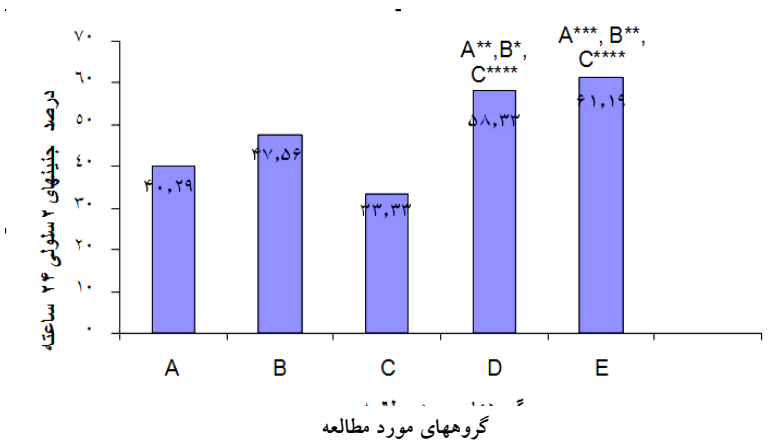
معنی داری داشت. جنینهایی که به مرحلهٔ مورولا رسیده بودند در ۱۲۰ ساعت پس از لقاح در گروه آزمون ۲ نسبت به گروه آزمون ۱ و گروه شم، همچنین در گروه آزمون ۱ نسبت به گروه کنترل ۲ افزایش معنی داری مشاهده شد ($p<0.05$). جنینهایی که به مرحلهٔ بلاستوسیست رسیده بودند در ۱۲۰ ساعت پس از لقاح در گروه آزمون ۲ نسبت به گروه کنترل ۱ ($p<0.001$) ، نسبت به گروه کنترل ۲ ($p<0.05$) و نسبت به گروه شم ($p<0.0001$) افزایش معنی داری را نشان داد (به شکل ۱، جدول ۱ و نمودارهای ۱ و ۲ مراجعه شود).

جدول۱. مقایسهٔ بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای نارس موش درمحیط بلوغ MEM-α حاوی ۱۰۰ میلی IU در میلی لیترrFSH و ۷/۵ IU در میلی‌لیتر hCG و ۵ درصدFCS در گروههای مختلف

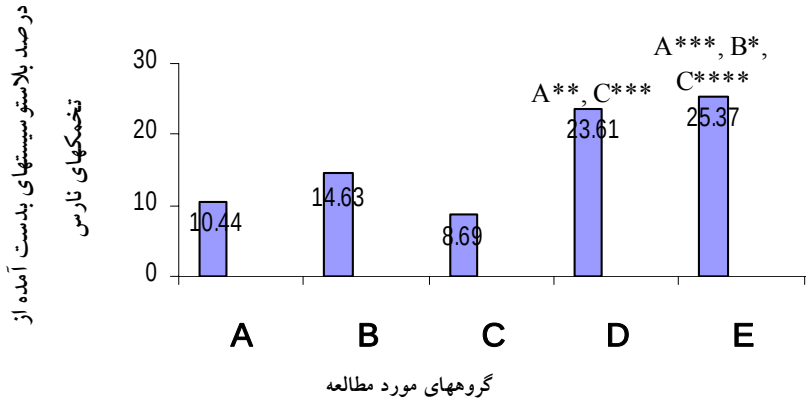
روند / بلوغ	تعداد تخمک نارس	دوز مصرفی (حلال) اتانل درصد (حجمی / حجمی)	دوز مصرفی رتینوئیک اسید میکرومولار	۲۴ ساعت پس از کشت			
				GV (٪)	GVBD (٪)	MII (٪)	GVBD+ MII (٪)
کنترل ۱	۵۰۰	۰	۰	d***۱۱۸ (۲۳/۶)	۷۸ (۱۵/۶)	۳۰۴ (۶۰/۸)	d***۳۸۲ (۷۶/۴)
کنترل ۲ (هم کشتی با گرانولوزا)	۴۵۱	۰	۰	۶۹ (۱۵/۲۹)	۸۸ (۱۹/۵۱)	۲۹۴ (۶۵/۱۸)	۳۸۲ (۸۴/۷۰)
شم	۵۲۰	۰/۲	۰	b****۱۳۲ (۲۵/۳۸)	b*۷۶ (۱۴/۶۱)	۳۱۲ (۶۰)	b****۳۸۸ (۷۴/۶۱)
آزمون ۱	۵۳۴	۰/۲	۲	c*, b**۵۲ (۹/۷۳)	a*, b***۶۴ (۱۱/۹۸)	(a, b)****۴۱۸ (۷۸/۲۷)	(a, b)****۴۸۲ (۹۰/۲۶)
آزمون ۲ (هم کشتی با گرانولوزا)	۴۴۴	۰/۲	۲	(a,b)***۲۶ (۵/۵۸)	b*۶۲ (۱۳/۹۶)	(a, b)****۳۵۶ (۸۰/۱۸)	(a, b)****۴۱۸ (۹۴/۱۴)

GV: حباب زاینده (تخمک نارس هسته دار) ، GVBD: حباب زایندهٔ خورد شده، MII: تخمک در مرحلهٔ متافاز II، GVBD + MII: از سرگیری میوز، اختلاف با گروه کنترل ۱ معنی دار است= a ، اختلاف با گروه کنترل ۲ معنی دار است = b ، اختلاف بین گروه آزمون ۱ با ۲ معنی دار است = c ،اختلاف بین گروه کنترل ۱ با ۲ معنی دار است= d

*: P<0/05, **: P<0/01, ***: P<0/001, ****: P<0/0001



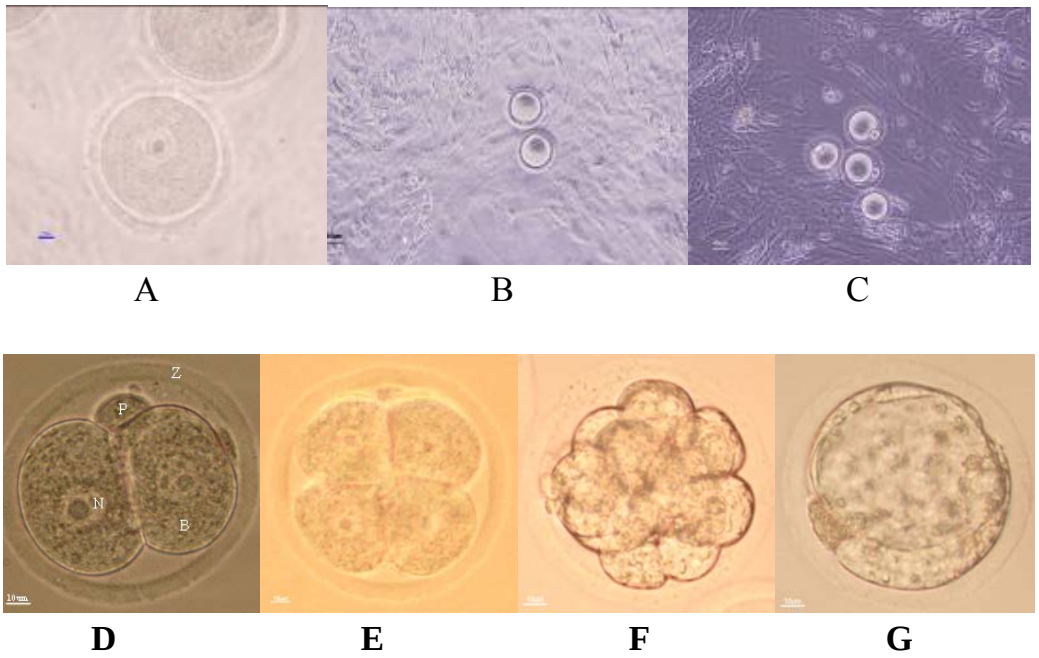
نمودار۱. مقایسهٔ درصد تشکیل جنینهای دو سلولی در گروههای مورد مطالعه. A : گروه کنترل ۱، B : گروه کنترل ۲ (محیط بلوغ با همکشتی سلولهای گرانولوزا)، C : گروه شم (۰/۲ درصد (حجمی/ حجمی) اتانل، حلال)، D : گروه آزمون ۱ (۲ میکرومولاررتینوئیک اسید)، E : گروه آزمون ۲ (۲ میکرومولار رتینوئیک اسید، با همکشتی سلولهای گرانولوزا). حروف به کار رفته در بالای ستونها متعلق به گروهی است که نسبت به آن اختلاف معنی دار مشاهده شده است.
*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, ****: P<0.0001



نمودار۲. مقایسهٔ درصد تشکیل جنینهای بلاستوسیست در گروههای مورد مطالعه.

A : گروه کنترل ۱، B : گروه کنترل ۲ (محیط بلوغ با همکشتی سلولهای گرانولوزا)، C : گروه شم (۰/۲ درصد (حجمی/ حجمی) اتانل، حلال)، D: گروه آزمون ۱ (۲ میکرومولاررتینوئیک اسید)، E : گروه آزمون ۲ (۲ میکرومولار رتینوئیک اسید، با همکشتی سلولهای گرانولوزا). حروف به کار رفته در بالای ستونها متعلق به گروهی است که نسبت به آن اختلاف معنی دار مشاهده شده است.

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, ****: P<0.0001



شکل ۱. تخمک نارس موش یا GV،

A: Germinal Vesicle ، خورد شدن حباب زاینده یا GVBD،

B: Germinal Vesicle Breakdown ، دومین متافاز یا MII ، C: Metaphase II، جنین ۲سلولی یا D: 2 -Cell، (Z: منطقهٔ شفاف، P: جسم قطبی، B: بلاستومر، N: هسته)، جنین ٤ سلولی یا E: 4 – Cell ، جنین مورلا یا F: Morula، بلاستوسیست یا G: Late blastocyst

بزرگنمایی شکلهایB : ۱۰۰× و بزرگنمایی سایر اشکال : ٤۰۰×

بحث

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان می دهد کـه اسـتفاده از هـم کـشتی سـلولهای گرانولـوزا [١٤] بـه همـراه t-RA در هنگـام بلـوغ تخمک رشد و نمو تخمکهای موشی را بهبود مـی بخـشد. در این مطالعـه از ٢٤٤٩ تخمـک نابـالغ موشـی جهـت ارزیـابی تأثیرات هم کشتی سلولهای گرانولوزا به همراه ۲ میکرو مولار t-RA در بلوغ آزمایشگاهی تخمک نارس موش و رشد و نمو رویانی تا مرحلهٔ بلاستوسیست استفاده شد. بـه گونـه ای کـه تعداد تخمکهایی که به مرحلهٔ بلوغ رسـیده بودنـد نـسبت بـه گروه کنترل فاقد هم کشتی سلولهای گرانولـوزا افـزایش پیـدا کردند. در حقیقت تخمکهای بلوغ یافته در غیاب هـم کـشتی سلولهای گرانولوزا به همراه t-RA میزان بلوغ کمتر و به دنبـال آن رشد ونمو ضعیفتری را تا مرحلهٔ بلاستوسیست نـشان مـی دهند. بنابراین دراین تحقیق تلاش شـده اسـت تـا یـک مـدل موشی مناسب با قابلیت بلوغ میـوزی تخمـک در آزمایـشگاه ایجاد شود تا بتوان نتـایج حاصـل از ایـن طـرح را بـه مراکـز باروری وناباروری تعمیم داد ،از آنجاییکه ازتخمکهای برهنـه جهت تزریق درون سیتوپلاسـمی اسـپرم (ICSI) اسـتفاده مـی شود، در این میان گاهی اوقات تعـدادی از ایـن تخمـک هـا بشکل نابالغ و برهنه میباشد و به بنظـر مـی رسـد بلـوغ ایـن تخمکها با هم کشتی سـلولهای گرانولـوزا باضـافه رتینوییـک اسید تسریع بشود. سـلولهای گرانولـوزای اویـداکتی انتخـاب فیزیولوژیکی مناسبی برای هم کـشتی هـستند، زیـرا بـه طـور طبیعی در فولیکول درحال توسعه وجود دارند و نقش مهمـی در فرایند بلوغ تخمـک از طریـق تـأثیر تنظیمـی روی محـیط احاطه کنندهٔ تخمکهای نابالغ ایفا می کنند [١٥]. همانطور کـه

در این مطالعه نشان داده شده است هم کشتی با سلولهای گرانولوزا یک تأثیر مفید روی بلوغ میوزی تخمک دارد، بنابراین احتمال می رود سلولهای گرانولوزا بتوانند بعضی از فاکتورهای براه اندازندهٔ میوز را در محیط کشت ترشح کنند [١٤]. رتینوئیدها از جمله RA متابولیت ویتامین A هستند که از عوامل ضروری در باروری مردان و زنان هستند [١٦]. RA که قبل از بلوغ به تخمک داده می شود بر تخمک تأثیر می گذارد، علاوه بر آن می تواند فعالیت ترجمه را در کمپلکس تخمک- کومولوس (COC) تغییر دهد که این امر به طور مستقیم بر تخمک یا گرانولوزای اطراف کومولوس یا هردوی آنها اثر دارد و در یک روش اتوکرینی یا پاراکرینی اعمال می شود [۹ و ۱۷]. اخیرا بیشتر گیرنده های هسته ای RA شامل RAR(α ، β)، RXR(α ،β)، رتینالدئید دهیدروژناز و پراکسیزوم پرولیفرات در تخمکهای گاوی ، سلولهای کومولوس [۱۲] و رویانها [۱۸] ردیابی شدند. از طرف دیگر سلولهای گرانولوزای رت از همه ترانس رتینول، رتینوئیک اسید سنتز می کنند [۱۹]. وجود گیرنده های RAR در سلولهای گرانولوزا نشان دهندهٔ آن است که این سلولها اهداف رتینوئیک اسید در رت، انسان و موش هستند [۲۰]. در پایان می توان نتیجه گیری کرد که استفاده از مونولایر سلولهای گرانولوزا برای توسعهٔ محیط کشت و افزایش میزان بلوغ تخمک ظاهرا بسیار نوید دهنده است. بنابراین استفاده از رتینوئیک اسید همه ترانس زمانی که همراه با تک لایه سلولهای گرانولوزا باشد می تواند بلوغ تخمک و رشد و نمو in vitro رویانهای موشی به دست آمده از لقاح آنها را تا مرحلهٔ بلاستوسیست بهبود بخشد. مطالعات بیشتر باید برای واضح کردن مکانیسمهای درگیر در هم کشتی سلولهای گرانولوزا و بلوغ تخمک در حضور t-RA انجام شوند.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های طرح حاضر از بودجه طرح بلوغ تخمک معاونت پژوهشی پژوهشکده رویان تأمین شده است. برخود فرض می‌داریم که تشکر خود را از خانم برکتی به خاطر همکاری صمیمانه در انجام تحقیق و سرکار خانم نبوی برای انجام امور آنالیز آماری اعلام داریم.

References

1. **Krisher RL.** The effect of oocyte quality on development. J Anim Sci 2004; 82: E14-E23.
2. **Trounson A, Wood C, Kausche A.** In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. Fertil Steril 1994; 62: 353-62.
3. **Chanson A, Nocera D, Senn A, Grand P , Germond M.** Development of a well- defined medium for the in vitro maturation of immature bovine cumulus –oocyte complexes. J Assist Reprod Genet 2001; 18: 209-15.
4. **Rief S, Sinowatz F, Stojkovic M, Einspanier R, Wolf E, Prelle K.** A novel co-culture system affects development, metabolism and gene expression of in vitro produced bovine embryos. Reproduction 2002; 124: 543-56
5. **Molavi F, Hosseini S, Kazemi Ashtiani S, Shahverdi A, Nasr- Esfahani M**. Can Vero cell co-culture improve in vitro maturation of bovine oocytes? Reproductive Bio Medicine online. 2006; 3: 404-11.
6. **Joo Bs, Kim MK, Na YJ, Moon HS, Lee Ks, Kim HD.** The mechanism of co-culture on embryo development in the mouse model: direct embryo to-cell contact and the removal of deleterious components. Fertil Steril 2001; 72: 193-9.
7. **Kim YB, Ahn SH, Chang DY, Koh JW.** Vero

cell co-culture counteracts the detrimental effects of hydrosalpinx fluid on the development of mouse embryos in vitro. J Korean Med Sci 2002; 17: 217-9.

8. **Lee YL, Xu JS, Chan St Ho Pc, Yeung WS.** Vero cells, but not oviduct cells, increase the hatching frequency and total cell count of mouse blastocysts partly by changing energy substrate concentrations in culture medium. J Assist Reprod 2001; 18: 566-74.
9. **Duque P, Diez C, Royo L, Lorenzo PL, Carneiro G, Hidolgo CO, Facal N, Gomez E.** Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. Hum Reprod 2002;17: 2706-14.
10. **Tracay Livingston, Down Eberhardt, J Lannett, , Edwards A**: Retinol improves bovine embryonic development in vitro. J Reprod Biol Endocrinal 2004; 21:83.
11. **Morris-Kay GM, Ward SJ.** Retinoid and mammalian development. Int Rev Cytol 1999; 188: 73–131.
12. **Mohan M, Thirumalapura NR, Malayer J.** Bovine cumulus-granulosa cells contain biologically active retinoid receptors that can respond to retinoic acid. Reprod Biol Endocrinol 2003; 1: 104-9
13. **Eimani H, Tahaei LS, Kazemi S, Shahverdi A, Eftekhari P, Baharvand H.** Effect of retinoic acid on maturation and development of immature mouse oocytes and resulted embryo from their fertilization in vitro. Yakhteh Med J 2007; 9: 7-14.
14. **Alexis Heng, Boon Chin , Ng Soon Chye**. Investigations of oocyte in vitro maturation within a mouse model. J Zygote 2004; 12: 1-18.
15. **Byskov A.G, Yding–Andersen C, Hossaini A, Guoling X.** Cumulus cells of oocytes – cumulus complexes secrete a meiosis- activating substance when stimulated with FSH. Mol Reprod. 1997; 46: 296-305.
16. **Moore T.** Vitamin A. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1957.
17. **Hidalgo CO, Diez C, Duque P, Facal N, Gomez E.** Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured in vitro with 9-cis-retionic acid. Reproduction 2003; 125: 409-16.
18. **Mohan M, Malayer JR, Geisert RD, Morgan GL.** Expression of retinol binding protein messenger RNA and retinoic acid receptors in reattachment bovine embryos. Mol Reprod Dev 2001; 60: 289-96.
19. **Zheng Wl, Bueeo RA, Sierra-Rievera E, Osteen KG, Melner MH, Ong DE.** Synthesis of retinoic acid by rat ovarian cells that express cellular retinoic acid – binding protein –II. Biol Reprod 1999; 60: 110-114.
20. **Zhuang YH, Ylikomi T, Lindfors M, Piippo S, Tuohimaa P.** Immunolocalization of retinoic acid receptors in rat, mouse and human ovaries and uterus. J Steroid Biochem Mol Biol 1994; 48: 61-8.