هم‌کشتی سلولهای Vero و جنینهای دو سلولی موش پس از انجماد شیشه‌ای

منصوره موحدین M.Sc.☆♦، مجتبی رضازاده ولوجردی Ph.D.☆، احمدحسینی Ph.D.★

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

چکیده

* **هدف:** بررسی اثرات هم‌کشتی Vero بر رشد و تکوین جنینهای دو سلولی موش پس از انجماد شیشه‌ای

* **مواد و روشها:** جنینهای دو سلولی موش پس از تحریک تخمک‌گذاری و جفت‌گیری از موشهای ماده به‌دست آمده و با استفاده از محلول ضدیخ محتوی اتیلن گلیکول با غلظت ۱۰ درصد به روش انجماد شیشه‌ای منجمد شدند. پس از ذوب در حضور محلول محتوی ۰/۵ مول ساکارز، جنینهای زنده حاصل از انجماد به دو گروه تقسیم شده و به محیط کشت منتقل شدند.

جنینهای گروه آزمون ۱ در محیط RPMI و گروه آزمون ۲ در محیط RPMI دارای سلول Vero قرار گرفتند. برای هر یک از محیطهای کشت یک گروه شاهد (جنینهای منجمد نشده) نیز در نظرگرفته شد. سپس رشد و تکوین جنینها به‌مدت ۹۶ ساعت در دو گروه با روش آماری χ^2 مقایسه شد.

* **یافته‌ها:** نتایج نشان داد که در گروههای آزمون ۱ و ۲ به‌ترتیب ۵۲ و ۶۹ درصد به مرحله تکاملی مورولا رسیدند که تفاوت میان دو گروه معنی‌دار بود ($P<0.001$). ۴۲ درصد از جنینهای گروه آزمون ۱ به مرحله بلاستوسیست رسیدند. درحالی‌که در گروه آزمون دوم، ۶۰ درصد از جنینها به این مرحله تکاملی رسیدند که تفاوت میان دو گروه معنی‌دار بود ($P<0.001$). در همین حال ۲۸ درصد جنینها از گروه آزمون اول توانستند از زونا خارج شوند و در گروه دوم، ۳۴ درصد جنینها به این مرحله رسیدند.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نمایانگر آن است که کشت همزمان جنینها با سلولهای Vero که منشاء مشترک با سیستم تناسلی دارند، می‌تواند تا حدودی اثرهای منفی ناشی از انجماد و ذوب را کاهش داده و به رشد و تکوین جنینها برای رسیدن به مراحل بالاتر تکاملی کمک کند.

گل واژگان: انجماد شیشه‌ای، اتیلن گلیکول، کشت همزمان، سلول Vero، جنین دو سلولی موش

مقدمه

در سالهای اخیر کوششهای زیادی برای حفظ حیات جنین پستاندارانی که از رحم مادرانشان خارج شده‌اند، صورت گرفته است. در تحقیقات اولیه از محیطهای کشت ساده مثل سالین فیزیولوژیک استفاده می‌شد که هدف حفظ هموستاز در محیط کشت بود. اما امروزه پیشرفتهایی در جهت تهیه محیطهایی با قابلیتهای بیشتر به‌دست آمده که از جمله می‌توان اضافه کردن سرم، بافرها، اسیدهای آمینه را نام برد. استفاده از سلولهای helper و کشت همزمان جنینها در مراحل اولیه تکاملی تا رسیدن به بلاستوسیست ثانویه نیز باعث بهبود کشت جنین شده است (۱).

استفاده از کشت وزیکولهای تروفوبلاستی (۲) و تک‌لایه سلولی به‌عنوان دو نوع سیستم کشت همزمان به‌کار برده شده است. در بسیاری از تحقیقات به آثار سودمند سلولهای لوله رحمی (۳) اپی‌تلیوم لوله فالوپ (۴، ۵) و سلولهای Vero (۶، ۷) در کشت همزمان جنین اشاره شده است. اثرهای این سلولها به عبور از اپی‌تلیوم بستگی داشته و با گونه یا هورمون ارتباطی ندارد (۶).

سلولهای Vero مشتق از اپی‌تلیوم کلیه میمون بوده و از این جهت استفاده می‌شود که دارای یک منشاء مشترک با سیستم تناسلی است. از آنجا که این رده سلولی از نظر وجود هر آلودگی ویروسی و میکربی کنترل می‌شود از سالهای دور در کشت همزمان استفاده شده است (۱).

Menezo و همکارانش (۶) نشان دادند که هم‌کشتی جنینهای انسانی با سلولهای Vero باعث بهبود و تکامل این جنینها می‌شود؛ اما همین سیستم در مورد جنینهای تک‌سلولی موش نتوانست نتیجه مشابهی را ارائه دهد. در همین حال Valojerdi و همکارانش (۷) توانستند با استفاده از کشت همزمان جنینهای موش در مراحل اولیه تکاملی با سلولهای Vero بر ایست تکوینی این جنینها فائق آیند. این محققین به این نتیجه رسیدند که در صورت کشت همزمان جنینهای دوسلولی موش با Vero تعداد زیادی بلاستوسیست (۸۰ درصد) به‌دست خواهد آمد و درصد بیشتری نیز به مرحله خروج از زونا می‌رسند (۴۸ درصد در کشت همزمان و ۲۷ درصد در گروه شاهد). Lai و همکارانش (۸) نیز از رده سلولی Vero برای کشت همزمان جنین دوسلولی موش استفاده کرده و توانستند درصد بالایی از جنینها را در مرحله خروج از زونا داشته باشند. همین محققین در مطالعه دیگری (۹) تفاوت معنی‌داری در تشکیل بلاستوسیست در روز سوم در کشت همزمان و در محیط کشت معمولی ندیدند، اما پس از آن، سرعت تکامل افزایش پیدا کرده و میزان بیشتری از جنینهای موش که کشت همزمان شده بودند به مرحله خروج از زونا رسیدند. در مطالعه‌ای که Schillaci و همکارانش (۱۰) انجام دادند به این نتیجه رسیدند که تک‌لایه سلولی Vero می‌تواند با داشتن اثرهای مثبت بر رشد و تکامل جنین انسانی، محیط مناسبی را برای رشد آن فراهم کند. این جنینها قابلیت ادامهٔ حیات را داشته و کیفیت آنها نیز بهتر است. میزان حاملگی بالا و عدم سقط جنین در بیمارانی که جنینهایی را دریافت کردند که تنها ۲۴ ساعت کشت همزمان شده بودند، نشانه آن است که احتمالاً تک‌لایه سلولی حتی در کوتاه مدت هم می‌تواند برای جنین مفید باشد (۱۱). در ضمن میانگین تعداد سلولها در جنینهایی که کشت همزمان شده‌اند بالاتر از جنینهایی بوده که در محیط معمولی کشت داده شده‌اند و ادامه حیات جنینهای منجمد ـ ذوب شده نیز در محیط کشت همزمان بهتر بوده است (۱۰). لذا توصیه می‌شود که پس از انجماد، جنین کشت همزمان شود (۱۰، ۱۱). برای انجماد جنین خصوصاً در مراحل اولیه تکاملی باید دقت زیادی نمود که جنینهایی منجمد شوند که دارای کیفیت خوبی بوده و قطعه‌قطعه نباشند. اما اگر از جنینهایی که کشت همزمان شده‌اند استفاده شود حتی اگر کیفیت خیلی خوبی هم نداشته باشند دیده شده که پس از ذوب، توانایی ادامه حیات و تکامل خوبی را دارا هستند (۱۲). از سوی دیگر؛ مشاهده شده است که توانایی رشد و تکوین جنینهایی که منجمد شده‌اند شبیه جنینهای غیرانجمادی نیست که از دلایل عمدهٔ آن می‌توان به سمی بودن ضدیخ به‌کار رفته اشاره کرد که حتی پس از آبدهی، میزانی از آن در سلولهای جنینی باقی مانده و به تدریج وارد محیط کشت می‌شود (۱۳). لذا برخی محققین از کشت همزمان پس از ذوب استفاده کرده و نتایج خوبی نیز به‌دست آوردند (۱۴-۱۱) و معتقدند که رده سلولی به‌کار رفته می‌تواند با آثار negative conditioning خود مواد سمی را از محیط کشت برداشته و به تکامل جنینی کمک کند (۱۵). قابل ذکر است که در تحقیقات انجام شده به بررسی اثرات هم‌کشتی به‌ویژه سلولهای Vero بر تکامل جنین پس از انجماد شیشه‌ای پرداخته نشده است.

لذا پژوهش حاضر به‌منظور مطالعه اثرات کشت همزمان با سلولهای Vero بر رشد و تکامل جنینهای دو سلولی موش که با استفاده از ضدیخ اتیلن گلیکول انجماد شیشه‌ای شده‌اند، طراحی شده است.

مواد و روشها

* جمع‌آوری جنینهای دوسلولی موش

موشهای ماده نژاد NMRI به سن ۶-۸ هفته با تزریق داخل صفاقی ۷/۵ IU hMG[1] و ۴۸ ساعت بعد ۷ IU از hCG[2] تحریک تخمک‌گذاری شده و به‌صورت یک به یک در کنار موشهای نر قرار گرفتند. صبح روز بعد با مشاهدهٔ پلاک واژن و حصول اطمینان از وقوع حاملگی موشهای ماده از قفس نرها جدا شدند. موشهای ماده دارای پلاک واژن ۴۸ ساعت پس از تزریق hCG به روش قطع نخاع گردنی کشته شده و به سرعت لوله‌های رحمی آنها جدا و به قطره‌ای از محیط کشت RPMI که قبلاً آماده شده بود، انتقال یافتند. در زیر استریو میکروسکوپ با فلاش کردن مقدار کمی محیط کشت به داخل لوله رحمی، جنینها از لوله‌های رحمی خارج و به قطره محیط کشتی جداگانه منتقل شدند. سپس جنینهای به‌دست آمده به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول برای کشت در محیط RPMI در نظر گرفته شده و به دو گروه آزمون (انجماد شیشه‌ای) و شاهد (منجمد نشده) تقسیم شدند. گروه دوم از جنینها نیز برای هم‌کشتی با سلولهای Vero+RPMI درنظر گرفته شده و به همان ترتیب به دو گروه شاهد و آزمون تقسیم شدند.

1. human Monoposed Gonadotropin
2. human Chorionic Gonadotropin

* تهیه محلول انجماد شیشه‌ای

تهیه محلول و اجرای مراحل انجماد شیشه‌ای به‌کار گرفته شده در مطالعه حاضر همان روش Kasai (۱۶) است که با اندکی تغییرات در زیر به‌صورت خلاصه آمده است:

ابتدا محلول PBI[1] دارای فیکول ۷۰ با میزان ۳۰ درصد (وزن مولکولی ۷۰۰۰۰) با ۰/۵ مول ساکارز مخلوط شد و سپس ۱۰/۷ درصد استامید به ترکیب فوق اضافه شد. در نهایت غلظت ۱۰ درصد اتیلن گلیکول با این محلول تهیه شد (EFS_{10}).

* تهیه تک‌لایه از سلولهای Vero

برای تهیه تک‌لایه موردنظر محلولی با سلولاریته 1×10^5 سلول در میلی‌لیتر تهیه شد. برای تهیه رقت سلولی از محیط کشت RPMI محتوی ۱۰ درصد FCS[2] استفاده شد. در پتری‌دیش با قطر ۳۰ میلی‌لیتر قطرات ۱۰۰ میکرولیتری از محلول حاوی سلول قرار داده و روی آن با یک لایه نازک روغن پارافین پوشانده شد و پتری‌دیش به انکوباتور Co_2دار ۳۷° سانتی‌گراد منتقل شد. پس از آنکه حدود ۸۰ درصد کف قطره توسط سلولهای Vero پوشانده شد، محیط سلولها با RPMI محتوی ۱۰ درصد FCS تعویض گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت این قطره‌ها آماده دریافت جنین بودند.

* مراحل اجرای انجماد شیشه‌ای

انجماد

ابتدا ۱۰۰μL محلول PBI دارای ۰/۵ مول ساکارز به‌کمک پیپت به داخل نی انجماد (0.5 ml /French straw, IMV, L'Aigle) کشیده شد و پس از فاصله گذاشتن یک حباب هوا، قطره‌ای با حجم تقریبی ۲۰μL از محلول EFS_{10} وارد نی شد. در هر بار آزمایش جنینها به‌مدت ۲ دقیقه در محلول EFS_{10} آبگیری شدند و در انتها به قطره ضدیخ داخل نی منتقل شده و پس از فاصله گذاشتن یک حباب هوا دهانهٔ نی با هماتوکریت کاملاً بسته شده و نی بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور شد.

ذوب

نی‌های دارای جنین از نیتروژن مایع خارج شده و به‌ترتیب به‌مدت ۱۰ و ۲۰ ثانیه در هوای اتاق و آب ۲۰° سانتی‌گراد ذوب شدند. سپس محتویات نی‌ها که شامل جنینها نیز بود، در یک سی‌سی محلول ساکارز ۰/۵ مول تخلیه شد. پس از ۵ دقیقه جنینها از محلول فوق جمع‌آوری شده و به ۲ سی‌سی PBI به‌مدت ۵ دقیقه منتقل شدند. در انتها جنینهای دو گروه آزمون به محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد FCS یا محیط هم‌کشتی Vero+RPMI محتوی ۱۰ درصد FCS منتقل شدند و مراحل تکامل این دو گروه آزمون و گروههای شاهد به‌مدت ۹۶ ساعت روزانه بررسی شد.

* بررسی آماری

میزان درصد زنده ماندن و تکامل جنینها در بین گروهها با روش آزمون آماری χ^2 بررسی و مقایسه شد.

یافته‌ها

نتایج پژوهش حاضر در جداول ۳-۱ خلاصه شده است:

در جدول ۱ مقایسه‌ای میان میزان رشد و تکوین جنینهای دو سلولی منجمد شده با استفاده از ضدیخ EFS_{10} و گروه شاهد انجام شده است. گروه شاهد شامل ۱۰۶ جنین دو سلولی منجمد نشده بود که در محیط RPMI کشت داده شدند. گروه آزمون شامل ۱۴۸ جنین دوسلولی بود که با استفاده از محلول ضدیخ EFS_{10} منجمد شده و پس از ذوب، زنده مانده بودند و در محیط RPMI کشت داده شدند.

در گروه شاهد ۸۳ و ۷۶ درصد جنینها به‌ترتیب به مرحله چهار سلولی و هشت سلولی رسیدند و این میزان برای گروه آزمون به ترتیب ۶۸ و ۵۶ درصد بود. اختلاف مشاهده شده در مراحل تکاملی فوق میان گروه آزمون و شاهد معنی‌دار بود ($P<0.01$). در همین حال ۶۵ و ۵۸ درصد از جنینهای گروه شاهد به‌ترتیب به مراحل تکاملی مورولا و بلاستوسیست رسیدند. در گروه آزمون این مقادیر به‌ترتیب ۵۲ و ۴۲ درصد بود که اختلاف مشاهده شده در سطح معنی‌داری قرار داشت ($P<0.05$). درحالی‌که ۳۲ درصد از جنینهای گروه شاهد توانستند به مرحلهٔ تکاملی خروج از زونا برسند، این مقدار برای گروه آزمون ۲۸ درصد بود و اختلاف موجود معنی‌دار نبود.

جدول ۱: مقایسه میان میزان تکوین جنینهای دوسلولی منجمد شده موش با استفاده از EFS10 و گروه شاهد

گروه	تکرارآزمایش	تعدادکل جنینهای ۲سلولی	جنینهای ۲سلولی زنده(درصد)	۴سلولی (درصد)	۸سلولی (درصد)	مورولا (درصد)	بلاستوسیست (درصد)	خروج از زونا (درصد)
شاهد	۵	۱۰۶	۱۰۶	۸۸(۸۳)	۸۱(۷۶)	۶۹(۶۵)	۶۱(۵۸)	۳۴(۳۲)
آزمون	۵	۱۴۸	۱۲۴(۸۳)	۸۲*#(۶۸)	۷۰**(۵۶)	۶۴#(۵۲)	۵۲#(۴۲)	۳۵(۲۸)

گروه شاهد: جنینهای منجمد نشده در محیط کشت RPMI

گروه آزمون: جنینهای منجمد شده با EFS10 در محیط کشت RPMI

* $P<0.05$

** $P<0.01$

1. Phosphate Buffer
2. Fetal Calf Serum

در جدول شماره ۲ مقایسه‌ای میان رشد و تکوین جنینهای دوسلولی منجمد شده و منجمد نشده در کشت همزمان سلولهای Vero با استفاده از محیط RPMI شده است. ۱۴۶ جنین دوسلولی با ۶ بار تکرار آزمایش با ضدیخ EFS_{10} منجمد شدند و پس از ذوب، ۱۲۶ (۸۸ درصد) جنین دوسلولی زنده به‌دست آمد. ۱۲۲ جنین دوسلولی زنده که در طی ۵ بار آزمایش به‌دست آمد؛ به‌عنوان گروه شاهد درنظر گرفته شدند. ۸۲ درصد از جنینهای گروه آزمون توانستند به مرحله چهار سلولی برسند و ۹۳ درصد از جنینهای منجمد نشده در جنین محیطی چهار سلولی شدند. اختلاف میان دو گروه معنی‌دار نبود. ۷۹ درصد از جنینهای گروه آزمون به مرحله ۸ سلولی رسیدند در گروه شاهد این مقدار ۸۳ درصد بود. تفاوت در این مرحله تکامل هم معنی‌دار نبود. در گروه آزمون ۶۹ و ۶۰ درصد از جنینهایی که پس از ذوب زنده مانده بودند به ترتیب به مراحل تکاملی مورولا و بلاستوسیست رسیدند و این مقادیر در گروه شاهد به ترتیب ۷۵ و ۵۶ درصد بود. تفاوت مشاهده شده در این مرحله نیز ظاهری بود. در گروه آزمون ۳۴ درصد جنینها توانستند به مرحله تکاملی خروج از زونا برسند و این مقدار در گروه شاهد ۳۸ درصد بود و اختلاف بین دو گروه معنی‌دار نبود.

در جدول شماره ۳ مقایسه‌ای میان رشد و تکوین جنینهای منجمد شده با استفاده از محلول ضدیخ EFS_{10} که در دو محیط کشت متفاوت کشت داده شده بودند صورت گرفته است. گروه آزمون ۱ شامل جنینهایی است که پس از کشت در محیط RPMI قرار داده شدند و گروه آزمون ۲ شامل جنینهایی است که پس از ذوب در محیط کشت همزمان سلولهای Vero با استفاده از محیط RPMI کشت داده شدند. در گروه آزمون یک، ۶۸ درصد جنینها توانستند به مرحله چهارسلولی برسند، درحالی‌که این میزان در گروه آزمون دوم ۸۲ درصد بود و تفاوت مشاهده شده معنی‌دار بود ($P<0.0001$). در گروه آزمون ۱ به‌ترتیب ۵۶ و ۵۲ و ۴۲ درصد جنینها به مرحلهٔ تکاملی هشت سلولی، مورولا و بلاستوسیست رسیدند و این مقادیر برای گروه آزمون ۲ به‌ترتیب ۷۹ و ۶۹ و ۶۰ درصد بود. اختلاف موجود در میان دو گروه نیز کاملاً معنی‌دار بود. در گروه آزمون ۱، تنها ۲۸ درصد جنینها توانستند به مرحله تکاملی خروج از زونا برسند و این مقدار برای گروه آزمون ۲، ۳۴ درصد بود. با وجود اینکه این مقدار در گروه آزمون ۲ بیشتر است اما تفاوت مشاهده شده ظاهری برده و از نظر آماری معنی‌دار نیست.

جدول ۲: مقایسه میزان تکوین جنینهای دوسلولی موش از گروه شاهد و گروه ازمون در محیط کشت همزمان Vero

گروه	تکرارازمایش	تعدادکلی جنینهای ۲سلولی	جنینهای ۲سلولی زنده(درصد)	۴سلولی (درصد)	۸سلولی (درصد)	مورولا (درصد)	بلاستوسیست (درصد)	خروج از زونا (درصد)
شاهد	۵	۱۲۲	۱۲۲	۱۱۲(۹۲)	۱۰۱(۸۳)	۹۱(۷۵)	۶۹(۵۶)	۴۶(۳۸)
آزمون	۶	۱۴۶	۱۲۶(۸۸)	۱۱۱(۸۲)	۱۰۰(۷۹)	۸۷(۶۹)	۷۶(۶۰)	۴۳(۳۴)

گروه شاهد: جنینهای منجمد نشده در محیط کشت همزمان RPMI + Vero

گروه ازمون: جنینهای منجمد شده در محیط کشت همزمان RPMI + Vero

جدول ۳: مقایسه میزان تکوین جنینهای دوسلولی موش پس از کشت در RPMI و محیط کشت همزمان Vero

گروه	تکرارازمایش	تعدادکلی جنینهای ۲سلولی	جنینهای ۲سلولی زنده(درصد)	۴سلولی (درصد)	۸سلولی (درصد)	مورولا (درصد)	بلاستوسیست (درصد)	خروج از زونا (درصد)
آزمون ۱	۵	۱۲۹	۱۲۴(۸۲)	۸۴(۶۸)	۷۰(۵۶)	۶۴(۵۲)	۵۲(۴۲)	۳۵(۲۸)
آزمون ۲	۶	۱۴۶	۱۲۶(۸۸)	۱۱۱ ⊙⊙ (۸۲)	۱۰۰ ⊙⊙ (۷۹)	۸۷ ⊙ (۶۹)	۷۶ ⊙ (۶۰)	۴۳(۳۴)

گروه ازمون ۱: جنینهای منجمد شده در محیط کشت همزمان RPMI

گروه ازمون ۲: جنینهای منجمد شده در محیط کشت همزمان RPMI + Vero

⊙ P<0.001

⊙⊙ P<0.0001

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که کشت همزمان جنینهای دو سلولی موش که به روش انجماد شیشه‌ای و با استفاده از ضدیخ اتیلن‌گلیکول منجمد شده بودند، منجر به بهبود تکامل آنها در محیط کشت می‌شود. بسیاری از محققین اعلام کرده‌اند که استفاده از کشت همزمان می‌تواند تکامل جنینها را در محیط کشت بهبود بخشد (۱۷، ۱۸، ۱۹). در مورد مکانیسم عمل کشت همزمان نظرات متضادی وجود دارد:

۱) سلولها در محیط کشت همزمان قادر به ترشح موادی هستند که تحریک کننده رشد جنین (اختصاصی یا غیراختصاصی) بوده و گاهی ممکن است از تأخیر رشد جنین جلوگیری نماینده ۲) سلولهای کشت همزمان قادر به برداشتن عوامل مزاحم از محیط کشت هستند (۲۰).

در کشت همزمان با بعضی رده‌های سلول از جمله لوله رحمی توانسته‌اند گلیکوپروتئین‌های ترشح شده به محیط را تخلیص نمایند (۲۱، ۲۲). برخی دیگر وجود آنتی اکسیدانهایی همچون Taurine را که از سلولهای سوماتیک ترشح شده و تحریک کننده رشد جنین است، گزارش کرده‌اند (۲۲، ۲۴). بعضی دیگر از محققین به سنتز و ترشح مولکولهای فعال بیولوژیکی همچون ILF[1] توسط سلولهای سوماتیک معتقد هستند (۲۵، ۲۶) که این فاکتورها به گیرنده‌های خود متصل شده و باعث افزایش قدرت حیات جنین می‌شوند و در عین حال بر لانه گزینی نیز اثر مثبتی دارند (۲۷).

1. Insulin Like Factor

مکانیسم عمل دوم برداشت مواد سمی از محیط است که از جمله آثار آن می‌توان به کاهش سطح متابولیتهای اکسیژن اشاره کرد (۲۸).

تأثیرات مثبتی که از کشت همزمان بر تکامل جنینهای منجمد شده دو سلولی موش در این پژوهش دیده شد، احتمالاً به مکانیسم عمل دوم سیستم کشت همزمان وابسته است؛ زیرا همان‌طور که Bautista و همکارانش (۱۲) اظهار داشتند: ضدیخ پس از آبدهی نمی‌تواند به‌طور کامل از سلولهای جنینی خارج شود و مدت زمانی طول می‌کشد تا خروج کامل اتفاق بیفتد. هرچند که اتیلن گلیکول به‌عنوان ضدیخی با سمیت کم شناخته شده است (۲۹)؛ اما به‌هرحال برای سلولهای جنینی سمی است و خروج تدریجی باقیمانده آن از سلول تعادل محیط کشت را بر هم می‌زند و در صورت به کارگیری کشت همزمان می‌توان از آثار سودمند برداشت عوامل مزاحم توسط سلولها بهره جست. احتمالاً سلولها برپژه سلولهای Vero در سیستم کشت همزمان با رها کردن آنزیمهای پروتئولیتیک مانند کیموتریپسین که باعث از بین رفتن عوامل مهاری می‌شوند (۸) در طی تکامل در محیط کشت به جنین کمک می‌کنند. به همین دلیل است که تکامل جنینهای دوسلولی که انجماد شیشه‌ای شده‌اند در محیط کشت همزمان Vero بهتر از تکامل جنینهایی است که در محیط کشت روتین آزمایشگاهی قرار گرفته‌اند (۶۰ درصد بلاستوسیست در کشت همزمان در مقابل ۴۲ درصد بلاستوسیست در محیط RPMI).

در عین حال، نتایج نشان داد که تفاوتهای آماری معنی‌داری میان مراحل تکامل جنینهای منجمد شده و منجمد نشده در هم‌کشتی وجود ندارد. به عبارت دیگر؛ کشت همزمان توانست به جنینهای منجمد شده کمک کند که بر فشارهای ناشی از انجماد فائق آیند. البته میزان درصد هچینگ در هر دو گروه خیلی بالا نبود (۳۸ درصد در گروه شاهد و ۳۴ درصد در گروه آزمون) که احتمالاً به‌دلیل نوع محیط کشت مورد استفاده است.

برخی محققین بر این باورند که در کشت همزمان می‌بایست از محیط کشتی استفاده کرد که هم برای سلول و هم برای جنین مناسب باشد (۸) و محیط RPMI با سلولهای Vero همخوانی دارد ولی خیلی برای کشت جنین مناسب نیست؛ هرچند میزان درصد هچینگ در محیط RPMI حتی در گروه شاهد تنها ۳۲ درصد بود و در محیط هم‌کشتی افزایش پیدا کرد (۳۸ درصد) اما به هرحال ایده‌آل نیست.

در این پژوهش از رده سلولی Vero در کشت همزمان جنین دوسلولی موش استفاده شد. بسیاری از محققین نیز به اثرهای مفید Vero در تکامل جنین موش اشاره داشته‌اند (۷، ۳۰، ۳۱).

احتمال آلودگی ویروسی و باکتریایی در هر نوع سلول وجود دارد اما گفته می‌شود که چون رده سلولی Vero از این نظر آزمایش می‌شود و در تهیه واکسن نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد، در کشت همزمان مناسب به‌نظر می‌رسد (۳۲).

برخی از محققین توانستند با به کارگیری کشت همزمان Vero، میانگین تعداد سلولهای جنینی را افزایش دهند (۱۰، ۳۳، ۳۴). این عده معتقدند که سلولهای Vero محافظت جنینها را در مقابل فشارهای محیط خارجی بر عهده داشته و مثل یک بافر میان جنین و محیط میزبان عمل می‌کند. اما اینکه بعضی محققین، ترشح عوامل میتوژنتیک از سلولهای Vero را احتمال می‌دهند (۳۵) هنوز اثبات نشده است.

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که کشت همزمان جنینهای دوسلولی موش پس از انجماد و ذوب باعث بهبود در وضعیت تکاملی آنها می‌شود و درصد بالاتری به مراحل مختلف تکامل می‌رسند که برای کسب نتیجه بهتر باید به راههای دیگری از جمله تعویض روزانه محیط کشت و اضافه کردن موادی به محیط کشت براساس نیازهای جنین اندیشید.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی ایران که کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این طرح را برمبنای قرارداد شماره ۲۶۳۲/۳۰/۱۹پ مورخ ۷۷/۱۰/۱۳ تأمین نمودند و همچنین از آقای حسین بهاروند که در انجام مراحل مختلف پژوهش ما را یاری کردند، ابراز می‌دارند.

References

1. Thibodeaux JK, Godke RA: In vitro enhancement of early-stage embryos with co-culture. Arch Pathol Lab Med 1992; 116: 364-372

2. Heyman Y, Menezo Y, Chesne P, Camous S, Garnier V: In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. Theriogenology 1987; 27:59-68

3. Heyman Y, Menezo Y: Interaction of trophoblastic vesicles with bovine embryos developing in vitro. In: The mammalian preimplantation embryo. Bavister BD (ed), New York, Plenum Press, 1987, pp 175-191

4. Bongso A, Ng SC, Ratnam S: Co-culture: Their relevance to assisted reproduction. Hum Reprod 1990; 5: 893-900

5. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Moke H, Ng PL, Ratnam SS: Co-culture in human assisted reproduction: support of embryos in vitro and their specificity. Ann NY Acad Sci 1991b; 626: 438-444

6. Menezo YJR, Guerin JF, Czyba JC: Improvement of human early embryo development in vitro by co-culutre on monolayers of vero cells. Biol Reprod 1990; 42: 301-306

7. Valojerdi MR, Nematollahi N, Hosseini A, Mozdarani H: The effect of vero cell on development of one and two cell mouse embryos. Mid East Fert Soc J 1997; 2(1): 35-41

8. Lai YM, Stein DE, Soong YK: Evaluation of vero cell co-culutre system for mouse embryos in various media. Hum Reprod 1992; 7: 276-280
9. Lai YM, Wang HS, Lee CL, Lee JO, Huang HY, Chang FH, Lee JF, Soong YK: Insulin-like growth factor- binding proteins produced by vero cells, and the role of insulin- line growth factor- binding protein-3 in mouse embryo co-culture systmes. Hum Reprod 1996; 11(6): 1281-1280
10. Schillaci R, Ciriminna R, CeFalu E: Vero cell effect on In vitro human blastocyst development: preliminary results. Hum Reprod 1994; 9(6): 1131-1135
11. Nematollahi N, Valojerdi MR: Effect of vero cell co-culture on the development of frozen-thawed two cell mouse embryos. J Assist Reprod Genet 1999; 16(7): 380-384
12. Wiemer KE, Cohen J, Amborski GF: In vitro developmetn and implantation of human embryos follwoing culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. Hum Reprod 1989; 45: 595-600
13. Bautista JAN, Takahashi Y, Kanagawa H: In vitro viability of mouse zygotes vitrified in ethylene glycol. JPN J Vet Res 1998; 45(4): 193-198.
14. Mahmoudzadeh AR, Von Soom A, Blos P,Ysebart P, Dekruif A: Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryo produced In vitro: effect of developmental stage, two step additon of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. J Reprod Fert 1995; 103: 33-39
15. Kane MT, Carney EW, Elington JE: The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos In vitro. Theriogenology 1992; 38: 297-313
16. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T: A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J Reprod Fertil 1990; 89: 91-97.
17. Robi JM, Prather R, Barnes F: Nuclear transplantation in bovine embryos. J Anim Sci 1987; 64: 622-647
18. Lehn- Jensen H, Rall WF: Cryomicroscopic observations of cattle embryos druing freezing and thawing. Theriogenology 1983; 19: 263-277
19. Blerkam JV: Development of human embryos to the hatched blastocyst stage in the presence or absence of a monolayer of Vero Cells. Hum Reprod 1993; 8: 1525-1539
20. Gandolf F, Brevini TAL, Moor RM: Effect of oviduct environment on embryonic development. J Reprod Fertil 1989a; 38(suppl): 107-115
21. Gandolfe F, Brevini TAL, Richardson L, Broun CR, Moor RM: Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. Development 1989b; 106: 303-312
22. Loutradis D, John D, Kiessling AA: Hypoxanthine causes a 2-cellk bock in random bred mouse embyros Biol Reprod 1987; 37: 311-316
23. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T: Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. Mol Reprod Dev 1991; 28: 356-360
24. Smith AG, Hooper ML: Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. Dev Biol 1986; 121: 1-9
25. Temin HM, Smith GL, Dulak NC: Control of multiplication of normal and rous sacroma virus-hansformed chicken embryo fibroblasts by purifeid multiplication- stimulatig activity with nonsuppressible insulin-like and sulfation factor activities. In control of proliferation in Animal cells. Vol 1. Clarkson Bm, Baserga R (eds), Cold Spring Harbor, Long Inland, New York, 1974; pp 19-26
26. Szolozi D: Extrusion of nucleoli from pronuclei of the rat. J Cell Biol 1462; 25: 545-562
27. Bongos A, Fong CY, Soon-Chye NG: Co-culture techniques for blastocyst transfer and embryonic stem cell production. Assis Reprod Rev 1995; 5(2): 106-114
28. Kasai M: Cryopreservation of mammalian embryos by vitrification. In: Perpectives on assisted reproduction. Mori T, Aono T, Tominaga T, Hiroi M (eds), Ares-Serono symposia Publications, Rome, Italy, Front Endocrin vol 4, 1994, pp 481-487
29. Gandolfi F, Brevini TAL, Moor RM: Effect of oviduct environment on ebmryonic development. J Reprod Fertil 1989; 38(suppl): 107-115
30. Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J, Menezo Y: Co-culture of 1-cel mouse embyros on different cell supports. Hum Reprod 1990; 5: 737-743
31. Plachot M: Co-culture of embryos and feeder cells. Hum Reprod 1996; 11(1): 35-42
32. Sakkas O, Transon Ao, Kola I: In vitro cleavage rates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in co-culutre with oviduct cell. Reprod Fertil

Dev 1989; 1: 127-136
33. Goodeaux LL, Thibodeaux JK, Voelkel SA: Collection, Co-culture and transfer of rhesus pre-implantation embryos. Assist Reprod Technol Androl 1990; 1: 370-379