مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد شانزدهم، ویژه‌نامه ۲، ۱۳۸۸
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

اثر هم‌کشتی سلول‌های پوششی لوله رحم گاو بر تکوین رویان گاو

*معصومه اسحاقی[۱]، یوسف جعفری‌آهنگری[۲] و *حسام دهقانی[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم دامی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار گروه دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش:

چکیده

استفاده از سیستم هم‌کشتی مدت‌ها است که با هدف بهبود کیفی رویان پستانداران، شبیه‌سازی محیط داخلی بدن در آزمایشگاه، افزایش بقاء رویان و حمایت محیط‌های کشت، کاهش استرس‌های محیطی و متابولیسمی محیط‌های کشت به‌کار رفته است. تأثیر سلول‌های پوششی لوله رحم گاو در دو مرحله لقاح و تکوین آزمایشگاهی رویان گاو از اهداف خاص این پژوهش بود. در آزمون اول تخمک‌ها پس از بلوغ در غیاب سلول‌های پوششی لوله رحم بارور شده و در شرایط حضور و حضور نداشتن سلول‌های پوششی لوله رحم کشت داده شدند و مراحل مختلف تکوین مورد بررسی قرار گرفت. میزان تکوین رویان در مراحل مختلف ٤ سلولی، ۸ سلولی و بلاستوسیستی در محیط کشت TCM-199 در حضور سلول‌های پوششی نسبت به سایر محیط‌ها (TCM-199 بدون هم‌کشتی، SOF و KSOM بدون هم‌کشتی) بالاتر بود. شرایط هم‌کشتی با سلول‌های پوششی در هنگام لقاح آزمایشگاهی و سپس تداوم هم‌کشتی با محیط‌های کشت TCM-199 منجر به تولید رویان‌های دو سلولی بیشتری (۷۲/۱۷ درصد) در مقایسه با محیط SOF بدون هم‌کشتی (٦۱/٥ درصد)، محیط TCM-199 بدون هم‌کشتی (٥۳/٦ درصد) و KSOM بدون هم‌کشتی (٤۲ درصد) شد. محیط کشت SOF نسبت به TCM-199 توانست در حمایت از تکوین رویان تا مرحله بلاستوسیستی موفق‌تر عمل کند. هر چند که درصد مراحل اولیه تکوین رویانی به‌طور جزیی در محیط کشت TCM-199 در مقایسه با محیط SOF بیش‌تر بود، اما این روند با نزدیک شدن به مراحل مورولا و بلاستوسیست تغییر کرد و محیط کشت SOF به تولید درصد بالاتری از بلاستوسیست در مقایسه با TCM-199 منجر شد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که هم‌کشتی با سلول‌های پوششی لوله رحم گاو باعث افزایش راندمان لقاح و تکوین بهتر رویان می‌شود. در شرایط غیرهم‌کشتی، محیط SOF از محیط TCM-199 در تکوین رویان اولیه گاو بهتر عمل می‌کند.

واژه‌های کلیدی: تکوین رویان، محیط کشت، سلول‌های پوششی لوله رحم، هم‌کشتی

مقدمه

تولید آزمایشگاهی رویان گاو از راندمان پایینی (حدود ۳۰ تا ٤۰ درصد) برخوردار است (کریزینگ و همکاران، ۱۹۹۷). از این‌رو در راستای بهبود آن، پژوهش‌های زیادی با هدف تولید جنین‌هایی مقاوم و ماندگار در اقتصادی‌ترین شیوه‌های آزمایشگاهی، صورت گرفته است (کلومپ، ۲۰۰٤). استفاده از هم‌کشتی سلول‌های بدنی[۱] به‌عنوان یک سیستم ساده و با هدف تقلید از شرایط محیط داخلی بدن، به حداقل رساندن کاستی‌های محیط‌های کشت مصنوعی، تولید فاکتورهای رشد و فعال‌کننده و

* مسئول مکاتبه: isacci60@yahoo.com

1- Somatic

Archive of SID
www.SID.ir

مقابله با استرس‌ها و سموم به‌دست آمده از مسیرهای متابولیسمی از ٤٠ سال پیش در کشت آزمایشگاهی رویان پستانداران، مورد توجه قرار گرفته است (اورسی و ریش، ٢٠٠٧). استفاده از سلول‌های بدنی برای حمایت از تکوین آزمایشگاهی رویان موش و نیز کشت سلول‌های پوششی لوله رحم موش برای اولین بار مطرح گردید (بیگر و همکاران، ١٩٦٢). بعدها سلول‌های پوششی لوله رحمی و سلول‌های تروفوبلاست برای رویان نشخوارکنندگان به‌کار گرفته شد (یستون و فرست، ١٩٨٩). این فعالیت‌ها در گونه‌های زیادی از پستانداران مورد استفاده قرار گرفته است. اما چگونه این سلول‌ها می‌توانند اثرات بیولوژیکی خاصی از جمله سرعت‌بخشی به مرحله تسهیم (ساکاس و همکاران، ١٩٨٩)، افزایش سرعت تشکیل بلاستوسیست (رکسرود، ١٩٨٩)، کاهش تخریب و مرگ سلولی، کاهش خسارت‌های به‌دست آمده از تکنیک، حمایت محیط‌های کشت (کارنی و همکاران، ١٩٩٠)، حمایت زیگوت تا مرحله کلیواژ[1] و غیره را داشته باشند، هنوز مشخص نشده است. اما آن‌چه مشخص است این می‌باشد که این سلول‌ها طیف وسیعی از فاکتورهای رشد و فعال‌کننده را تولید می‌کنند و قادر به مقابله با استرس‌های به‌دست آمده از شرایط آزمایشگاهی[2] هستند.

اثر هم‌کشتی سلول‌های بدنی بر کیفیت رویان‌های به‌دست آمده از باروری آزمایشگاهی تخمک[3] گاو و کشت آزمایشگاهی رویان[4]، در پژوهش‌های مختلف داخلی و خارجی بررسی شده است. اما به‌کارگیری قابلیت‌های این سیستم در این پژوهش، هدفمندتر بود به این‌ترتیب که با استفاده از کشت سلول‌های پوششی لوله رحمی گاو[5] برای تولید انبوه رویان[6] گاو شیری هلشتاین از زمان باروری تا تولید بلاستوسیست همراه بود. در قالب این آزمون، چند محیط کشت پایه متداول در سیستم IVF گاو نیز به‌طور هم‌زمان بررسی شدند. سوال اختصاصی این پژوهش آن بود که آیا هم‌کشتی سلول‌های پوششی لوله رحم موجب تکوین بهتر رویان گاو در شرایط آزمایشگاهی می‌شود یا خیر؟ برای پاسخ به این سوال چهار ترکیب مختلف محیط کشت و سلول‌های پوششی کشت داده شده لوله رحمی گاو در هنگام تولید رویان استفاده شد و نتایج به‌دست آمده مورد مقایسه قرار گرفت.

1- Cleavage
2- In Vitro
3- In Vitro Fertilization of Oocyte (IVF)
4- In Vitro Culture of Embryo (IVC)
5- Bovine Oviduct Epithelial Culture (BOEC)
6- Mass Production of Embryo

مواد و روش‌ها

تهیه محیط‌های کشت: محیط کشت مورد استفاده برای بلوغ آزمایشگاهی تخمک بر پایه TCM-199[7] (Sigma, USA) به همراه ١٠ درصد سرم غیرفعال شده گاو و هورمون‌های گنادوتروپینی HCG (Bionich, Australia) به‌میزان ١ واحد در میلی لیتر، FSH(Bioniche, Canada) به‌میزان ١ واحد در میلی‌لیتر و استرادیول (Sigma, USA) به‌میزان ١ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. محیط شستشوی اسپرم شامل محیط پایه تالپ (باویستر و یاناگیماچی، ١٩٧٧) به‌علاوه لاکتات، پیروات، گلوکز (پاریش و همکاران، ١٩٨٨)، و کافئین (کاشیونی و همکاران، ٢٠٠١) بود. اساس محیط مورد استفاده در باروری آزمایشگاهی تخمک و اسپرم، محلول نمکی تالپ بود که با هپارین (١٠ واحد در میلی‌لیتر)، کافئین (٥ میلی‌مولار در میلی‌لیتر) و آلبومین گاوی (٦/٣ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) همراه گردید. یکی از محیط‌های کشت انتخابی جهت رشد زیگوت‌های به‌دست آمده در آزمایشگاه بر پایه TCM-199 بود که با ١٠ درصد سرم غیرفعال شده گاو (فاکوئی و اونو، ١٩٨٩)، آلبومین سرم گاو (٠/٠٨ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، سدیم پیروات (١ میلی‌مولار؛ باویستر و یاناکیماشیل، ١٩٩٧) و ال- گلوتامین (٠/٦ میلی‌مولار؛ داونز و هادسون، ٢٠٠٠) همراه گردید. محیط کشت KSOM[8] (Chemicon, USA) و محیط کشت SOF[9] نیز در آزمایشگاه تهیه شد.

جمع‌آوری و بالغ‌سازی تخمک: تخمدان‌ها از کشتارگاه در بافر سیلین فسفات[10] (NaCl، ٨ گرم بر لیتر؛ KCl، ٠/٢ گرم بر لیتر؛ Na_2HPO_4، ١/٤٤ گرم بر لیتر؛

7- Tissue Culture Medium 199
8- Potassium Optimum Media
9- Synthetic Oviduct Fluid
10- Phosphate Buffer Saline (PBS)

Archive of SID

www.SID.ir

KH_2PO_4، ۰/۲٤ گرم بر لیتر) دارای استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (۱۰۰ IU/ml) با درجه حرارت ۳۵ درجه به آزمایشگاه منتقل شدند. تخمدان‌ها با اتانول ۷۰ درصد و بافر سیلین‌فسفات ۳۵ درجه، شستشو شدند. فولیکول‌های سالم و شفاف (۲ تا ۸ میلی‌متر) با سوزن استریل شماره ۱۸ متصل به پمپ خلاء با فشار منفی ۵۰ میلی‌متر جیوه، آسپیره شدند. تخمک‌های مناسب دارای توده کومولوسی شفاف و حداقل ۳ لایه سلولی متراکم و منظم و سیتوپلاسم یکنواخت از درون مایع فولیکولی جمع‌آوری شدند. تخمک پس از دو بار شستشو در محلول نمکی تیرود، به قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط کشت بالغ‌سازی در زیر روغن پارافین (Sigma, USA) که به‌مدت ۲ ساعت در انکوباتور با فشار ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند، منتقل شدند.

شستشو و شناورسازی اسپرم[1] بعد از یخ‌گشایی: برای آماده‌سازی اسپرم (ایرانی- طهمور، کد: ۱۲۹۲۱۵) از روش شناورسازی استفاده گردید. در هر مرحله یک پایوت اسپرم ۰/۵ میلی‌لیتری استفاده شد که پس از ذوب در دمای ۳۵ درجه در محیط هیپس- تالپ تخلیه، سانتریفیوژ و شستشو داده شد. رسوب نهایی اسپرم پس از شستشو در ۱ میلی‌لیتر از محیط هیپس- تالپ، به‌مدت ۱ ساعت جهت شناورسازی در انکوباتور قرار گرفت. سپس میزان ۸۰۰ میکرولیتر از محیط بالایی آن، جهت تزریق به قطرات IVF، در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد.

برداشت اوویداکت و کشت سلول‌های پوششی: در کشتارگاه لوله‌های رحم گاوهای جوانی که تخمدان آنها دارای فولیکول بالغ نزدیک به تخمک‌ریزی بود، گرفته شدند و به همراه بافر سیلین فسفات به آزمایشگاه منتقل گردیدند و پس از شستشوی مختصر با اتانول ۷۰ درصد و بافر سیلین ۳۵ درجه مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از جداسازی بافت‌های زاید و شیپور فالوپ، اوویداکت در داخل پتری‌دیش دارای بافرسیلین فسفات استریل قرار گرفت و به‌وسیله یک لام استریل و فشار به‌دست آمده از حرکت لام از سمت رحمی اوویداکت (استیموس) به‌سمت تخمدانی آن (آمپول)، سلول‌های پوششی به شکل توده سلولی زرد رنگ از پوششی لوله رحم خارج شدند. این توده سلولی به لوله فالکون دارای ۵ میلی‌لیتر بافر سیلین فسفات استریل ۳۵ درجه، همراه با ۱۰ درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین منتقل گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه ورتکس در معرض جریان گردابی قرار گرفت. پس از ته‌نشینی رسوبات، بخش بالایی سوسپانسیون به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ RPM، سانتریفیوژ شد. رسوب به‌دست آمده با ۱ یا ۲ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM[2] به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گوساله[3]، ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، با دمای ۳۵ درجه، همگن شد. ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون به‌دست آمده دارای سلول‌های پوششی لوله رحم به قطرات ۸۰ میکرولیتری، به محیط کشت DMEM که زیر روغن از پیش انکوبه شده بود، تزریق گردید و در انکوباتور ۳۸ درجه به‌مدت ٤٨ ساعت کشت داده شدند.

ارزیابی رویان در مراحل مختلف تکوین: برای ارزیابی بلوغ هسته از رنگ فلورسنت ٤-٦- دی‌آمیدینو ۲- فنیل ایندول (DAPI)[4] استفاده شد. زیگوت‌های تازه بارور شده[5] (پس از هضم آنزیمی سلول‌های کومولوس اطراف آن) و رویان‌ها در مراحل مختلف تکوین توسط بافر سیلین فسفات شستشو داده شدند و با محلول پارافرمالدئید[6] ٤ درصد، به‌مدت ۲۰ دقیقه ثابت گردیدند. پس از ۳ بار شستشو در محلول PBS، رویان‌های اولیه به‌مدت ۱۵ دقیقه در داخل محلول رنگ‌آمیزی DAPI قرار گرفتند. بعد از ۳ بار شستشوی مجدد با PBS، رویان‌ها به داخل قطره دارای محلول حفظ‌کننده فلورسنس آنتی‌فید[7] (پروپیل‌گالات ۲۱ درصد) روی لام منتقل شدند و با لامل و لاک محصور

1- Swim-Up

2- Dulbecco's Modified Eagle's Medium
3- Fetal Calf Serum
4- 4-6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)
۵- تشخیص تخمک‌های بارورشده و بارورنشده از لحاظ ظاهری بسیار مشکل می‌باشد.
6- Paraformaldehyde
7- Fluorescence Anti-Fade

Archive of SID

www.SID.ir

گردیدند. پیشرفت جنین‌ها علاوه‌بر مشاهده ظاهر مورفولوژیک آنها، توسط رنگ‌آمیزی هسته و ارزیابی فلورسنت نیز مورد تأیید قرار گرفت (میکروسکوپ فلورسنت Olympus مدل BX51).

طرح‌های آزمایشی مورد استفاده: سلول‌های اوویداکت در قطرات محیط کشت DMEM (زیر روغن) کشت داده شدند و پس از رشد و چسبندگی، مورد استفاده برای هم‌کشتی با رویان‌ها قرار گرفتند. محیط‌های کشت باروری و کشت رویان در زمان ضرورت با سلول‌های پوششی انکوبه شده و قطرات، آماده ورود به طرح‌های آزمایشی مختلف شدند.

طرح آزمایشی ۱ (بررسی تأثیر هم‌کشتی سلول‌های پوششی بر تکوین رویان): تخمک‌های بالغ شده و اسپرم در محیط Fertile-TALP لقاح داده شدند. رویان‌ها به‌مدت ۸ الی ۹ روز پس از IVF در دمای ۳۸ درجه و فشار دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و رطوبت ۹۶ درصد، با سلول‌های پوششی در محیط TCM-199 به‌علاوه ۱۰ درصد سرم مورد هم کشتی قرار گرفتند. پیشرفت رویان‌ها در مراحل مختلف ٤ سلولی، ۸ سلولی و بلاستوسیست ثبت گردید. همچنین تعدادی از تخمک‌های بارور شده نیز در ۳ محیط کشت TCM-199، SOF[1] و KSOM[2] بدون حضور سلول‌های پوششی کشت داده شدند. شرایط تعریف شده برای هر محیط کشت ۳ بار تکرار گردید. میانگین درصدهای به‌دست آمده با استفاده از آزمون کای‌مربع تصحیح شده[3] و فیشر[4] آنالیز و میانگین نتایج به‌دست آمده در سطح اطمینان ۵ درصد بررسی شد.

طرح آزمایشی ۲ (بررسی تأثیر هم‌کشتی سلول‌های پوششی بر باروری تخمک): محیط کشت Fertile-TALP به همراه سلول‌های پوششی لوله رحم در دمای ۳۸ درجه و فشار دی‌اکسیدکربن ۵ درصد در انکوباتور قرار گرفتند و تخمک‌های بالغ به همراه اسپرم (غلظت نهایی ۳۰۰ هزار به‌ازای ۳۰ تخمک در هر قطره) به‌مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در آن کشت داده شدند. رویان‌های به‌دست آمده پس از حذف آنزیمی کومولوس‌ها وارد محیط کشت رویان TCM-199 که با سیستم هم‌کشتی همراه بود، شدند. در مقابل، تعدادی از تخمک‌های بالغ شده در حضور نداشتن سلول‌های اوویداکت بارور شدند و در حضور نداشتن این سلول‌ها در ۳ نوع محیط کشت مختلف TCM-199، SOF و KSOM قرار گرفتند. معیار ارزیابی و مقایسه عملکرد محیط‌ها، تعداد رویان ۲ سلولی، ۲٤ تا ٤۸ ساعت بعد از باروری بود. برای هر محیط، آزمون ۳ بار تکرار، و میانگین داده‌ها به‌صورت درصد توسط تست کای‌مربع و آزمون فیشر در سطح اطمینان ۵ درصد بررسی شد.

طرح آزمایشی ۳ (مقایسه دو محیط کشت TCM-199 و SOF در تکوین رویان گاو): انتخاب بهترین محیط کشت پایه برای استفاده در کشت رویان بعد از باروری از اهداف دیگر این پژوهش بود؛ بنابراین محیط‌های کشت در شرایط غیرهم‌کشتی مورد استفاده قرار گرفتند. رویان‌های به‌دست آمده بعد از باروری در محیط کشت IVF، در دو محیط SOF و TCM-199 به‌مدت ۹ روز کشت داده شده و تمام مراحل تکوین در ساعات خاصی از کشت ارزیابی شدند. درصد تولید رویان‌های ۲، ٤، ۸ و ۱٦ سلولی، مرولا و بلاستوسیست در ٦ دوره زمانی ۱۸ تا ۲٤ ساعت، ٤۲ تا ۵۲ ساعت، ۷۲ ساعت، ۹٦ ساعت، ۱۲۰ ساعت و ۱٤٤ ساعت بعد از باروری ارزیابی شدند و درصدهای به‌دست آمده در دو محیط کشت مقایسه گردیدند. هر یک از درصدهای ارایه شده میانگین ۳ آزمایش متفاوت بود که در مجموع منجر به تکوین ۱۷۷ رویان از مرحله تک‌سلولی در محیط کشت TCM-199 و تکوین ۱۳۸ رویان از مرحله تک‌سلولی در محیط کشت SOF شد. مراحل مختلف تکوین با استفاده از تست‌های کای‌مربع و فیشر در سطح اطمینان ۵ درصد، مورد بررسی قرار گرفتند.

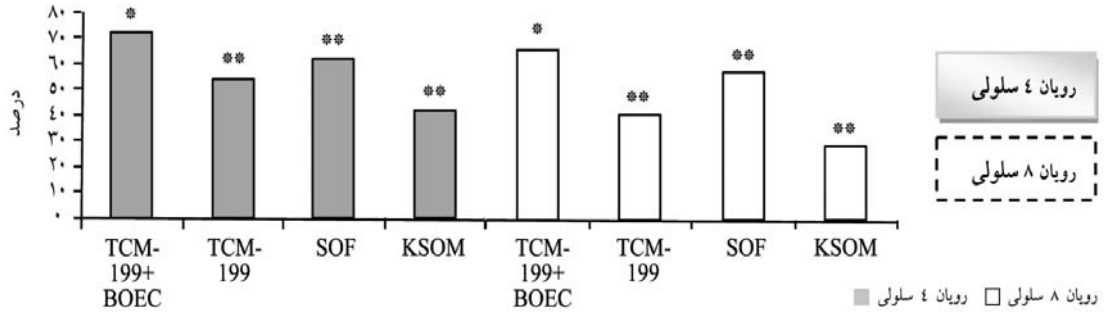
1- Synthetic Oviduct Fluid
2- Potassium Optimum Media
3- Yates Corrected Chi-Square
4- Fisher Exact

Archive of SID

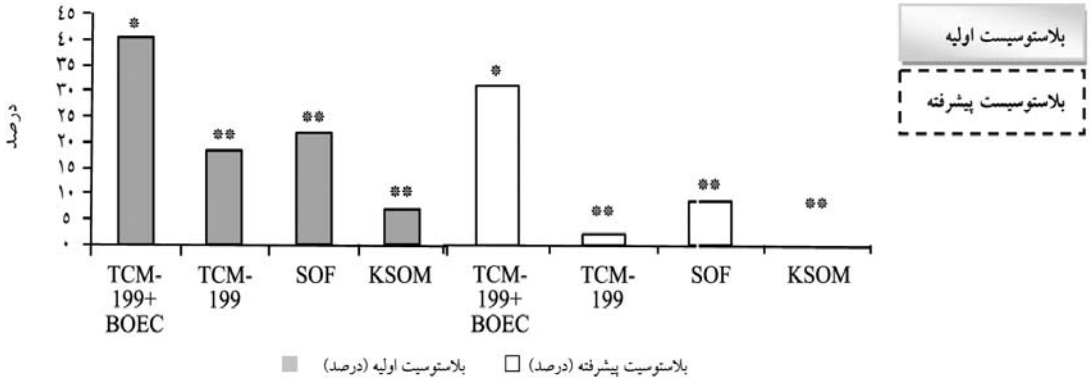
www.SID.ir

نتایج

آزمون اول: مقایسه محیط‌های مختلف کشت و هم‌کشتی سلول‌های پوششی لوله رحم گاو در تکوین رویان در مراحل مختلف رشد: این نتایج که در شکل‌های ۱ و ۲ و در جدول ۱ خلاصه شده‌اند، بیانگر وجود تفاوت کاملاً معنی‌داری ($P<0/05$) بین محیط‌های مختلف کشت می‌باشند. تولید رویان‌های ٤ و ٨ سلولی به‌دست آمده از محیط کشت TCM-199 به همراه سلول‌های پوششی اوویداکت، نسبت به سایر محیط‌های کشت از میزان بیشتری برخوردار می‌باشند. محیط کشت SOF نیز نسبت به محیط‌های کشت KSOM و TCM-199 موفق‌تر عمل کرده است؛ اما درصد به‌دست آمده دارای اختلاف معنی‌داری نیست. در مراحل انتهایی رشد، نسبت بلاستوسیست‌های به‌دست آمده از هم‌کشتی در محیط کشت پایه TCM-199 نسبت به سایر محیط‌های کشت از میزان بیشتری برخوردارند. در شرایط نبود هم‌کشتی نیز بین محیط‌های مختلف کشت اختلافاتی دیده می‌شود. محیط کشت SOF نسبت به سایر محیط‌ها از شرایط بهتری برای تکوین رویان برخوردار است.



شکل ۱- مقایسه درصد رویان‌های ٤ سلولی و ٨ سلولی تولید شده در محیط‌های کشت مختلف در ٤٨ ساعت و ٧٢ ساعت پس از باروری. TCM-199 (tissue culture medium-199)، BOEC (Bovine epithelial oviduct)، SOF (synthetic oviduct fluid)، KSOM (potassium optimum media).



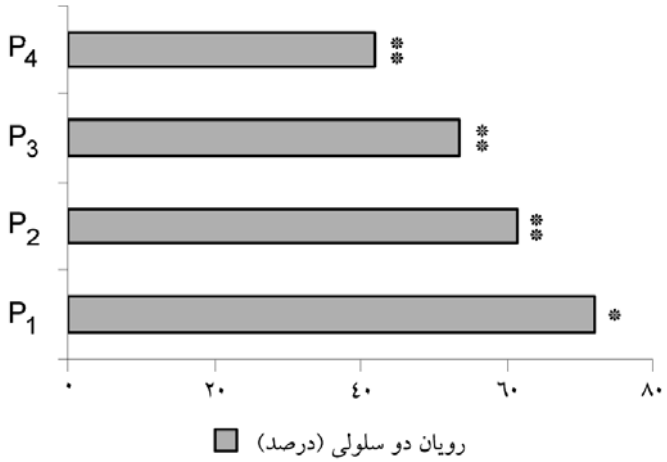
شکل ۲- درصد تولید بلاستوسیست اولیه و پیشرفته در شرایط هم کشتی و محیط‌های مختلف کشت. TCM-199 (tissue culture medium-199)، BOEC (Bovine epithelial oviduct)، SOF (synthetic oviduct fluid)، KSOM (potassium optimum media)

www.SID.ir

جدول ۱- درصد تولید رویان‌های ٤ سلولی، ۸ سلولی، بلاستوسیست اولیه و بلاستوسیست پیشرفته در روزهای مختلف بعد از کشت در حضور سلول‌های اوویداکت و در محیط‌های مختلف کشت.

محیط کشت	میانگین تعداد تخمک در ۳ بار تکرار	درصد رویان ٤ سلولی	درصد رویان ۸ سلولی	درصد بلاستوست اولیه	درصد بلاستوسیست پیشرفته (تعدادشمارش شده)
TCM-199+BOEC	۸۸	۷۲/۱۷	٦۸	٤۲	٤۲(۳۷)
TCM-199	۱۷۷	۵۳/٦	٤۲	۱۸/٤	۳(٤)
SOF	۱۳۸	٦۱/۵	۵۹	۲۱/۷	۱۱/۲۹(۱٦)
KSOM	۱۰۰	٤۲	۳۰	۷	۰(۰)

آزمون دوم: مقایسه راندمان باروری تخمک در شرایط حضور و حضور نداشتن سلول‌های اوویداکت گاو و در محیط‌های مختلف کشت رویان: مقایسه درصد رویان‌های دو سلولی در ٤۲ تا ٤۸ ساعت پس از لقاح نشان می‌دهد که لقاح در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های پوششی لوله رحم از موفقیت بالاتری برخوردار بوده و به تولید رویان‌های بیشتری منجر می‌گردد. اختلاف معنی‌دار گروه P_1 با سایر گروه‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است. تفاوت معنی‌داری بین درصد رویان‌های تولیدشده در مسیرهای P_1، P_2 و P_3 وجود نداشت.



شکل ۳- درصد تولید رویان‌های دو سلولی، ٤۲ تا ٤۸ ساعت پس از لقاح در شرایط متفاوت محیط‌های لقاح و کشت. لقاح در شرایط حضور و حضور نداشتن سلول‌های پوششی لوله رحم انجام شد و زیگوت‌های فرضی در محیط‌های مختلف کشت در حضور و حضور نداشتن سلول‌های پوششی قرار داده شدند. علامت * نشانگر گروه متفاوت با سایر گروه‌ها است و علامت ** به گروه‌های یکسان از لحاظ آماری اشاره می‌کند.

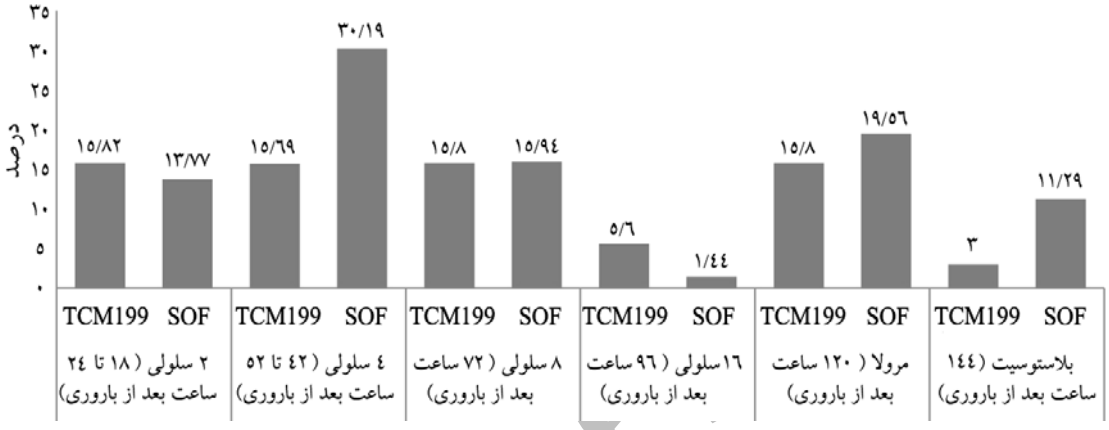
مسیرهای مورد استفاده به شرح زیر می‌باشند:

P_1: Fertile/TALP+BOEC (IVC; TCM-199+BOEC)
P_2: Fertile/TALP-BOEC (IVC; SOF-BOEC)
P_3: Fertile/TALP-BOEC (IVC; TCM-199-BOEC)
P_4: Fertile/TALP-BOEC (IVC; KSOM-BOEC)

آزمون سوم: بررسی سرعت تکوین رویان در دو محیط کشت TCM-199 و SOF: نمودار ٤، راندمان دو محیط کشت TCM-199 و SOF در حمایت از مراحل مختلف تکوین رویان گاو را نشان می‌دهد. در جدول ۲ نیز مقایسه راندمان عملکرد این دو محیط و کلیه مراحل رویانی در هر ساعت مشخص نشان داده شد. شکل ٤ و جدول ۲ مربوط به ساعات انتهایی تکوین رویان (از ۱۲۰ ساعت پس از لقاح به بعد) درصد تکوین مرولا و بلاستوسیست در محیط SOF بالاتر از محیط TCM-199 می‌باشد.

www.SID.ir

به‌عبارت دیگر، محیط SOF از شرایط بهتری برای حمایت از تکوین مراحل پیشرفته‌تر رویانی برخوردار است. در مقایسه، تکوین مراحل ۲ سلولی و ۸ سلولی با درصدهای مشابهی بین دو محیط SOF و TCM-199 صورت می‌گیرد. تکوین رویان ٤ سلولی به‌طور قابل‌توجهی در SOF بالاتر است. در مجموع محیط SOF در شرایط نبود هم‌کشتی با سلول‌های پوششی لوله رحم، از شرایط بهتری برای تکوین رویان گاو در مقایسه با محیط TCM-199 برخوردار است.



شکل ٤- مقایسه درصد تکوین رویان گاو در مراحل مختلف در دو محیط کشت TCM-199 و SOF و زمان‌های مختلف پس از لقاح.

جدول ۲- بررسی مراحل پیشرفت تکوین رویانی در زمان‌های مختلف و در دو محیط کشت TCM-199 و SOF.

مرحله رویانی	محیط کشت	روز بعد از IVF						
		۱۸-۲٤ ساعت	٤۵-۵۲ ساعت	۷۲ ساعت	۹٦ ساعت	۱۲۰ ساعت	۱٤٤ ساعت	روز نهم
۲ سلولی	TCM-199	۱۵/۸۲	۲۰/۳*	۸/٤	۱۰/۷*			
	SOF	۱۳/۷۷	۱۸/٤	۱۰/۲	۸			
۳سلولی	TCM-199	۲	۵	۵	۲			
	SOF	۷/۳	۱۱	۸	۳			
٤ سلولی	TCM-199	٤	۱۵/٦۹	۷/۳٤	۸/٤			
	SOF	۱	۳۰/۱۹*	۲۰/۲۹	۳			
۸ سلولی	TCM-199		۱۲	۱۵/۸	٤			
	SOF		۱۵/۵*	۱۵/۹٤	۸/٦			
۱٦ سلولی	TCM-199		۱۰/۱٦*	۱۱*	۵/٦	۵/٦*		
	SOF		۰/۷	٤/۳	۱/٤٤	٤/۳		
مرولا	TCM-199			۷/۳	۲٤/۲	۱۵/۸	۱۵/۲۵	۱۵/۸*
	SOF			۰/۷	۲٤/٦	۱۹/۵٦	۲۱*	۸/٦۹
بلاستوسیست	TCM-199							۳
	SOF							۱۱/۲۹*

علامت * نشانگر تفاوت معنی‌دار بین دو محیط کشت در هر ساعت مشخص می‌باشد.

Archive of

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

هدف اصلی این پژوهش انتخاب یک محیط کشت مطلوب از میان ۳ محیط کشت رایج در تولید آزمایشگاهی رویان گاو و بهره‌مندی از آن در سیستم هم‌کشتی بود. محیط کشت مناسب شرایط بهتری برای تکوین اولیه رویان و امکان تولید انبوه رویان گاو شیری در شرایط آزمایشگاهی را فراهم می‌آورد. سلول‌های پوششی لوله رحمی برای کشت رویان نشخوارکنندگان توسط یستون و فرست (۱۹۸۹) به‌کار گرفته شد و بنابراین در این پژوهش نیز از بین طیف وسیعی از سلول‌های بدنی در سیستم هم‌کشتی استفاده شد.

یافته‌های این آزمایش نشان داد راندمان IVF در حضور سلول‌های پوششی نسبت به سایر مسیرهای انتخابی بالاتر بود. درصد رویان‌های دو سلولی در ۲٤ تا ٤۸ ساعت پس از لقاح در مسیری که در دو مرحله باربری و کشت از سیستم هم‌کشتی استفاده شد؛ معادل ۷۲ درصد و بالاتر بود (شکل ۳). راندمان IVC نیز در حضور سلول‌های پوششی در محیط کشت TCM-199 نسبت به شرایط بدون هم‌کشتی (در محیط SOF، TCM-199 و KSOM) مؤثرتر بود. درصد تولید رویان‌های ٤ سلولی، ۸ سلولی و بلاستوسیست در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های پوششی لوله رحم از اختلاف معنی‌داری در مقایسه با سایر محیط‌ها برخوردار بود (شکل‌های ۱ و ۲ و جدول ۱).

کامرگو و همکاران (۲۰۰٦) نقش مؤثر هم‌کشتی را در تولید آزمایشگاهی رویان در مسیرهای باروری و کشت رویان گزارش کردند. آنها به حذف بعضی سوبستراهای مضر و افزایش فاکتورهای رشد در محیط کشت در شرایط هم‌کشتی اشاره می‌کنند. هم‌کشتی با مکانیسم ناشناخته از توقف تکوین رویان در مراحل اولیه ممانعت به‌عمل می‌آورد (چن و همکاران، ۱۹۹٤). بهبود تکوین رویان در محیط TCM-199 به همراه سلول‌های پوششی نسبت به شرایط نبود هم‌کشتی، می‌تواند به خنثی‌شدن مواد سمی به‌دست آمده از متابولیسم گلوکز توسط سلول‌های بدنی و بنابراین کاهش تنش‌های متابولیکی مربوط گردد (اورسی و لیز، ۲۰۰٤). در شرایط هم‌کشتی، افزایش سرعت تکوین و درصد تسهیم (ساکاس و همکاران، ۱۹۸۹)، افزایش راندمان تولید بلاستوسیست (رکسرود، ۱۹۸۹) و کاهش تعداد بلاستوسیست‌های با کیفیت پایین (کارنی و همکاران، ۱۹۹۰) نیز گزارش شده‌اند.

در صورت استفاده نکردن از سلول‌های پوششی در روند IVF و IVC، تخمک‌های بارور شده که در محیط SOF کشت داده شدند، مراحل تکوین را نسبت به TCM-199 در شرایط بهتری طی کردند (شکل ٤ و جدول ۲). محیط کشت SOF از سطوح انرژی قابل مقایسه با خون، میزان آلبومین سرمی و گلوتامین مشابه با ترکیبات مایع لوله رحمی و سطوح معتدل‌تر پیروات نسبت به TCM-199 برخوردار است. غلظت گلوکز، لاکتات، پیروات، کلسیم، کلراید، پتاسیم، سدیم و منیزیم در محیط کشت SOF نسبت به TCM-199 شباهت بیش‌تری به غلظت این مواد در مایع لوله رحمی دارد (ترویت و همکاران، ۱۹۷۲). از این‌رو به اهمیت بهره‌گیری از ترکیبات مایع لوله رحمی، در تکامل رویان پستانداران از جمله گاو تأکید شده است (کویین و همکاران، ۱۹۹۵). نقش گلوکز به‌عنوان عامل مهارکننده رشد رویان در مرحله ۲ سلولی تا ۸ سلولی نیز تأیید شده است (وایتن، ۱۹۵٦). بنابراین در محیط‌های کشت مصنوعی از جمله TCM-199 نباید این مسأله فراموش گردد. که غلظت بالای سرم در کنار TCM-199 می‌تواند از دلایل موفق نبودن آن در تکوین رویان باشد (شکل ٤)؛ زیرا سرم به‌عنوان یک منبع غنی از اسیدهای چرب، موجب عدم تعادل در متابولیسم لیپیدی شده و به تنش متابولیسمی می‌انجامد (کامرگو و همکاران، ۲۰۰٦). احتمالاً همراه کردن این محیط کشت با سلول‌های بدنی، سبب بهبود آن گردید (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که تکوین رویان در حضور سلول‌های پوششی لوله رحم و محیط کشت TCM-199 نسبت به شرایط فاقد هم‌کشتی موفق‌تر بود. همچنین عملکرد بهتر TCM-199 همراه هم‌کشتی نسبت به محیط‌های پایه SOF، TCM-199 و KSOM مشاهده گردید. محیط SOF به تنهایی نسبت به حضور مداوم TCM-199 موفق‌تر بود. استفاده از هم‌کشتی در محیط‌های کشت فقیر و توجه به نیازهای رویان به عناصر مختلف و ضرورت طراحی یک سیستم کشت متوالی از دستاوردهای این آزمایش بود.

سپاسگزاری

از راهنمائی‌های اساتید راهنما و مشاور و کمک‌های آقای نقره‌ای کارشناس محترم بخش فیزیولوژی و سرکار خانم کهن‌قدر کارشناس محترم بخش بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد در طول انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع

1.Bavister, B.D., and YanagimachiI, R. 1977. The Effects of Sperm Extracts and Energy Sources on the Motility and Acrosome Reaction of Hamster Spermatozoa in vitro. Biology of Reproduction, 16: 228-237.
2.Biggers, J.D., Gwatkin, R.B., and Brinster, R.L. 1962. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. Nauchni. Tr. Vissh. Med. Inst. Sofiia, 194: 747-749.
3.Camargo, L.S.A., Viana, J.H.M., Ferreira, S.W.F., Ramos, A.M., Vale, A.A., Filho, V.R. 2006. Factors influencing In vitro embryo production.Anim. Reprod, 3: 19-28.
4.Carney, E.W., Tobback, C., and Foote, R.H. 1990. Co-culture of rabbit onecell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. In Vitro Cell Dev. Biol. 26: 629-35.
5.Chen, H.F., HO, H.N., Chen, S.U., Chao, K.H., Lin, H.R., Huang, S.C., Lee, T.V., and Yang, Y.S. 1994. Peptides extracted from vero cell culture overcome the blastocyte block of mouse embryo in a serum free medium. Assist. Reprod. Gen. 11: 3. 165-171.
6.Coscioni, A.C., Reichenbach, H.D., Schwartz, J., Lafalci, V.S., Rodrigues, J.L., and Brandelli, A. 2001. Sperm function and production of bovine embryos in vitro after swim-up with different calcium and caffeine concentration. Anim. Reprod. Sci. 67: 1-2. 59-67.
7.Downs, S.M., and Hudson, E.D. 2000. Energy substrate and the completion of spantaneouse meiotic maturation. Zygote, 8: 339-351.
8.Eyestone, W.H., and First, N.L. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fertil. 85: 715-20.
9.Fukui, Y., and Ono, H. 1989. Effects of sera, hormones and granulose cells added to culture medium for in vitro fertilization, maturation, cleavage and development of bovine oocyte. J. Reproduction and Fertility, 86: 501-506.
10.Giscard, d'Estaing, S., Lornage, J., Hadj, S., Boulieu, D., Salle, B., and Guerin, J.F. 2001. Comparison of two blastocyst culture systems: coculture on Vero cells and sequential media. Fertil. Steril. 76: 1032-1035.
11.Klumpp, A.M. 2004. In vitro maturation (IVM), in vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVC) of bovine oocytes. Department of Animal Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana.
12.Kreysing, U., Nagai, T., and Niemman, H. 1997. Male dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine in vitro fertilization systems and effect of casein phosphopeptides (CPPs). Reprod. Fertile. Dev. 9: 465-474.
13.Orsi, N.M., and Leese, H.J. 2004. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. Theriogenology, 61: 561-572.
14.Orsi, N.M., and Reisch, J.B. 2007. Mamalian embryo co-culture:trials and tribulation of a misunderstood method. Theriogenology, 67: 441-458.

Archive of SID

www.SID.ir

15.Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A., and First, N.L. 1988. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. Biology of Reproduction, 38: 1171-1180.
16.Quinn, P., Moinipanah, R., Steinberg, J.M., and Weathersbee, P. 1995. Successful human in vitro fertilization using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate ions. Fertil. Steril, 63: 922-924.
17.Rexroad, Jr.C.E. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. Theriogenology, 31: 105-114.
18.Sakkas, D., Batt, P.A., Cameron, A.W. 1989. Development of preimplantation goat (Capra hircus) embryos in vivo and in vitro. J. Reprod. Fertil. 87: 359-365.
19.Tervit, H.R., Whittingham, D.G., and Rowson, L.E.A. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fertil. 30: 493-497.
20.Whitten, W.K. 1956. Culture of tubal ova. Nature 179, 1081-1082.

Archive of SID

www.SID.ir

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 16(Special issue 2), 2009
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

The effects of bovine oviduct epithelial cell co-culture on the development of preimplantation bovine embryo

[*]M. Eshaghi[1], Y. Jafari Ahangari[2] and [*]H. Dehghani[3]
[1]Former M.Sc. Student, Dept. of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,
[2]Associate Prof., Dept. of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,
[3]Assistant Prof., Dept. of Veterinary, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

Co-culture systems have been used to increase the quality of in vitro-produced mammalian embryos, to simulate the in vivo conditions, to support in vitro culture media, and to decrease the level of environmental and metabolic stresses on the in vitro-cultured embryos. The specific objectives of this research were to evaluate the effects of bovine oviduct epithelial cell (BOEC) co-culture on the in vitro fertilization and in vitro development of bovine preimplantation embryos. First, in vitro matured oocytes were fertilized and cultured in different media in the presence and the absence of BOEC cells. Development of these embryos were evaluated and compared at 4-cell, 8-cell, and blastocyst stages. The medium TCM-199 plus BOEC co-culture had the best performance in supporting the development of 4-cell, 8-cell, and blastocyst embryos. Co-culture with BOEC cells during in vitro fertilization, also resulted in an increase in the rate of 2-cell embryo production. The percentage of 2-cell embryos produced in TCM-199+BOEC cells was significantly higher (72.17%) than that in TCM (53.6%), SOF (61.5%), and KSOM media (42%) without BOEC co-culture. To evaluate the net effects of SOF and TCM-199 media apart from the effects of co-cultured cells, the presumably fertilized oocytes were cultured in two groups; SOF and TCM-199, and their development to the blastocyst stage was recorded at different hours post fertilization. Although, TCM-199 medium supported the development of early stages slightly better than SOF, the situation reversed after 16-cell stage and the number of morula and blastocyst stage embryos was significantly higher in SOF medium. Results of this research show that co-culture with BOEC cells increases the efficiency of in vitro fertilization and the number of embryos produced at different stages of preimplantation. In the absence of co-culture conditions, SOF medium overall is a better medium than TCM-199 for the in vitro culture of preimplantation bovine embryo.

Keywords: Embryo development; Culture medium; Epithelium oviduct cell; Co-culture

* Corresponding Author; Email: isacci60@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir