بررسی لقاح و کشت جنین گاوی در سیستم هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش

مهدی احمدی‌فر[1]، علی محمدعینی[2*]، ریحانه ناطقی[3]، نازیلا وحیدی ایریسفلی[4]

۱. پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران

۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

٤. دانشکده زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، سمنان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۸)

چکیده

سابقه و هدف: یکی از پرکاربردترین منابع سلولی در مهندسی بافت و بهینه‌سازی محیط‌های کشت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) می‌باشد. در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی موش به عنوان هم‌کشتی مورد استفاده قرار گرفت. از آنجاییکه مشکل عمده روش کشت جنین در شرایط آزمایشگاهی قابلیت حیاتی کاهش یافته جنین‌های آزمایشگاهی در مقایسه با همتاهایشان در شرایط حیاتی است، هدف از این مطالعه ارزیابی لقاح و کشت جنین گاوی در هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (ADMSCs) است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، پس از آماده سازی وجداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی، این سلول‌ها در کف چاهک‌ها کشت شدند. سه روز پس از کشت سلولی، تخمک و جنین‌های گاوی به روی تک لایه منتقل گردید و تا ۷ روز کیفیت بلوغ و نوع تسهیم سلولی بررسی گردید.

یافته‌ها: میزان بلوغ و زنده‌مانی و تسهیم سلولی جنین‌ها تا روز هفتم ارزیابی شد. این مطالعه نشان داد که هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمال بطور معنی‌داری زنده‌مانی و تسهیم جنین را در مقایسه با گروه کنترل (جنین‌های بدون هم‌کشتی) افزایش داده است ($P<0/05$)، بطوریکه میزان بلوغ تخمک‌های گاوی گروه هم‌کشتی با سلول‌های مزانشیمال نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۸۲ و ۷۸ درصد و همچنین میزان تقسیم سلولی تا مرحله بلاستوسیست در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب ۳۳ و ۲۶ درصد بوده است.

نتیجه گیری کلی: نتایج کلی طرح نشان می دهد که تسهیم جنین در مقایسه با جنین های بدون هم کشتی افزایش و میزان تقسیم سلولی نیز افزایش داشته است.

کلیدواژگان

جنین گاوی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هم‌کشتی.

* نویسنده مسئول، رایانامه: ali.meini@gmail.com

مقدمه

تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی یک تکنولوژی زیستی تولید مثلی است که پتانسیل عظیمی را جهت تسریع پیشرفت ژنتیکی در دام‌ها فراهم می‌کند. همچنین این امر ابزار تحقیقاتی مهمی در زمینه جنین‌شناسی حیوانات به شمار می‌رود (۱و۳). پیشرفت‌های اخیر در رابطه با رویه کلون کردن جنین دام‌ها در شرایط آزمایشگاهی تا حدودی بستگی به هزینه فراهم کردن تخمک‌های بالغ دارد، بطوری‌که به یک سلول جنینی واحد اجازه داده تا به یک جنین حیاتی و در نتیجه به یک کلون جنینی تبدیل شود (۲).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی[1] سلول‌هایی چند توان هستند که در مغز استخوان، عضله، پوست و بافت چربی یافت می‌شوند و توانایی تمایز به انواع سلول‌های استخوانی، غضروفی، چربی و عصبی را دارند. طی سال‌های اخیر، MSCs تحت عنوان سلول‌های بنیادی مشتق از چربی[2] از بافت چربی به دست آمده است (۸). به دلیل سهولت در دستیابی به بافت چربی زیر جلدی از طریق لیپوساکشن یا اعمال جراحی معمولی دیگر، ADSCs یکی از کاندیدهای ارزشمند در سلول درمانی و مهندسی بافت محسوب می‌شوند (۹). این سلول‌ها در کشت تک لایه‌ای از نظر مورفولوژی با ظاهر شبه فیبروبلاستی، مشابه دیگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده و توان تمایز به رده‌های مختلف سلولی را دارا می‌باشند (۱۰).

بطور کلی مشکل عمده روش کشت جنین در شرایط آزمایشگاهی قابلیت حیاتی کاهش یافته جنین‌های آزمایشگاهی در مقایسه با همتاهایشان در شرایط حیاتی است (۴و۵). جهت ارتقای بازده کار در حال حاضر تحقیقات توجه خود را به تمامی فاکتورهای موثر بر گامت‌های والدینی در مرحله قبل ازجمع آوریشان و همینطور این مطلب که چگونه گامت‌ها و جنین‌ها نسبت به سیستم‌های کشت متفاوت واکنش نشان می‌دهند، متمرکز کرده‌اند از این رو هدف این پژوهش، بررسی هم‌کشتی جنین‌های گاوی بر روی تک لایه‌ی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بلوغ، لقاح و کشت اووسیت‌ها به صورت کاملا تصادفی در دو گروه کنترل و گروه هم‌کشتی بررسی گردید.

از محیط TCM-199[3] (sigma, St Louis ,MO, USA) استفاده شد که به هر میلی لیتر آن ۱۰ درصد سرم جنین گاوی[4]، ۱ میکروگرم بر میلی لیتر استرادیول،۵ واحد بین المللی در میلیلیتر FSH و ۵ واحد بین المللی در میلیلیترHCG و ۲/۲ میلی مولار سدیم پیرووات اضافه گردید.

از HTCM (sigma, St Louis, MO, USA[5]) به عنوان محیط شستشوی تخمک‌ها استفاده شد که به هر میلی‌لیتر آن ۱۰ درصد FBS، ۰/۲۵ میلی مولار سدیم پیرووات و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید.

برای ساخت محیط آسپیراسیون نیز ازمحیط پایه HTCM استفاده شد که به هر میلی‌لیتر آن ۱۰ درصد FBS، ۰/۲۲ میلی مولار سدیم پیرووات و ۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر جنتامایسین به‌همراه ۱۰۰ واحد هپارین اضافه گردید.

محیط DMEM[6]جهت کشت سلولی از شرکت سیگما و سرم جنین گاو و آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین از شرکت Gibco خریداری شد.

1. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)
2. Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs)

3. Tissue Culture Medium 199
4. Fetal Bovine Serum (FBS)
5. Hepessed Tissue Culture Medium
6. Dulbecco's Modified Eagle's Medium

جمع‌آوری، بلوغ و لقاح اووسیت‌ها

تخمدان‌های گاو ازکشتارگاه جمع‌آوری و در محلول بافر سالین فسفات (PBS) حاوی جنتامایسین در دمای ۳۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد و حداکثر ظرف مدت ۳ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس فولیکول‌های شفاف ۲ تا ۸ میلی‌متری این تخمدان‌ها توسط سوزن شماره ۱۸ آسپیره شده و در زیر استریومیکروسکوپ کمپلکس‌های اووسیت-کومولوس[1] که حداقل ۴-۳ لایه سلول کومولوس و سیتوپلاسم یک نواخت و تیره داشتند انتخاب شده و سپس ۳ بار در محیط شستشو شسته شدند. در مرحله بعد COC ها به قطره‌های ۱۰۰ میکرو لیتری محیط‌های بلوغ در زیر روغن مینرال منتقل شدند و در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد تحت ۵٪ CO2 به مدت ۲۴-۲۲ ساعت انکوبه شدند.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی موش

در این مطالعه، به منظور جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی تحت شرایط استریل اخذ و بصورت مکانیکی به قطعات کوچک تبدیل و با PBS شستشو داده شد. برای تجزیه بافت، به ازای هر یک گرم بافت چربی ۱/۵ میلی‌گرم آنزیم کلاژنازا در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه به کار گرفته شد. سپس سوسپانسیون تحت سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه قرار گرفته و در نهایت رسوب سلولی در محیط کشت DMEM حاوی آنتی بیوتیک پنی سیلین/ استرپتومایسین و FBS ۱۰٪ به فلاسک مخصوص کشت سلول منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی ۵٪ CO2 و رطوبت ۹۵٪ قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۲-۲۴ ساعت، سلول‌های شناور، با تعویض محیط از فلاسک حذف شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۳ روز یک بار تعویض گردید. سلول ها پس از ترپسینه شدن به مرحله پاساژ دو انتقال یافت و جهت استفاده آماده گردید.

تسهیم و تکوین جنین‌های گاوی

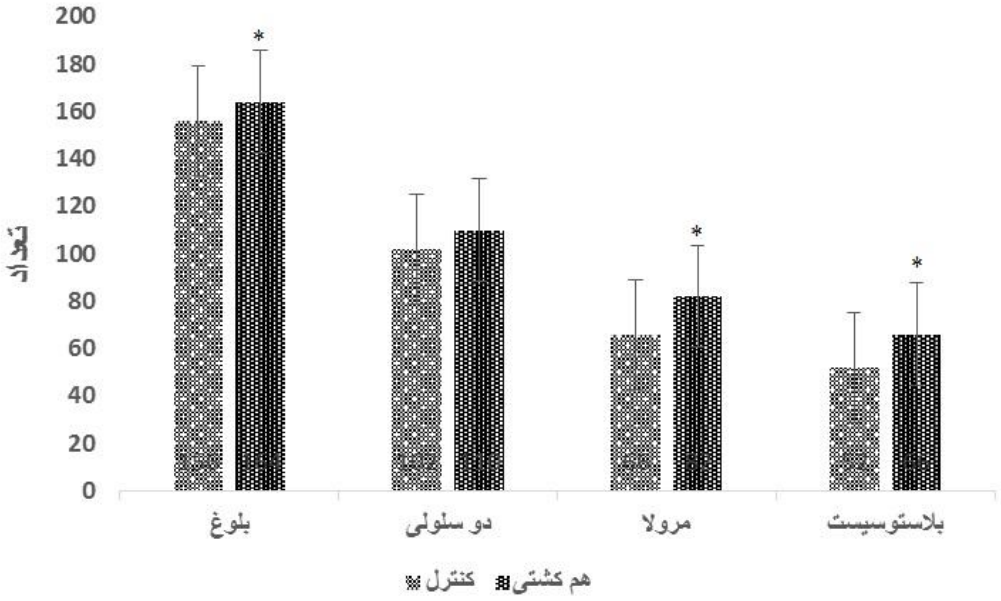
پس از دایجست کردن کومولوس‌های اطراف تخمک در قطره‌های لقاح حاوی هپارین سرم البومین در مجاورت اسپرم قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۰-۱۸ ساعت جنین‌ها به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و هم‌کشتی با تک لایه سلول‌های مزانشیمال درمحیط-های کشت کنترل و تیمار به همراه FBSو اسید آمینه-های ضروری و غیر ضروری منتقل شده و کشت شدند. محیط‌های کشت هر دو روز تعویض می گردید.

برای بررسی وجود تفاوت معنی دار بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و بدنبال آن از آزمون توکی (Tukey) برای تعیین تفاوت بین گروه‌های مختلف استفاده خواهد شد.

نتایج

این آزمایش بر روی ۲۰۰ تخمک با حداقل سه لایه کومولوس و سیتوپلاسم یکنواخت و تیره در هر گروه انجام شد که میزان بلوغ، زنده‌مانی و تسهیم سلولی جنین‌ها تا روز هفتم ارزیابی شد. این مطالعه نشان داد که هم کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمال بطور معنی‌داری زنده‌مانی و تسهیم جنین را در مقایسه با گروه کنترل (جنین‌های بدون هم‌کشتی) افزایش داده است (P<۰/۰۵). بطوریکه میزان بلوغ تخمک‌های گاوی گروه هم کشتی با سلول‌های مزانشیمال نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۸۲ و ۷۸ درصد و همچنین میزان تقسیم سلولی تا مرحله بلاستوسیست در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب ۳۳ و ۲۶ درصد بوده است (شکل ۱).

1. Cumulus- Oocyte Complex (COC)



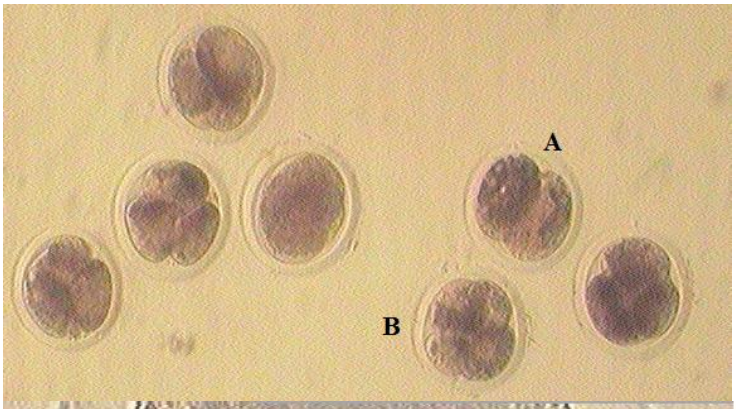
شکل ۱- میزان بلوغ، تسهیم و تکوین تخمک های گاوی در گروه های کنترل و هم کشتی

جدول ۱- میزان و درصد بلوغ، تسهیم و تکوین جنین گاوی گروه هم کشتی نسبت به گروه کنترل

گروه	بلوغ (٪)	دو سلولی (٪)	مرولا (٪)	بلاستوسیست (٪)
کنترل	۱۵۶ (۷۸)	۱۰۲ (۵۱)	۶۶ (۳۳)	۵۲ (۲۶)
هم کشتی	۱۶۴[a] (۸۲)	۱۱۰ (۵۵)	۸۲[a] (۴۲)	۶۶[a] (۳۳)

[a] سطح معنی داری ($P<0/05$)

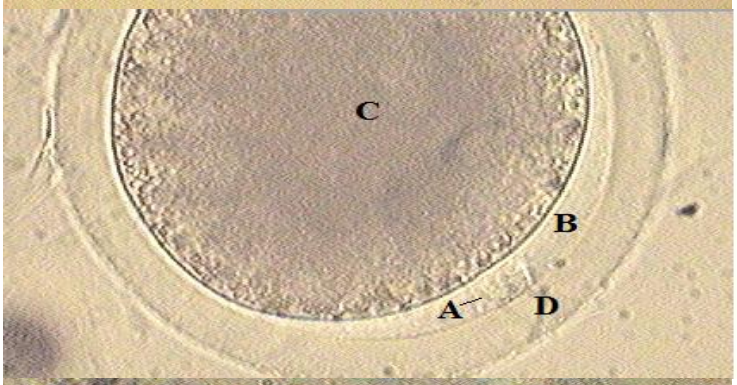
تعداد کل تخمک‌های بررسی شده برای هر گروه ۲۰۰ تخمک با کیفیت بالا (حداقل سه لایه کومولوس فشرده و سیتوپلاسم یکنواخت و تیره) می باشد.



شکل ۲- جنین های دو سلولی و چهار سلولی ۲۸ ساعت بعد از لقاح (با بزرگ نمایی X ۱۰۰)

A. تصویر جنین دو سلولی با بلاستومرهای یکسان

B. تصویر جنین چهار سلولی



شکل ۳- تخمک بالغ گاو به همراه تشکیل جسم قطبی(با بزرگ نمایی X ٤۰۰)

A. جسم قطبی

B. فضای پیش ویتیلینی

C. سیتوپلاسم تخمک

D. زوناپلوسیدا

شکل ٤- جنین دو سلولی گاو (با بزرگ نمایی X ٤۰۰)

A. بلاستومرهای یکسان دوتایی

بحث

تاکنون تلاش‌های بسیاری جهت ارتقای سیستم‌های کشتی انجام شده است. به عنوان مثال محققین بلوغ اووسیت‌ها را در گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند و تاثیر افزایش موادی از قبیل فاکتورهای رشد، هورمون‌ها، سرم و مایع فولیکولی را به محیط بلوغ سنجیدند. بررسی‌ها نشان داده افزودن مایع فولیکولی فولیکول‌های بزرگ به محیط بلوغ آزمایشگاهی هسته‌ای و سیتوپلاسمی اووسیت‌ها را در اووسیت‌های گاو و خوک پشتیبانی می‌کند (۱و۶).همچنین محققان بلوغ اووسیت‌های پستانداران را در محیط حاوی سرم یا بطور مشخص‌تری سرم آلبومین گاوی[1] مطالعه کردند (۱۵و۱۶). اگرچه به وضوح نشان داده شده که اتفاقات هسته‌ای بلوغ (به عنوان مثال از سرگیری میوز) در غیاب سرم اتفاق

1. Bovine Serum Albumin (BSA)

می‌افتد، قابلیت لقاح اووسیت‌ها پس از بلوغ در شرایط آزمایشگاهی در محیط حاوی سرم افزایش می‌یابد (۱۲و۱۴).

به نظر می‌رسد که قطر اووسیت یکی از فاکتورهایی است که بر توانایی آن جهت از سرگیری و تکمیل میوز در شرایط آزمایشگاهی تاثیر گذار است، فایر و همکارانش (۱۹۹۵) نشان دادند که اووسیت‌های کوچک تر از ۱۱۰میکرون توانایی کاهش تدریجی در از سرگیری میوز دارند، اخیرا در مطالعه‌ای دیگر ارتباط بین اندازه اووسیت واختلالات بین تقسیم میوزی در شرایط آزمایشگاهی به خصوص در مورد عدم آزاد سازی پولار بادی گزارش شده است (۱۸و۲۱).

فرایند بلوغ میتوزی و اکتساب پتانسیل تکوین، توانایی تخمک‌هایی را که متحمل لقاح، کلیواژ و تکوین جنین موفق می‌شود را تعیین می کند. این‌ها مراحل مهمی هستند که به تنوعی از فاکتورها وابسته است و منجر به آمادگی بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی می‌شود (۱۳و۱۵). بلوغ میوزی تخمک یک فرایند پیچیده است که شامل تشکیل[1] GVBD ، متراکم شده کروموزوم، تشکیل صفحه متافازی، تکمیل میوزI و آزادشدن اولین جسم قطبی[2] و توقف در متافازII است (۱۷و۲۱).

خطیر و همکارانش ناتوانی اووسیت‌های گوساله را در پاسخ دهی به مکمل‌های سرم یا مایع فولیکولی در طی بلوغ در شرایط آزمایشگاهی برای پیشرفت و رشد متعاقب در تکوین در طی کشت نشان دادند.آنها حدس می‌زنند که فقدان رسپتور برای گنادوتروپین‌ها یا فاکتورهای رشد دلیل عدم پاسخگویی است (۲۵،۲۴و۲۶).

فاکتورهای فیزیولوژیکی موثر در کسب قابلیت لقاح اووسیت هنوز کاملا شناخته نشده‌اند. گزارش‌هایی مبنی بر افزایش قابلیت لقاح اووسیت‌های گاوی پس از IVM در محیطی با سرم گاوی در مرحله پرواستروس یا استروس در مقایسه با سرم مرحله دی استروس یا مرحله پس از تخمک‌گذاری بر اهمیت تاثیرات هورمونی بر کسب قابلیت لقاح اووسیت طی IVM دلالت می‌کند. آماده‌سازی هورمونی اووسیت‌ها در کسب بلوغ سیتوپلاسمی مورد نیاز جهت شروع تکوین طبیعی بسیار حائز اهمیت است (۱۰،۱۱،۱۲و۱۳). بنابراین برای افزایش کارامدی IVM باید در ابتدا تمرکز ما بر ایجاد محیط کشتی بهینه باشد.

پیشنهاد

جهت ارتقای بازده کار در حال حاضر تحقیقات توجه خود را به تمامی فاکتورهای موثر بر گامت‌های والدینی در مرحله قبل از جمع آوری‌شان و همینطور این مطلب که چگونه گامت‌ها و جنین‌ها نسبت به سیستم‌های کشت متفاوت واکنش نشان می‌دهند، سیستم های هم‌کشتی در این راستا می‌توانند به بهبود تکوین و کیفیت جنین کمک بسزایی داشته باشند.

1. Germinal Vesicle Break Down (GVBD)
2. Polar Body (PB)

منابع و مآخذ

1. Banwell KM, Thompson JG. In vitro maturation of Mammalian oocytes: outcomes and consequences. Semin Reprod Med 2008; 26:162–174
2. Van Soom A, Mateusen B, Leroy J, de Kruif A. 2003. Assessment of mammalian embryo quality: What can we learn from embryo morphology? Reprod BioMed Online 7:664–670
3. Khurana NK, Niemann H. 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. Biol Reprod 62:847–856
4. ViuffD,ReckordsL,Offenberg H, Hyttel P, Avery B, GreveT,Olsaker I, Williams JL, Callesen H, Thomsen PD. 1999. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. Biol Reprod 60: 1273–1278.
5. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, andmessenger RNA expression. Biol Reprod, 2003; 68:236–243
6. Knijn HM, Gjorret JO, Vos PLAM, Hendriksen PJM, van der WeijdenBC, Maddox-Hyttel P, Dieleman SJ. Consequences of in vivo development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. Biol Reprod, 2003; 69:1371–1378.
7. Piquette GN. The in vitro maturation (IVM) of human oocytes for in vitrofertilization (IVF): is it time yet to switch to IVM-IVF? Fertil Steril 2006; 85:833–835
8. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. Cell Biochem Funct 2008; 26:664-75
9. Desando G, Cavallo C, Sartoni F, Martini L, Parrilli A, Veronesi F et al. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. Arthritis Res Ther 2013; 15:1-15
10. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecul Biol 2002; 13: 4279-95.
11. HXu J1, Wang W, Ludeman M, Cheng K, Hayami T, Lotz JC et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional alginate gels. Tissue Eng 2008; 14:667-80
12. Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation o human adiposederived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. Arthrit Rheum 2006; 54: 1222-32.
13. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24: 376–85.
14. Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, E Sato, M Matsuo and H Miyamoto,1990;6:131-169
15. Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. a. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. Mol Reprod Dev, 2003; 66:297– 305.
16. De La Fuente R, J.O,Brien M, Eppig JJ. Epidermal growth factor enhances preimplantation Developmental competence of maturing mouse oocytes. Hum Reprod 1999; 14: 3060-8.
17. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental, competence. Reproduction 2001; 121:51-75. 22.
18. Modina S, Luciano AM, Vassena R, Baraldi-Scasi L, Lauria A, Gandolfi F. Oocyte developmental

competence after in vitro maturation depends on the persistence of cumulus-oocyte communications which are linked to the intracellular concentration of Camp. Ital J Anat Embryol 2001;106:241-8.

19. Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. Dev Biol 1986; 113:517-521.

20. Eppig JJ, Downs SM. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin induced oocyte maturation. Dev Biol 1987; 119:313-321.

21. Jin-Tae Chung ,Activation of Bovine Oocytes Following Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI),1999; 39:213-221.

22. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. Annu Rev Physiol 2002;64: 69–92

23. Gjorret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larsson LI, Maddox Hyttel P,Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. Biol Reprod, . 2003; 69:1193–1200.

24. Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. Dev Biol 1986; 113:517-521.

25. Nadkarni K. In: Indian Materia Media. Nadkarni K.M., editor. Popular Prakashan; Bombay, India: 1976. 414–417.

26. Kuttan R., Bhanumathy P., Nirmala K., George M.C. Potential anticancer activity of turmeric (Curcuma longa) Cancer Lett. 1985; 29:197–202.