16. Dandekar PV, Martin MC, Glass RH. Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa cells. Fertil Steril. 1991; 55: 95-9.

17. Minns CL. Chapter: 11, Factors affecting embryological parameters and embryo selection. A textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction: Brinsden PR.(editor), Rains bury P. First edition. Parthenon publishing group Ltd 1992; P: 187-204.

18. Roudebush WE, Levine AS, Lodge JS, Tsai CC, Butler WJ. Human follicular fluid and mouse cumulus cells act synergistically to enhance preimplantation mouse BaIb/cJ embryo development. J Assist Reprod Genet. 1995; 12: 733-7.

19. Drinfeld M, Goldman S, Gonen Y, Koifman M, Calderon I, Abramovici H. A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. Fertil Steril. 1997; 67: 120-2.

20. Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. Hum Reprod. 1998; 13: 1638-44.

21. Feng HL, Wen XH, Presser SC. Effect of different co-culture systems in early human embryo development. Hum Reprod. 1996;11: 1525-8.

22. Schramm RD, Bavister BD. Granulosa cells from follicle stimulating hormone–primed monkeys enhance the development competence of in-vitro-mature oocytes from non-stimulated rhesus monkeys. Hum Reprod. 1996; 11:1698-1702.

23. Janssenswillen C, Nagy ZP, Van Steriteghem A. Maturation of human cumulus–free germinal vesicle–stage oocytes to metaphase II by coculture with monolayer Vero cells. Hum Reprod. 1995; 10:375-8.

24. Antczak M, Van Blerkom J, Clark A. A novel mechanism of vascular endothelial growth factor, leptin and transforming growth factor-beta2 sequestration in a subpopulation of human ovarian follicle cells. Hum Reprod. 1997;12: 2226-34.

25. Torok A, Belagyi J, Torok B, Tinneberg HR, Bodis J. Scavenger capacity of follicular fluid, deciduas and culture medium with regard to assisted reproduction: an in vitro study using electron paramagnetic resonance spectroscopy. Gynecol Obstet Invest. 2003; 55: 178-82.

26. Torok A, Nemeth P, Torok B, Berki T, Tinneberg HR, Bodis J. Organic hydroperoxide-induced chemiluminescence of follicular fluid and blood serum samples obtained from women pretreated for in vitro fertilization. Gynecol Obstet Invest. 2004; 57: 72-9.

27. Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. Fertil Steril. 2001; 76: 1150-6.

28. Munn S, Estop AM. Choromosome analysis of human spermatozoa stored in vitro. Hum Reprod. 1993; 8: 581-6.

29. Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. Hum Reprod. 1995; 10:415-24.

30. Dorzortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C, Dhont M. Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. Human Reprod. 1995; 10: 403-7.

31. Staessen C, Nagy ZP, Liu J Janssenswillen C, Camus M, Devroey P, Steirteghem AC One year's experience with elective transfer of two good quality embryos in the human in–vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1995; 10: 3305-12.

32. Alper MM, Brinsden P, Fischer R, Wikland M. To blastocyst or not to blastocyst? That is the question. Hum Reprod. 2001; 16: 617-9.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

جلوگیری از چند قلوزایی می‌گردد و در عین حال می‌توان با انتخاب جنین‌هایی با پتانسیل رشد بیشتر احتمال حاملگی را بالا برد (۳۲).

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین و کارکنان بخش IVF بیمارستان میرزا کوچک‌خان تهران که نهایت همکاری را در اجرای این تحقیق داشته‌اند ابراز می‌دارند.

منابع

1. Chang MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature. 1959; 184: 466-7.

2. Ham RG. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. Exp Cell Res. 1963; 29: 515-26.

3. Chi HJ, Kim DH, Koo JJ, Chang SS. The suitability and efficiency of human follicular fluid as a protein supplement in human in vitro fertilization programs. Fertil Steril. 1998; 70: 871-7.

4. Sadeghipour Roudsari HR, Salsabili N, Sattarian M, Ghiafeh Davvodi F. Human follicular fluid in normal and polycystic ovaries. Acta Medica Iranica. 2001; 169-171.

5. Bryant SM, Gale JA, Yanagihara DL, Campeau JD, diZeregа GS. Angiogenic, mitogenic, and chemotactic activity of human follicular fluid. Am J Obstet Gynecol. 1988; 158: 1207-14.

6. Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Lacalandra GM, Maritato F. Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1997;12: 2766-72.

7. Holst N, Bertheussen K, Forsdahl F, Hakonsen MB, Hansen LJ, Nielsen HI. Optimization and simplification of culture conditions in human in vitro fertilization (IVF) and preembryo replacement by serum free media. J in Vitro Fert Embryo Transfer. 1990; 7: 47-53.

8.Weathersbee PS, Pool TB, Ord T. Synthetic serum substitute (SSS): a globulin-enriched protein supplement for human embryo culture. J Assist Reprod Genet. 1995; 12: 354-60.

9-Wiemer KE, Cohen J, Amborski GF, Wright G, Wiker S, Munyakazi L, Godke RA. In-vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. Human Reprod. 1989; 4: 595-600.

10. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S. Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell co culture. Fert Steril. 1992; 58: 569-74.

11. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour LG and Abbas AM. Co-culture of human pronucleate oocyte with their cumulus cells. Hum Reprod. 1994; 9: 1727-9.

12. Freeman MR, Whitworth CM and Hill GA. Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in vitro-fertilization. Hum Reprod. 1995; 10: 408-14.

13. Watson AJ, Watson PH, Warner D, Walker SK, Armstrong DT, Seamark RF. Preimplantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayer and culture under low oxygen atmosphere. Biol Reprod. 1994; 50: 712-27.

14. Bongso A, Ng SC, Fong CY and Ratnam S. Cocultures: A new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Fertil Steri. 1991; 56: 179-91.

15. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Abbas AM, Elattar I. The life span of sperm motility and pattern in coculture. Fertil Steril. 1995; 63: 660-2.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

جدول ٢- توزیع فراوانی فراگمانتاسیون سیتوپلاسمی بر حسب تعداد سلول‌های آنها در ٥ محیط کشت (٤٣ ساعت پس از تزریق اسپرم).

محیط‌ها	فراگمانتاسیون درجه A			فراگمانتاسیون درجه B			فراگمانتاسیون درجه C			جمع سطر
	٢ سلولی (%)	٤ سلولی (%)	٨ سلولی (%)	٢ سلولی (%)	٤ سلولی (%)	٨ سلولی (%)	٢ سلولی (%)	٤ سلولی (%)	٨ سلولی (%)	
مایع فولیکولی	٣ (٢٠)	١٢ (٢٧/٣)	—	٢ (٥٠)	٢ (٥٠)	١ (٥٠)	—	—	—	٢٠
مایع فولیکولی و سلول‌های گرانولوزا	١ (٦/٦)	٥ (١١/٤)	٥ (٥٠)	١ (٢٥)	—	—	—	—	—	١٢
Ham's F10	٢ (١٣/٣)	٦ (١٣/٦)	—	—	٢ (٥٠)	—	١ (٥٠)	—	١ (١٠٠)	١٢
Ham's F10 و سلول‌های گرانولوزا	٤ (٢٦/٧)	٨ (١٨/٢)	٢ (٢٠)	١ (٢٥)	—	١ (٥٠)	١ (٥٠)	١ (١٠٠)	—	١٨
سرم ساختنی جایگزین (3S)	٥ (٣٣/٣)	١٣ (٢٩/٥)	٣ (٣٠)	—	—	—	—	—	—	٢١
جمع ستون	١٥ (١٠٠)	٤٤ (١٠٠)	١٠ (١٠٠)	٤ (١٠٠)	٤ (١٠٠)	٢ (١٠٠)	٢ (١٠٠)	١ (١٠٠)	١ (١٠٠)	٨٣

از کل جنین‌های تقسیم نشده ٣٥/٢٩ درصد متعلق به گروه Ham's F10 و٥/٨٨ درصد متعلق به گروه3S بود و در محیط‌های کشت همرفت مایع فولیکولی با سلول‌های گرانولوزا بیشترین تعداد جنین‌های ٨ سلولی وجود داشت (جدول ١).

مقایسه دو تایی محیط‌های کشت از نظر تعداد سلول‌های جنین نشان داد تنها بین محیط Ham's F10 با محیط 3S تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشته است (Wilcoxon test ; P= ٠/٠٠٨٨).

در مقایسه دوتایی محیط‌های Ham's F10 با ده درصد آلبومین انسانی و Ham's F10 همراه با سلول‌های گرانولوزا مقدار P value، ٠/٠٦٦ گردید که بسیار نزدیک به ٠/٠٥ بود.

در جدول ٢ توزیع فراوانی توأم فراگمانتاسیون (از هم پاشیدگی) سیتوپلاسمی جنین‌ها بر حسب تعداد سلول آنها به روش Brinsden (١٧) آورده شده است. در محیط 3S بیشترین فراگمانتاسیون درجه A (تقسیم بدون از هم پاشیدگی سیتوپلاسمی) و در محیط مایع فولیکولی بیشترین فراگمانتاسیون درجه B (تقسیم با کمتر از ده درصد از هم پاشیدگی سیتوپلاسمی) وجود داشته است. فراگمانتاسیون درجه C (تقسیم همراه با ده تا پنجاه درصد از هم پاشیدگی سیتوپلاسمی) فقط در محیط‌های حاوی ده درصد آلبومین انسانی با مایع Ham's F10 دیده شد. تمامی جنین‌های ٨ سلولی محیط کشت همرفت مایع فولیکولی با سلول‌های گرانولوزا فراگمانتاسیون درجه A داشتند (n =٥). در هر یک از محیط‌های کشت غیر همرفت، حداقل یک جنین ٨ سلولی وجود داشت که فراگمانتاسیون آن در محیط مایع فولیکولی درجه B و در محیط Ham's F10 درجه C بود. هیچگونه رابطه آماری معنی‌داری بین فراگمانتاسیون و مشاهده یا عدم مشاهده پرونوکلئوس (پیش هسته) و بین فراگمانتاسیون با تعداد سلول‌های جنین‌ها بدست نیامد.

در بررسی‌های X^2 در تمام محیط‌های مورد آزمایش تعداد جنین‌های ٨ سلولی مشاهده شده بیش از مقادیر مورد انتظار بود مگر در محیط کشت ساده مایع فولیکولی و Ham's F10 .

بحث

Chi و همکاران(٣) توانسته‌اند در تحقیقی کنترل شده که بر روی مقایسه پروتئین های مایع فولیکولی و سرم بند ناف جنین انسانی انجام دادند، پروتئینی اختصاصی با وزن ملکولی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

ساعت در انکوباتور۵٪ CO_2 قرار داده شدند و سپس به محیط‌های کشت منتقل گردیدند.

روش تخمک‌گذاری در محیط‌های کشت

از هر یک از محیط‌های کشت دو قطره ۱۰۰ میکرولیتری در پتری دیش‌های به قطر ۳۰ میلی‌متر بطور مجزا قرار داده شدند و روی آنها با روغن پارافین پوشانده شد. در محیط‌های همرفت، یک لایه سلول گرانولوزا (حدوداً ۵۰۰۰ عدد سلول) نیز به محیط اضافه گردید. نیم ساعت پس از تزریق اسپرم، تخمک‌ها در قطره اول قرار داده شدند.

مشاهده تخمک‌ها

بطور متوسط ۲۱ ساعت پس از قرار دادن تخمک در قطره اول وجود یا عدم وجود پرونوکلئوس بوسیله میکروسکوپ معکوس تعیین و ثبت شد.

سپس تخمک به قطره دوم منتقل گردید (جهت حفظ غلظت مناسب مواد غذایی برای رشد جنین‌ها). بطور متوسط ۴۳ ساعت پس از تزریق اسپرم، تخمک‌ها از نظر تعداد تقسیمات سلولی و کیفیت تقسیم با میکروسکوپ معکوس تحت مشاهده قرار گرفته و نتایج ثبت شدند.

روش جمع‌آوری نمونه‌ها

پس از انتقال تخمک‌ها به محیط‌های مخصوص، محیط‌های کشت توسط پیپت پاستور جمع‌آوری گردیدند. تا زمان بررسی‌های بیوشیمیایی، هر محیط در لوله جداگانه در دمای منهای ۴۰ درجه سلسیوس نگاهداری شد.

بررسی آماری

اطلاعات بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های Friedman و Wilcoxon مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها

در این تحقیق ۱۱۷ تخمک متافاز دوم که به روش ICSI تلقیح شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. تخمک‌ها از ۲۷ بیمار با محدوده سنی ۱۸ تا ۴۱ سال (۶/۱۴ ± ۲۸/۳۷) جمع‌آوری گردیدند. سن ۴۰/۷٪ بیماران بالاتر از ۳۰ سال بود. بر طبق نتایج، بطور متوسط ۴۳ ساعت پس از تزریق اسپرم به تخمک‌ها، ۱۱/۱ درصد آنها ۸ سلول (۱۳ عدد) داشتند و در ۲۹/۱ در صد آنها (۳۴عدد) تقسیمی صورت نگرفته بود (جدول ۱).

جدول ۱- توزیع فراوانی جنین‌ها بر حسب تعداد سلول‌های آنها در ۵ محیط کشت مورد آزمایش (۴۳ ساعت پس از تزریق اسپرم).

فراوانی	جنین ۲ سلولی (درصد)	جنین ۴ سلولی (درصد)	جنین ۸ سلولی (درصد)	تخمک بدون تقسیم (درصد)	جمع (درصد)
مایع فولیکولی	۵ (۲۳/۸)	۱۴ (۲۸/۵۷)	۱ (۷/۶۹)	۶ (۱۷/۶۵)	۲۶ (۲۲/۲)
مایع فولیکولی و سلول‌های گرانولوزا	۲ (۹/۵۲)	۵ (۱۰/۲)	۵ (۳۸/۴۶)	۱۰ (۲۹/۴۱)	۲۲ (۱۸/۸)
Ham's F10	۳ (۱۴/۲۸)	۸ (۱۶/۳۳)	۱ (۷/۶۹)	۱۲ (۳۵/۲۹)	۲۴ (۲۰/۵)
Ham's F10و سلول‌های گرانولوزا	۶ (۲۸/۶)	۹ (۱۸/۳۷)	۳ (۲۳/۰۸)	۴ (۱۱/۷۶)	۲۲ (۱۸/۸)
سرم ساختنی جایگزین(3S)	۵ (۲۳/۸)	۱۳ (۲۶/۵۳)	۳ (۲۳/۰۸)	۲ (۵/۸۸)	۲۳ (۱۹/۷)
جمع ستون	۲۱ (۱۰۰)	۴۹ (۱۰۰)	۱۳ (۱۰۰)	۳۴ (۱۰۰)	۱۱۷ (۱۰۰)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

مواد و روش‌ها

روش جمع‌آوری تخمک‌های متافاز II

در طی ۱۵ ماه، در یک تحقیق تجربی، از میان مراجعین به بخش IVF بیمارستان میرزاکوچک‌خان تعدادی بیمار بطور تصادفی انتخاب شدند. از تمام بیماران رضایت‌نامه کتبی اخذ می‌شد. بیماران ابتدا تحت درمان با آنالوگهای GnRH قرار گرفته و تخمدان های آنها بوسیله FSH و HMG تحریک شدند. در هیچیک از زوجین، عوامل زنانه ناباروری وجود نداشت و ناباروری تنها به علت عوامل مردانه بود.

پس از تحریک تخمدانی با روش بلند مدت، تخمک‌ها با استفاده از اولتراسوند واژینال آسپیره گردیدند و بوسیله هیالورونیداز ده درصد و روش‌های مکانیکی برهنه شدند.

معیار ورود افراد به برنامه تحقیقاتی تشخیص حداقل ۵ تخمک متافاز II بوسیله میکروسکوپ معکوس بود. از کل بیماران، تنها۲۷ بیمار واجد شرایط فوق بودند که در مجموع ۱۲۵ تخمک از آنها جمع‌آوری گردید اما ۹ عدد از تخمک‌ها بدلایل مختلف (نظیر آلودگی محیط) حذف شدند (n=۱۱۷). تخمک‌ها تا زمان تزریق اسپرم در قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری 3S ده درصد، به مدت نیم ساعت قرار داده شدند و در انکوباتور ۵٪ Co_2 با دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگاهداری گردیدند.

روش جمع آوری اسپرم‌ها

اسپرم‌ها به دو روش تهیه شدند: ۱- خود انزال، ۲- بصورت TESE (Testis Epidymal Sperm Extraction). در موارد اولیگواسپرمی، مایع انزال با محلول Ham's F10 شستشو داده شد.

در موارد آزواسپرمی پس از بیهوش کردن بیمار، نمونه‌ای از بافت بیضه برداشته شد و با شستشوی مجاری سمینیفر اسپرمها جمع‌آوری گردیدند. در هر دو حالت، نمونه‌ها (اسپرم‌ها یا بافت بیضه) به مدت یک ساعت در محیط Ham's F10 با ده درصد مایع فولیکولی انکوبه شدند و با روش layering یا swim-up جداسازی گردیدند و سپس تزریق اسپرم با روش ICSI انجام شد.

آماده سازی سلول های گرانولوزا

پس از تخمک‌گیری و برهنه‌سازی، سلول‌های گرانولوزای هر فرد بطور جداگانه با محلول Ham's F10 چند بار شستشو داده شدند. سپس حجم سلول ها به یک میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از لام نئوبار شمارش گردیدند. بر حسب تعداد سلول‌های شمارش شده، حجم لازم جهت بدست آوردن تعداد مساوی از سلول‌های گرانولوزا در تمام محیط‌ها محاسبه شد، بطوریکه در تمام محیط‌های حاوی سلول‌های گرانولوزا، حدود ۵۰۰۰ عدد سلول قرار داده شد. سلول‌های گرانولوزا تا زمان قطره‌گذاری محیط‌ها و انتقال تخمک به آنها، در انکوباتور نگاهداری گردیدند و برای هر فرد تنها از سلول‌های گرانولوزای خودش استفاده شد.

آماده‌سازی محیط‌های کشت

تمامی نمونه های مایع فولیکولی بلافاصله پس از جدا کردن تخمک از آنها، به مدت ۲۰ دقیقه و با ۲۰۰۰× g سانتریفوژ شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۵۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. آنگاه با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتره گردیدند. محیط‌ها در یخچال نگاهداری شده و حداکثر تا دو هفته از آنها استفاده می‌شد. جهت کشت تخمک از مخلوط مایع فولیکولی جمع‌آوری شده با روش فوق استفاده شد.

برای تهیه محیط Ham's F10 ، ده درصد آلبومین انسانی به محیط Ham's F تازه تهیه شده اضافه شد. محیط 3S با استفاده از ویال 3S تهیه گردید.

جهت تهیه محیط‌های کشت همرفت یک لایه از سلول‌های گرانولوزا در محیط کشت Ham's F10 و مایع فولیکولی قرار داده شد.

تلقیح تخمک‌ها

تمام تخمک‌ها با استفاده از روش تزریق اسپرم بداخل سیتوپلاسم (Intracytoplasmic Sperm Injection:ICSI) بارور گردیدند. در تمام نمونه‌ها از اسپرم زنده و متحرک استفاده شد. تخمک‌ها پس از تزریق اسپرم ابتدا به مدت نیم

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

مقدمه

اولین گزارشات در مورد کشت تخمک، لقاح و باروری در فواصل سالهای ۱۸۷۸ تا ۱۸۸۰ جمع‌آوری و منتشر گردیدند. این گزارشات بطور عمده در مورد حیوانات دریایی از جمله عروس دریایی بود. اولین تلاشها جهت کشت تخمک پستانداران توسط Schenk (۱۸۸۰) صورت گرفت و موفقیت‌آمیز نبود، زیرا دانشمندان هنوز به اهمیت یون‌های مختلف از جمله یون هیدروژن و غلظت آنها در کشت تخمک پستانداران آگاهی نداشتند. امروزه مشخص گردیده است باروری تخمک پستانداران نیازمند pH و اسمولاریته مناسبی می باشد. Chang در سال ۱۹۵۹ کشت موفقیت‌آمیز تخمک‌های خرگوش را انجام داد و توانست با انتقال آنها به رحم خرگوش ماده، نوزادانی سالم بدنیا آورد (۱).

اولین بار محیط کشت Ham's F10 توسط Ham در سال ۱۹۶۳ معرفی گردید. این محیط حاوی مواد مغذی نظیر ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه مختلف و سایر متابولیت‌ها است (۲). به عقیده برخی از محققین، استفاده از بعضی مایعات طبیعی بدن نظیر مایع فولیکولی، سرم بندناف جنین، مایع لوله رحمی و ... اثرات بهتری بر رشد جنین دارند زیرا ترکیب آنها به ترکیب محیط طبیعی جنین شبیه است. در مایع فولیکولی تمام یون‌های ضروری برای رشد جنین اولیه همانند Na^+، K^+، Cl^- و Ca^{2+} و همچنین برخی کربوهیدارت‌های مهم مانند پیرووات، لاکتات، گلوکز و فروکتوز و نیز هورمون‌های استروئیدی وجود دارند (۴،۳). مایع فولیکولی حاوی بیشتر پروتئین‌های پلاسما همانند آلبومین به همراه برخی ملکول‌های پروتئینی ویژه است که تأثیر مهمی بر تقسیم میتوزی سلول‌ها دارند (۶،۵).

وجود پروتئین در کشت سلولی سبب تأمین نیتروژن مورد نیاز و حذف یون‌های فلزی سمی شده و به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌نمایند، لذا امروزه از منابع طبیعی پروتئین نظیر آلبومین سرم گاوی، آلبومین سرم انسانی و یا پروتئین‌های پلاسما جهت کشت تخمک استفاده می شود (۷). با توجه به احتمال آلوده بودن پروتئین های طبیعی به عوامل مختلف از جمله ویروس‌ها و نیز تفاوت در آماده‌سازی آنها، بیشتر محققین تمایل به استفاده از سرم ساختنی جایگزین (Synthetic Serum Substitue: 3S) دارند. 3S از ۴۸ درصد آلبومین سرم انسانی، ۱۲ درصد گلوبولین‌های آلفا و بتا و کمتر از یک درصد گاما گلوبولین تشکیل شده است (۸).

در طی دو دهه اخیر مشخص گردیده است کشت همرفت (co-culture) جنین‌های انسانی با انواع سلول‌های تک لایه سبب افزایش رشد جنین، کاهش از هم پاشیدگی سیتوپلاسمی و بهبود لانه‌گزینی و میزان حاملگی می‌شود (۱۲،۱۱،۱۰،۹). تأثیرات سودمند کشت همرفت در هنگام استفاده از سلول‌های گوناگون مشاهده شده است. بنظر می‌رسد کشت همرفت با سلول‌های مختلف سبب ترشح موادی از آنها بداخل محیط کشت می‌شود (عوامل امبریوتروفیک) که حالت اختصاصی نسبت به گونه سلولی ندارند. سلول‌های مورد استفاده در محیط کشت به عنوان یک sink یا چاهک برای برداشت عوامل زیان‌آور عمل می‌کنند (۱۳). تاثیرات ناشی از عمل سم زدایی محیط توسط سلول‌های گرانولوزا با ترشح پپتیدهای گلیکوپروتئینی و فاکتورهای رشد (مانند فاکتورهای رشد شبه انسولینی ۱ و ۲.) یا استروئیدها از سلول‌های گرانولوزا همراه است (۱۴).

سلول‌های گرانولوزا، یکی از پر مصرف‌ترین سلول‌ها در محیط‌های کشت همرفت هستند زیرا براحتی از طریق روش‌های باروری مصنوعی قابل جمع‌آوری می‌باشند. استفاده از سیستم‌های کشت همرفت با سلول‌های گرانولوزا نه تنها بر رشد تخمک مؤثر است بلکه سبب بهبود شرایط حفظ اسپرم و فعال سازی آن نیز می‌شود (۱۵).

علاوه بر آن سلول‌های گرانولوزا بعضی از اثرات خود بر تخمک را از طریق پیام‌های پاراکرینی اعمال می‌کنند و می‌توانند با مکانیسم آپوکرینی سبب ذخیره‌سازی هورمون‌های رشد و بعضی پروتئین‌های خاص از سلول های فولیکولی و کومولوس انسانی شوند (۱۶).

با توجه به موارد گفته شده، در این تحقیق علاوه بر سلول‌های گرانولوزا از مایع فولیکولی انسانی نیز استفاده شد و اثرات سینرژیسم آنها بر رشد جنین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله می‌توانند سبب یافتن محیط جایگزین مناسبی برای رشد جنین‌ها در کلینک‌های باروری مصنوعی گردند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۳، شماره ۱۰، صفحات ۸۲۷ تا ۸۳۵ ، (۱۳۸۴)

مقایسه کشت جنین‌های انسانی به همراه سلول‌های گرانولوزا در مایع فولیکولی و Ham's F10 با محیط سرم ساختنی جایگزین

دکتر بهنوش وثاقی‌قراملکی*، دکتر حمیدرضا صادقی‌پور رودسری*، دکتر ناصر سلسبیلی، دکتر فیروزه اکبری‌اسبق***، دکتر شهره جلایی******

* گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

** مرکز باروری کمک کوثر

*** گروه زنان و زایمان، بخش IVF بیمارستان میرزاکوچک‌خان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

**** دانشکده توانبخشی

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه بررسی اثر کشت همرفت (Co-culture) سلول‌های گرانولوزا بر تسهیم سلولی جنین‌های انسانی در محیط‌های مایع فولیکولی و Ham's F10 و مقایسه آن با رشد جنین در محیط کشت 3S بود.

مواد و روشها: بدین منظور در یک مطالعه تجربی، از میان مراجعین به بخش IVF بیمارستان میرزاکوچک‌خان تهران ۲۷ نفر بطور تصادفی انتخاب شدند. پس از تحریک تخمدانی باروش بلند مدت، تخمک‌های بیماران با استفاده از اولتراسوند واژینال جمع‌آوری و به روش تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (Intracytoplasmic Sperm Injection: ICSI) بارور گردیدند. سپس رشد آنها در محیط‌های کشت مایع فولیکولی و Ham's F10 ساده و حاوی سلول‌های گرانولوزا مورد مطالعه قرار گرفت و با محیط سرم ساختنی جایگزین(3S) مقایسه شد (در مجموع ۵ محیط).

یافته‌ها: بر طبق نتایج این تحقیق بیشترین فراوانی جنین‌های ۸ سلولی در محیط همرفت (Co-culture) مایع فولیکولی با سلول‌های گرانولوزا، و بیشترین جنین های ۲ سلولی در محیط همرفت Ham's F10 با سلول‌های گرانولوزا دیده شد. کمترین فراوانی عدم تقسیم در محیط 3S وجود داشت و کمترین جنین های ۸ سلولی در محیط مایع فولیکولی ساده (فاقد سلول های گرانولوزا) مشاهده گردید. از نظر از هم پاشیدگی (Fragmentation) سیتوپلاسمی، محیط مایع فولیکولی همراه با سلول‌های گرانولوزا و 3S کمترین از هم پاشیدگی را داشت. ولی درمحیط‌های Ham's F10 به تنهائی و یا همراه با سلول‌های گرانولوزا بیشترین میزان از هم پاشیدگی سیتوپلاسمی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری‌ها و توصیه‌ها: بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد کشت همرفت تخمک های بارور شده در مایع فولیکولی همراه با سلول‌های گرانولوزا سبب افزایش تعداد سلول های جنین با کمترین فراگمانتاسیون سیتوپلاسمی می‌شود.

کلمات کلیدی: کشت همرفت، سلول‌های گرانولوزا، مایع فولیکولی، Ham's F10 ، سرم ساختنی جایگزین(3S)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]