مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

مقاله پژوهشی

مقایسه تکوین جنین دو سلولی موش پس از هم کشتی با فیبروبلاستهای جنین موش و انسان

حسن پاهنگ [۱،*]، سید نورالدین نعمت اللهی ماهانی [۲]

[۱] استادیار، گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۲] استاد، گروه آناتومی و جنین شناسی، دانشگاه علوم پزشکی افضلی پور، کرمان، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** حسن پاهنگ، استادیار، گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: Pahang_hasan@yahoo.com

DOI: 10.29252/nkjmd-0100112

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

واژگان کلیدی:
جنین دوسلولی
هم کشتی
فیبروبلاست جنینی موش
فیبروبلاست جنینی انسان

چکیده

مقدمه: سیستم‌های هم کشتی جنین نشان دادند سلول‌های مغذی فواید موثری در تکامل جنین قبل از لانه گزینی دارد. در مطالعه حاضر تاثیرات هم کشتی جنین دو سلولی موش با فیبروبلاست های جنین موش (MEF) و فیبروبلاست های جنین انسان (HEF) در دوره قبل از لانه گزینی مقایسه شد.

روش کار: جنین‌های دوسلولی موش که از لوله رحم موشهای Balb / C استخراج شده بودند به طور اتفاقی به سه گروه زیر تقسیم شدند: جنین‌های گروه کنترل (G1) به تنهایی و جنین‌های گروه آزمون اول (G2) با فیبروبلاستهای جنینی موش وجنین های گروه آزمون دوم (G3) با فیبروبلاستهای جنینی انسان هم کشتی شدند. همه جنین‌ها در محیط کشت MEM- α و در شرایط استاندارد انکوباتور زیر پارافین مایع کشت شدند و ارزیابی جنین‌ها تا مرحله خروج از زونا پلوسیدا (hatching stage) انجام شد و نتایج با آزمون‌های آماری Mann-Whitney و T-Test آنالیز شد و در همه آزمونها $P \geq ۰/۰۵$ حد معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد میزان بلاستولاسیون و خروج از زونا پلوسیدا در جنین‌های گروه G2 به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. ولی جنین‌هایی که در گروه G3 کشت شده بودن اختلاف معنی داری با گروه کنترل نشان ندادند به نظر می‌رسد فیبروبلاستهای جنین موش با حذف استرس اکسیداتیو و تنظیم متابولیسم سلولی، جنین‌های دو سلولی موش را در برابر شرایط نامساعد ازمایشگاه محافظت می‌کند.

نتیجه گیری: تکامل جنین دو سلولی موش با استفاده از تک لایه فیبروبلاستی جنینی موش در سیستم هم کشتی و در محیط آزمایشگاه نسبت به فیبروبلاستهای جنینی انسان بهتر است.

مقدمه

هدف از لقاح آزمایشگاهی و کشت جنین پستانداران در آزمایشگاه ایجاد جنینهایی با کیفیت بالا است تا بتوانند روند تکامل و لانه گزینی جنین را در مراحل قبل از لانه گزینی طی کرده و درصد میزان تولد زنده را افزایش دهد و علی رغم پیشرفتهایی که در تکنیکهای کمک باروری صورت گرفته ولی نتایج مطالعات نشان می‌دهد همچنان درصد حاملگی پایین است [۱]. در لقاح آزمایشگاهی اووسیتهایی که به دنبال تحریک تخمک گذاری به دست می‌آیند پس از لقاح در آزمایشگاه به بدن مادر منتقل می‌شوند و در این پروسه فاکتورهای متعددی در میزان موفقیت حاملگی موثرند [۲]. مثلاء محیط کشت نامناسب، کیفیت پایین اووسیت و افزایش استرس اکسیداتیو و تولید رادیکالهای آزاد از جمله مواردی هستند که می‌تواند تأثیر منفی بر تکوین جنین داشته باشد و با وجود تحقیقات گسترده‌ای که برای بهبود شرایط کشت جنین صورت گرفته ولی میزان حاملگی و درصد لانه گزینی پس از لقاح آزمایشگاهی نسبتاً پایین است [۳]. به نظر می‌رسد علت اصلی این مسئله شرایط نامناسب محیط آزمایشگاه وشرایط کشت می‌باشد که مشکلات و مسائلی را در مسیر رشد و تکوین جنین به وجود می‌آورد. یکی از روشهایی که به بهبود شرایط جنین در آزمایشگاه کمک می‌کند استفاده از سلولهای مغذی می‌باشد که با آزاد کردن فاکتورهای رشد تکامل سلولی را در محیط کشت بهبود می‌بخشند که این روش اولین بار در سال ۱۹۸۰ با کمک بافت تروفوبلاست به عنوان لایه مغذی در تکامل بلاستوسیت به کار گرفته شد و موفقیت آمیز بود [۴]. مطالعات گذشته نشان داده است کشت گروهی جنین‌ها نتیجه مطلوب‌تری نسبت به کشت تکی آنها دارد و به عبارت دیگر با کاهش حجم محیط کشت تعداد سلولهای بلاستوسیت افزایش یافت و محیط کشت غنی شده تعداد سلولها و میزان لانه گزینی را افزایش داد [۵]. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد جنینهایی که در محیط آزمایشگاه با فیبروبلاستهای جنین موش هم کشتی شدند تعداد سلولها و قطر آنها در توده سلولی داخلی جنین بیشتر بود [۱] همچنین استفاده از سلولهای بافت تازه نسبت به سلولهای منجمد شده نتیجه مطلوب‌تری در پی داشت و مشخص شد انجماد سلولی تولید سیتوکین ها را کاهش می‌دهد و اثر مطلوبی بر سلولهای هم جوار ندارد [۶]. از طرفی مدل هم کشتی سلولهای اپیتلیال و سلولهای عضله صاف به عنوان ابزار مفیدی جهت

تداخل سلولی مناسب در شرایط استرسی به اثبات رسیده است [۷]. لذا با توجه به اهمیت سلولهای فیبروبلاست جنینی و ویژگیهای منحصر به فرد این سلولها مطالعه حاضر جهت مقایسه تکوین هم کشتی جنین دو سلولی موش با سلولهای فیبروبلاست جنین موش و جنین انسان در شرایط استاندارد آزمایشگاه‌های کمک باروری طراحی شد.

روش کار

لوله رحم موشهای ماده‌ای که ۴۸ ساعت پس از تزریق HCG جفت گیری کرده بودند و صبح روز بعد از جفت گیری با مشاهده پلاک واژینال حاملگی آنها مثبت بود در شرایط استریل و پس از قطع نخاع از شکم خارج شد و به محیط کشت HTF + %10 FBS که کاملاً توسط پارفین مایع پوشیده شده بود منتقل شدند. و با تزریق ۰/۱ میلی لیتر محیط کشت توسط سرنگ انسولین از انتهای پروگزیمال لوله رحم جنینهای دو سلولی از انتهای دیستال آن خارج شدند و جنین‌هایی که ظاهر طبیعی داشتند به کمک پیپت جمع آوری و پس از پردازش و شتشو به محیط کشت MEM- α انتقال داده شدند و جنین‌هایی که موروفولوژی و ظاهری سالم داشتند که جهت انجام آزمایش از آنها استفاده شد که پس از طی مراحل آماده سازی و شتشو به طور اتفاقی به سه گروه که در ادامه ذکر شده است تقسیم شدند و هر آزمون سه بار تکرار شد سپس همه جنین‌ها تا پایان آزمون در شرایط استاندارد انکوباتور (رطوبت و دما CO۳۷) و در حالی که توسط پارافین مایع پوشیده شده بودند در محیط کشت MEM-α کشت داده شدند: جنین‌های گروه کنترل (G1) که به تنهایی در محیط آنکوباتور کشت داده شدند. جنین‌های گروه آزمون اول (G2) به طور همزمان با فیبروبلاست های جنینی موش (MEF: Mouse Embryonic Fibroblast) کشت داده شدند و جنینهای گروه آزمون دوم (G3) نیز به طور همزمان با فیبروبلاست های جنین انسان (HEF: Human Embryonic Fibroblast) و در محیط کشت مشابه گروه کنترل و گروه آزمون اول کشت داده شدند. مراحل تکامل جنین‌ها هر 24 ساعت با میکروسکوپ اینورت مشاهده و شرایط تکوین آنها در همه گروهها تا روز پنجم پس از طی مراحل چهار وهشت سلولی (۲۴ ساعت)، مورولا (۴۸ ساعت)، بلاستوسیست اولیه و بلاستوسیست ثانویه (۷۲ ساعت) بلاستوسیست درحال خروج از زونا پلوسیدا (۹۶ ساعت) و بلاستوسیست خارج شده اززونا پلوسیدا (۱۲۰ ساعت) موردارزیابی قرارگرفت.

روش تهیه فیبروبلاست جنین موش (MEF)

پس از باز کردن جدار شکم موشهای باردار، به دنبال بیهوشی در روز سیزدهم بارداری، جنین‌های آنها در شرایط استریل از رحم خارج شد و پس از جدا کردن سر جنین‌ها کبدشان از بدن خارج شد و سپس به قطعات بسیار کوچک خرد شدند و چندین بار با PBS شستشو داده شدند. پس از آن ۱۰ سی سی تریپسین و ۰/۵ میلی مول EDTA به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد و پس از سانتریفوژ سوسپانسیون، و تخلیه محلول روئی شمارش سلولی با لام نئوبار صورت گرفت و درصد زنده بودن آنها با متیلن بلو ۰/۵ آزمایش شد. در نهایت سلولهای حاصله به فلاسک حاوی محیط کشت MEM- α+FBS منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد (رطوبت و دما CO۳۷) انکوباتور نگهداری شدند و پس از سه بار پاساژ جهت انجام آزمون استفاده شدند.

روش تهیه فیبروبلاست جنین انسان (HEF)

جنین سقط شده سه ماهه انسان پس از طی مراحل قانونی و اخذ مجوزهای لازم از بیمارستان افضلی پور کرمان تهیه شد و در شرایط استریل استخوان و غضروف از بدن جنین جدا گردید و بافت باقیمانده به قطعات بسیار کوچک تبدیل شد و پس از آن مشابه فیبروبلاستهای جنینی موش عمل شد واز پاساژهای دوم تا هفتم این سلولها جهت انجام آزمون استفاده شدند.

روش تهیه تک لایه مغذی فیبروبلاست

سلول‌های فیبروبلاستی با استفاده از تریپسین و EDTA از کف فلاسک کشت سلول جدا شده و به یک لوله استریل ۵ سی سی درب دار منتقل شدند. پس از سانتریفوژ و تخلیه مایع روئی، تراکم سلولی به $5X10^4$ رسید و سپس قطرات ۳۰ میکرولیتری از سوسپانسیون سلولی در پتری دیشهای ۱۵ × ۶۰ کاشته شد و جهت جلوگیری از آلودگی سلولها و خشک شدن قطرات کشت کاملاً توسط پارافین مایع پوشیده شدند و در نهایت به انکوباتور منتقل شدند تا در طی ۲۴ ساعت به کف پتری دیش بچسبند.

جمع آوری وآنالیز آماری نتایج

هر آزمون سه بارتکرار شد و جنینهای تکامل یافته هر روز به کمک میکروسکوپ اینورت مدلXDS مشاهده وگزارش شدند و جهت مقایسه میزان تکوین جنینها درهمه گروهها از آزمون آماری Mann-Whitney استفاده شد و آزمونt-test جهت مقایسه تکامل جنین‌ها در دو گروه به کار گرفته شد و برای بررسی اینکه میانگین کدام یک از گروهها با بقیه معنی دار است از تستهای تعقیبی (Post Hoc) استفاده شد. نتایج به صورت تعداد جنین تکوین یافته درهر مرحله و میزان تکوین به صورت درصد (٪) گزارش شد و در همه آزمونها $P \leq$ ۰/۰۵ حد معنی داری در نظر گرفته شد.

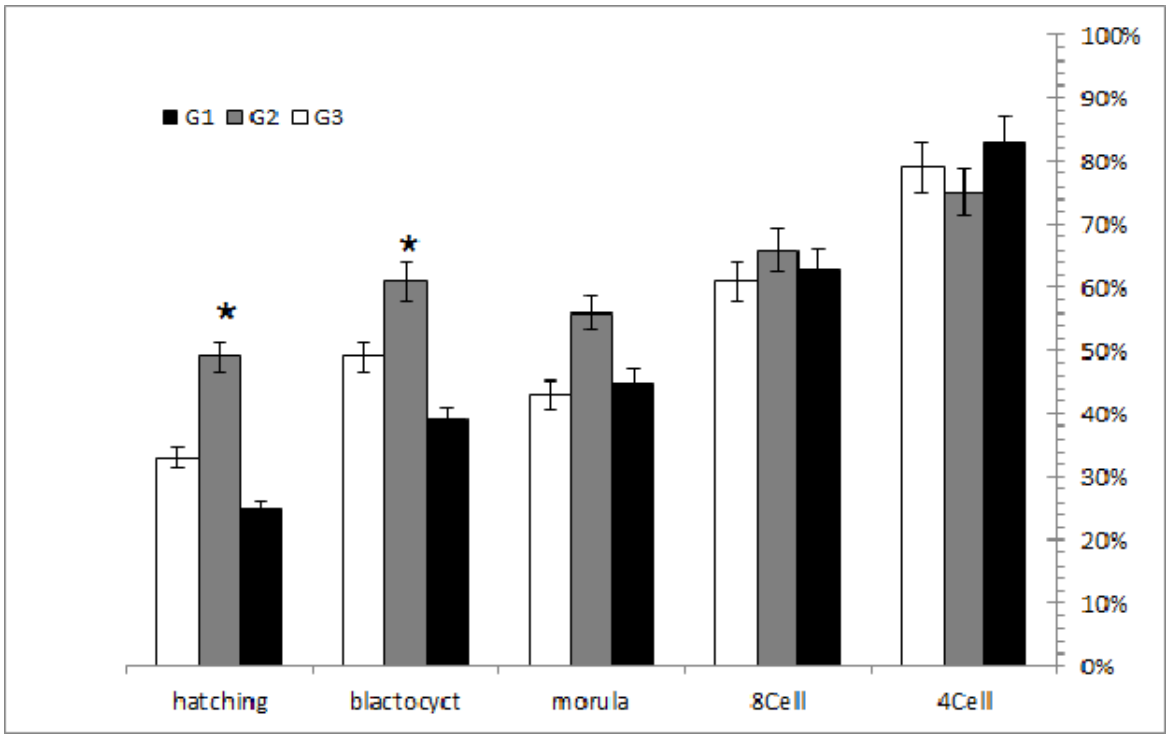
یافته‌ها

با بررسی و آنالیز آماری نتایج مشاهدات و ارزیابی روزانه جنینهای کشت شده در روزهای اول تا چهارم آزمون مشاهده شد میزان تکامل جنینهای دو سلولی در گروه‌های آزمون تفاوتهایی دارند بدین معنی که میزان تکامل جنین‌هایی که در محیط کشت بدون سلول و در شرایط آنکوباتور (G1) کشت شده بودند کاهش معنی داری را نسبت به گروه هم کشتی G2 نشان دادند (جدول ۱) هر چند شرایط رشد و تکثیر جنین‌های دو سلولی در گروه G3 بهتر بود ولی اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده نشد.

جدول ۱: تعداد جنینهایی که مراحل تکامل را در هر گروه طی کرده‌اند.

گروه‌ها	روز اول (۸-۴ سلولی)	روز دوم (مورولا)	روز سوم (بلاستوسیست)	روز چهارم (خروج از زونا)
G1	۲۸	۱۵	۱۳	۸
G2	۲۵	۱۹	۲۰	۱۶*
G3	۲۶	۱۴	۱۶	۱۱

* اختلاف آماری معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد ($P \leq ۰/۰۵$)



تصویر ۱: درصد جنین‌های تکامل یافته در مراحل مختلف تکامل تا روز پنجم پس از مرحله دوسلولی را نشان می‌دهد. * معنی داری بین گروه MEF و گروه کنترل را نشان می‌دهد ($P \leq ۰/۰۵$)

به عبارت دیگر فیبروبلاست های جنین موش که با جنین‌ها هم کشتی شده بودند توانستند تکامل جنین‌ها را بهبود ببخشند و تا حدودی شرایط مساعدی برای تکوین جنین‌ها ایجاد کنند و به این دلیل تکامل جنین‌ها در گروه G2 نسبت به محیط کشت بدون سلول (G1) به طور معنی داری افزایش یافت. همچنین با بررسی دقیق‌تر نتایج روزانه مشاهده شد هر چه به روز چهارم آزمون نزدیک‌تر می‌شویم میزان دژنراسیون و تخریب سلولی در گروه G1 به طور معنا داری نسبت به گروه‌های هم کشتی دیگر افزایش می‌یابد ($P < ۰/۰۵$). لذا با بررسی تکامل جنینها در روز چهارم آزمون مشاهده شد ۴۹٪ جنین‌ها در گروه G2 و ۳۳٪ آن‌ها در گروه G3 به مرحله خروج از زونا پلوسیدا رسیدند و این نتایج نشان داد روند تکوین جنینهای دو سلولی موش در محیط G2 که سلول‌های مغذی از همان گونه حیوان است تفاوت معنی داری با گروههای G1 و G3 دارد همچنین به نظر می‌رسد نتایج مثبت هم کشتی با فیبروبلاست در روزهای پایانی آزمایش بیشتر بروز می‌کند زیرا فقط ۱۹٪ جنین‌هایی که در محیط ساده بدون سلول (G1) کشت شده بودند به مرحله خروج از زونا پلوسیدا رسیدند که کاهش معنی داری را نسبت به گروههای هم کشتی نشان داد ($P < ۰/۰۵$) (تصویر ۱).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از هم کشتی نتایج مطلوبی در تکامل جنین دارد و با استفاده از سیستم هم کشتی تا حد زیادی می‌توان استرسهای ناشی از شرایط آزمایشگاه را بر جنین کاهش داد و استفاده از سلولهای هموژن فیبروبلاستی نتیجه مطلوبی دارد. نعمت اللهی و همکاران نشان دادند هم کشتی جنین دوسلولی موش با سلولهای فیبروبلاستی جنین انسان و موش در شرایط نامساعد آزمایشگاه از قبیل کاهش دما و نور زیاد محیط آزمایشگاه و تغییرات PH روند تکامل را تا روز چهارم و پنجم در آزمایشگاه بهبود می‌بخشد و ثابت کردند هم کشتی با فیبروبلاستهای جنین انسان و موش در شرایط نامساعد تا حد زیادی قادر است اثرات مخرب و استرسهای ناشی از محیط را بر تکامل جنین کاهش دهد [۸]. البته ما هم در مطالعه خود به این مهم دست یافتیم و لی در مطالعه حاضر جنین‌ها حتی المقدور هیچ استرسی را تحمل نکردند و در شرایط استاندارد آزمایشگاه کشت داده شدند. در همین راستا نتایج مطالعات نشان داده‌اند میزان لانه گزینی و کیفیت بلاستوسیست به زمان بعد از لقاح بستگی دارد و مشخص شده است جنین‌هایی که در آزمایشگاه تولید می‌شوند کیفیت

پایین‌تری دارند واین مشکلات به فاکتورهای متعددی از قبیل ناهنجاریهای ژنتیکی، آسیب‌های حین انجام کار و جمع آوری گامتها بستگی دارد با این وجود شرایط کشت جنین هم باید مطلوب باشد [۱]. در مطالعه دیگری در همین زمینه مشخص شد تعداد سلولهای توده سلولی داخلی بلاستوسیستهایی که با سلولهای فیبروبلاست جینی موش هم کشتی شده بودند به طور معنی داری بیشتر بود و همچنین قطر سلولها در این گروه نسبت به گروه کنترل افزایش داشت [۱]. در مطالعه‌ای که هم کشتی فیبروبلاستهای جنین موش و فیبروبلاستهای جنین گرگ باکمپلکس سلول‌های تخمک و سلولهای کومولوس تخمدان گرگ انجام شد مشخص شد میزان بلوغ اووسیتهایی که هم کشتی شده بودند بالاتر بود علاوه بر اینکه درصد کلیواژ نیز افزایش یافته بود و نکته قابل توجه این بود جنینهایی که با سلولهای MEF هم کشتی شده بودند تا مرحله مورولا پیش رفتند ولی میزان تخریب اووسیتها ۷۲ ساعت پس از کشت در همه گروهها افزایش یافته بود و نتیجه نشان داد هم کشتی با سلولهای MEF بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای را در تخمکها تحریک می‌کند [۹] سلول‌های فیبروبلاستهای جنینی با توجه به اینکه هموژن هستند به طور گسترده در صنایع بیوتکنولوژی استفاده می‌شوند و به همین دلیل قادرند رشد سلولهای متعددی مثل سلولهای بنیادی و فولیکولهای تخمدانی را افزایش دهند [۱۰]. با توجه به همین موضوع هم کشتی سلولهای شبیه فیبروبلاست با سلولهای بنیادی مزانشیمال بند ناف نشان داد این سلولها بیان پروتئین‌های پیش التهابی و اینترلوکین را مهار می‌کنند و با عث تسریع کوندورژنز می‌شوند [۱۱]. هر چند مکانیسم دقیق تأثیر سلولهای جنینی فیبروبلاستی بر روند تکامل جنین مشخص نشده است ولی احتمالاً فاکتورهای رشدی که این سلولها ترشح می‌کنند عامل محرک تکامل است همان طور که حیدری و همکاران نیز ثابت کردند هم کشتی فولیکول پره آنترال با MEF میزان رشد در روزهای ششم و هشتم به طور معنی داری افزایش می‌دهد و دریافتند فاکتور رشد فیبروبلاستی که از سلولهای فیبروبلاستی ترشح می‌شود عامل آن است به این ترتیب سلولهای MEF با تولید فاکتورهایی از قبیل فاکتور مهار کننده لوسمی و فاکتور استیل و فاکتور رشد فیبروبلاستی با عث رشد و تکامل فولیکول پره انترال می‌شوند. نتایج مطالعه حاضر نیز با این یافته‌ها مطابقت می‌کند [۱۲].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تکوین جنین‌ها در محیط MEF, HEF اختلاف معنی داری ندارند ولی جنین‌ها در محیط MEF شرایط مساعدتری داشتند لذا به نظر می‌رسد هم کشتی جنین‌های دوسلولی موش با سلولهای هموژن فیبروبلاست جنین موش مفیدتر است و طبق مطالعات میزان اکتین و نستین عضله صاف در فیبروبلاستهای نوزادی نسبت به فیبروبلاست بالغ بیشتر است و هر چند میزان تکثیر در هر دو سلول برابر است ولی هر دو سلول ظرفیت مهاجرت برابری ندارند و هم کشتی فیبروبلاست نوزادی محرک سلولهای بالغ است [۱۳]. همچنین هاتویا و همکاران نشان دادند که فیبروبلاستهای جنینی، بلوغ هسته و سیتوپلاسم را در سلولهای اووسیت افزایش می‌دهند [۹]. و پس از هم کشتی با سلولهای فیبروبلاستی پتانسیل کلیواژ و تولید بلاستوسیستهای با کیفیت افزایش می‌یابد [۱۴].

نتیجه گیری

تکامل جنین دو سلولی موش با استفاده از تک لایه فیبروبلاستی جنینی موش در سیستم هم کشتی و در محیط آزمایشگاه نسبت به فیبروبلاستهای جنینی انسان بهتر است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که حمایت مالی این طرح تحقیقاتی با شماره ۸۱/۹ را بر عهده داشتند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Jasmin, Peters VM, Spray DC, Mendez-Otero R. Effect of mesenchymal stem cells and mouse embryonic fibroblasts on the development of preimplantation mouse embryos. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2016;52(4):497-506. DOI: 10.1007/s11626-015-9997-5 PMID: 26744031
2. Zhang D, Lv P, Zhang R, Luo Q, Ding G, Yin L, et al. A new model for embryo implantation: coculture of blastocysts and Ishikawa cells. Gynecol Endocrinol. 2012;28(4):288-92. DOI: 10.3109/09513590.2011.631623 PMID: 22106944
3. Torres A, Batista M, Diniz P, Mateus L, Lopes-da-Costa L. Embryo-luteal cells co-culture: an in vitro model to evaluate steroidogenic and prostanoid bovine early embryo-maternal interactions. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2013;49(2):134-46. DOI: 10.1007/s11626-012-9577-x PMID: 23358866
4. Menezo YJ, Servy E, Veiga A, Hazout A, Elder K. Culture systems: embryo co-culture. Methods Mol Biol. 2012; 912:231-47. DOI: 10.1007/978-1-61779-971-6_14 PMID: 22829378
5. Lee MS, Lee YS, Lee HH, Song HY. Human endometrial cell coculture reduces the endocrine disruptor toxicity on mouse embryo development. J Occup Med Toxicol. 2012; 7(1):7. DOI: 10.1186/1745-6673-7-7 PMID: 22546201
6. Bochev I, Belemezova K, Shterev A, Kyurkchiev S. Effect of cryopreservation on the properties of human endometrial stromal cells used in embryo co-culture systems. J Assist Reprod Genet. 2016;33(4):473-80. DOI: 10.1007/s10815-016-0651-2 PMID: 26758461
7. Sakamoto N, Kiuchi T, Sato M. Development of an endothelial-smooth muscle cell coculture model using phenotype-controlled smooth muscle cells. Ann Biomed Eng. 2011;39(11):2750-8. DOI: 10.1007/s10439-011-0372-8 PMID: 21811870
8. Nematollahi-mahani SN, Pahang H, Moshkdanian G, Nematollahi-mahani A. Effect of embryonic fibroblast cell co-culture on development of mouse embryos following exposure to visible light. J Assist Reprod Genet. 2009;26(2-3): 129-35. DOI: 10.1007/s10815-008-9290-6 PMID: 19184398
9. Hatoya S, Sugiyama Y, Torii R, Wijewardana V, Kumagai D, Sugiura K, et al. Effect of co-culturing with embryonic fibroblasts on IVM, IVF and IVC of canine oocytes. Theriogenology. 2006;66(5):1083-90. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.12.015 PMID: 16620932
10. Tagler D, Tu T, Smith RM, Anderson NR, Tingen CM, Woodruff TK, et al. Embryonic fibroblasts enable the culture of primary ovarian follicles within alginate hydrogels. Tissue Eng Part A. 2012;18(11-12):1229-38. DOI: 10.1089/ten.TEA.2011.0418 PMID: 22296562
11. Zeng J, Wang F, Mao M. Coculture of fi broblastlike synoviocytes with umbilical cordmesenchymal stem cells inhibits expression of proin fl ammatory proteins, induces

apoptosis and promotes chondrogenesis. Mol Med Rep. 2016;14(4):3887-93. DOI: 10.3892/mmr.2016.5721 PMID: 27599675
12. Heidari M, Malekshah AK, Parivar K, Khanbabaei R, Rafiei A. Effect of Fibroblast Co-culture on In Vitro Maturation and Fertilization of Mouse Preantral Follicles. Int J Fertil Steril. 2011;5(1):1-8. PMID: 24917917
13. Mateu R, Zivicova V, Krejci ED, Grim M, Strnad H, Vlcek C, et al. Functional differences between neonatal and adult fibroblasts and keratinocytes: Donor age affects epithelial-mesenchymal crosstalk in vitro. Int J Mol Med. 2016; 38(4):1063-74. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2706 PMID: 27513730
14. Nasr-Esfahani MH, Moulavi F, Hosseini SM, Hajian M, Shahverdi A. The effect of vero cell co-culture on in vitro maturation of bovine immature oocytes and further embryo development. Yakhteh Med J. 2008;9(4):240-7.

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Volume 10, Issue 1, Spring 2018

Research Article

Comparison of the Development of Two-cell Mouse Embryo after Co-Culture with Mouse and Human Embryonic Fibroblasts

Hassan Pahang [1,*], Seyed Noureddin Nematollahi Mahani [2]

[1] Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[2] Professor, Department of Anatomy, Embryology, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
*** Corresponding author:** Hassan Pahang, Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: Pahang_hasan@yahoo.com

DOI: 10.29252/nkjmd-0100112

How to Cite this Article:
Pahang H, Nematollahi Mahani S N. Comparison of the Development of Two-cell Mouse Embryo after Co-Culture with Mouse and Human Embryonic Fibroblasts. JNKUMS. 2018; 10 (1) :86-91
URL: http://journal.nkums.ac.ir/article-1-1418-fa.html

Received: 18 Oct 2017
Accepted: 11 Mar 2018

Keywords:
Two-cell Embryo
Co-culture
Mouse Embryonic Fibroblast
Human Embryonic Fibroblast

Abstract

Introduction: Co-culture systems showed that feeder cells have positive effects on the development of fetus before implantation. In the present study, the effects of mouse embryonic fibroblasts (MEF) and human embryonic fibroblast (HEF) co-culture on two-cell mouse embryos in the early developmental stage were compared.

Methods: Two-cell mouse embryos extracted from the Balb/C mice uterine tubes were divided randomly to three groups as follow: the control group (G1) that cultured alone, the first experimental group (G2 group) that co-cultured with HEF, and the second experimental group (G3 group) that co-cultured with MEF. Also, the embryos in all groups cultured in the same culture medium (MEM-α (under the standard conditions such as incubation under liquid paraffin and daily evaluation for hatching stage. Then, data were analyzed by the Mann-Whitney and Student t test ($P < 0.05$).

Results: The results of the current study showed that the development of embryos in terms of blastulation and hatching rate was significantly increased in the G2 group than the control group ($P < 0.05$). Also, the blastomere in G2 group had higher quality than the other groups. It seems that fibroblasts could protect embryos against deleterious agents through oxidative stress deletion and cell metabolism regulation.

Conclusions: The current in vitro study showed that the monolayer of MEF is better than that of HEF to develop two-cell mouse embryos.