Archive of SID

بررسی اثرات محیط‌های کشت مختلف بر تکامل جنین و سلولـهای اپی‌تلیال لولـه رحم انسان

معرفت غفاری (M.D., Ph.D.)[1]، محمد مهدی آخوندی(Ph.D.)[1]، مهناز حیدری(M.S.)[2].

۱-استادیار، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.

۲-مربی، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.

چکیده

استفاده از کشت همزمان سلولـهای اپی‌تلیال لولـه رحم با جنین، یکی از راههای تسهیل بررسـی تکامـل جنـین در محیط آزمایشگاه می‌باشد؛ ولی فقدان محیطی مناسب برای تکامل جنین و سلولـهای اپی‌تلیال لولـه رحـم از مشکلات این روش است. در این مطالعه اثرات محیط‌های مختلف کشت بر روی سلولـهای اپی‌تلیال لولـه رحـم و تکامل جنین بررسی شده است. سلولـهای لولـه رحـم از ۱۹ زن زیـر ٤٠ سـال بـا سـابقه بـاروری و بـدون داشتن ضایعه پاتولوژیک لولـه رحم بـه طریـق هیسـترکتومی کامـل شـکمی تهیـه گردیـد. سلولـهای غنـی از اپی‌تلیال لولـه رحم به صورت آنزیمی و مکانیکی تهیه و در سـه محـیط کشـت DMEM/F12، RPMI-1640 و Ham's F10 کشت داده شدند. پس از ٤ بار پاساژ سلولی، سلولـها به مدت ۷ روز بر روی پلاسـتیک و مـاتری ژل به منظور تهیه سلولـهای پولاریزه کشت داده شدند. قابلیت حیات و مرگ سلولـها در طی پاساژهای سلولی و بعد از آن به وسیله رنگ‌آمیزی حیاتی نوترال رد و تریپان بلـو بررسـی گردیـد. بعـلاوه ۱۱۷، ٤٥، ٤٨ جنـین اضافی ۸-٤ سلولی انسان به ترتیب در محیطهـای Ham's F10 ، RPMI- 1640 ، DMEM/F12 بـه مـدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شد و مورفولوژی آنها هر ۲٤ ساعت بررسی گردید. قابلیت حیات سـلولـها در طـی کشـت اولیه و پاساژ سلولی در محیط DMEM/F12 ۱۰۰٪ بـود کـه در مقایسـه بـا RPMI-1640 (۹٥٪) و Ham F10 (۹۳٪) معنی‌دار بود(P<۰/۰٥)؛ ولی پس از پاساژ سلولی تفاوت معنی‌داری بین محیطهـای مختلـف دیـده نشـد. درصد جنین‌هایی که در محیط Ham's F10 به مرحلـه مـورولا رسـیده بودنـد ۷۹/٤٪ بـود کـه در مقایسـه بـا RPMI-1640 (٦۸/۸٪) و DMEM/F12 (٦۲/٥٪) بطور معنی‌داری بیشتر بود(P<۰/۰٥). از این مطالعه مـی‌تـوان نتیجه گرفت کـه محـیط DMEM/F12 درطـی پاسـاژ و تکثیـر سلولـهای لولـه رحمـی نسـبت بـه محیطهـای Ham's F10 و PRMI-1640 ارجحیت دارد؛ ولی بعد از پاساژ سلولی و در مرحلـه کشـت همزمـان، سلولـهای لولـه رحمی با جنین، محیط Ham's F10 نسبت به محیط‌های دیگر مناسب‌تر می‌باشد.

گل واژگان: لوله رحم، هم‌کشتی، تکامل جنین، انسان و محیط‌های کشت.

آدرس مکاتبه: دکتر معرفت غفاری، گروه غدد تولیدمثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده ابن‌سینا، صندوق‌پستی ۱۷۷-۱۹۸۳٥، تهران، ایران.

پست الکترونیک: mghaffarin@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تکنیک‌های کمـک بـاروری آزمایشـگاهی (ART)[1] بطـور قابل ملاحظه‌ای مشکلات زوجهای نابارور را حل نمـوده است؛ ولی علیرغم گذشت بیش از دو دهه از تولد اولـین نوزاد آزمایشگاهی، هنـوز میـزان تولـد نـوزاد سـالم از طریق ART نسـبتاً پـایین و در حـدود ۲۰٪ بـاقی‌مانـده است. یکی از مهمترین علل کاهش ایـن موفقیـت، کیفیـت نامطلوب شرایط محیط آزمایشگاهی برای رشـد و نمـو جنین قبل از لانه‌گزینی می‌باشد. مطالعات انجام شده بـر روی گونه‌های مختلف پستانداران دلالت بر آن دارد کـه میزان تکامل(۱)، تعداد سلول(۲)، فعالیت بیوشیمیایی(۳)، قدرت حیات(٤) جنین در محیط آزمایشـگاه پـایین‌تـر از محیط داخل بدن می‌باشد. تکامل اکثر جنین‌ها در مرحله ۸-٤ سلولی (زمان فعال‌شدن ژنوم جنین) به دنبال کشت در آزمایشگاه متوقف می‌شود(٥،٦). توقف تکاملی سبب می‌گردد که در عمـل جنـین‌هـا در مراحـل اولیـه تقسـیم (۸-٤ سـلولی) بـه داخـل رحـم منتقـل شـوند و انتقـال زودرس جنین‌ها، سـبب ناهمـاهنگی کامـل بـین رشـد و تکامل جنین و اندومتر می‌گردد که به همـراه کیفیـت بـد مورفولوژیک و متـابولیکی جنـین باعـث کـاهش میـزان لانه‌گزینی و حاملگی می‌شود.

تلاشهای متعدد بـرای بهبـود شـرایط محـیط کشـت بـه وسـیله تعـدیل الکترولیـت‌هـا و منـابع انـرژی بـا محدودیت‌هایی درموفقیت روبرو شده است(۷،۸). ابـداع سیستم کشت همزمان جنین با استفاده از انواع مختلـف سلولـهای حمایت‌کننده وسیله مؤثرتری بـرای نگهـداری و رشد و تکامل جنین در محیط آزمایشگاه فراهم نموده است و به ما اجازه مـی‌دهـد تـا میـزان تکامـل جنـین را بهبـود بخشـیم و در نهایـت میـزان حـاملگی را افـزایش دهیم(۹). متداولترین رده‌های سلولی مورد استفاده برای تکامـل جنـین انسـان سلولـهای اپـی‌تلیـال لولـه رحـم گوسـاله[2] (۱۰)، سلولـهای کلیـه میمـون سـبز آفریقـایی[3](۱۱)، سلولـهای گرانولـوزا(۱۲) و سـلولهای اپی‌تلیال لولـه رحم انسان می‌باشند(۱۳). میزان موفقیـت سیسـتم کشـت همزمـان بسـتگی بـه رده‌هـای مختلـف سلولی و محیط‌های کشت مورد استفاده برای نگهـداری سلولـها دارد. با توجه به نقش بالقوه سلولـهای اپی‌تلیال لولـه رحم در تکامل جنین قبـل از لانـه‌گزینـی در داخـل بـدن، بـه نظـر مـی‌رسـد ایـن سلولـها بهتـرین سـلول حمایت‌کننده در سیستم کشت همزمان برای تکامل جنین در محیط آزمایشگاه[4] می‌باشند(١٤).

تـا کنـون محیطهـای مختلفـی از جملـه RPMI-1640, Ham's F10, DMEM/F12 در کشـت سلول به کار برده شده است؛ ولی تا کنون در هیچ کدام از این مطالعات مقایسـه‌ای بـین اثـرات ایـن محیطهـا بـا یکدیگر و بر روی تکامـل جنـین و سلولـهای اپـی‌تلیـال لولـه رحم به طور جداگانـه در محـیط آزمایشـگاهی بـه عمل نیامده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات این محیط‌ها بر روی سلولـهای اپی‌تلیال لولـه رحـم انسـان (کشـت داده شـده بـه روش منـولایر و پـولاریزه) در مراحل کشت اولیه و پاسـاژ سـلولی و تکامـل جنـین در محیط آزمایشگاه می‌باشد.

مواد وروشها

۱- تهیه بافت لولـه رحم انسان

بافت لولـه رحم از بین مراجعین بخش جراحی زنان بیمارستان میرزا کوچک‌خان، پس از هیسترکتومی کامل شکمی از ۱۹ زن بین سنین ۳۱-٤٥ سال، با سابقه حداقل یک حاملگی موفق و سیکل قاعدگی منظم ۲۵ تا ۳۵ روز، به دلیل فیبروئید رحمی یا دلایل دیگر بدون وجود اشکال پاتولوژیک در لولـه رحم تهیه شد. تمام بافت‌ها با اطلاع و رضایت کامل بیماران و مجوز کمیته اخلاقی پژوهشکدهٔ ابن‌سینا جمع‌آوری شدند. سپس لولـه‌های رحمی در شرایط استریل داخل محلول

1-Assisted Reproductive Technology
2-Bovin
3-Vero
4-In vitro

www.SID.ir

Archive of SID

HBSS[1] ۱۰٪ (Sigma,USA) که حاوی پنی‌سیلین ۱۰۰ *IU/ml* و استرپتومایسین ۱۰۰ *µg/ml* (Sigma,USA) بود، قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شد.

۲- کشت اولیه سلولهای اپی‌تلیال لوله رحم به صورت منولایر:

ابتدا لوله رحم در ظرف کشت[2] قرار داده و با HBSS استریل شستشو شد و سپس لوله توسط پنس و قیچی به صورت طولی از ناحیه شیپور تا انتها برش داده شد تا قسمت داخلی مشخص گردد. پس از آن تکه‌های کوچک بافت پوششی (به ابعاد $1mm^3$) از قسمت آمپول لوله رحم توسط قیچی بریده شد و سپس توسط تیغ اسکالپل به تکه‌های کوچکتری تقسیم گردید و به داخل لوله سانتریفوژ حاوی ۵*ml* از محلول کلاژناز[3] ۰/۲۵٪ درجه نوع ٤ (Sigma,USA) که در HBSS ۱۰٪ (Sigma,USA) تهیه شده بود منتقل و در درجه حرارت 37^0c به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. در این مدت لوله با ورتکس هر ۱۵ دقیقه تکان داده می‌شد. پس از ۱ ساعت سلولهای جدا شده از هم، ته‌نشین شدند. قسمت روئی (حاوی کلاژناز) برداشته شد و سپس بافت ته‌نشین شده با ۵*ml*، HBSS ۱۰٪ بصورت سوسپانسیون سلولی درآمد. پس از آن محلول روئی برداشته و بطور مساوی در سه لوله سانتریفوژ ریخته شد و با دور ۱۰۰۰g برای مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس قسمت روئی دور ریخته و رسوب‌ها با ۵*ml* محیطهای کشت DMEM/Ham`s F12 و RPMI و Ham`sF10 حاوی پنی‌سیلین ۱۰۰*IU/ml* و استریتومایسین ۱۰۰*mg/µl* (Sigma,USA)، ۲/۵٪ سرم جنین گوساله (GIBCO,Germany) و ۲/۵٪ NU سرم (GIBCO,Germany) به حالت تعلیق درآمدند. لازم به ذکر است محیط Ham`s F10 علاوه بر مواد فوق شامل کلسیم لاکتات ۲/۵٪ و بی‌کربنات سدیم بود. سپس سلولها به داخل فلاسک۲۵*ml* ریخته شدند و داخل انکوباتور با دمای 37^oc، حاوی $5\%Co_2$ به مدت ۳ روز بدون تکان دادن قرار گرفتند. فلاسک‌ها سپس در روز چهارم به وسیله میکروسکوپ نوری بررسی و همزمان با مشاهده جزایر یا تکه‌های سلولی چسبیده به فلاسک محیطهای کشت تعویض شدند. همزمان با تشکیل پوشش تک لایه‌ای سلولی[4] (حدود روز هفتم) سلولها به داخل فلاسک دیگری پاساژ داده شدند. میزان موفقیت جداسازی سلولهای اپی‌تلیال از سایر سلولهای لوله رحمی به وسیله میکروسکوپ با فاز کنتراست (Olympus,Japan) یا ایمنوهیستوشیمی بررسی شد.

۳- پاساژ سلولی

ابتدا محیط کشت داخل فلاسک خارج شد و سپس سلولهای داخل فلاسک در مجاورت ۳-۲*ml* از محلول تریپسین ۰/۲۵٪ (Merck,Germany) قرار گرفتند و به مدت ۲ دقیقه در دمای 37^oC انکوبه شدند. بعد از جداشدن سلولها از کف فلاسک سوسپانسیون سلولی به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰g سانتریفوژ شد. سپس سلولها با HBSS دو بار شستشو شد تا آنزیمهای تریپسین فعال حذف گردد. پس از آن روی رسوب سلولی محیط کشت اضافه شد و بعد از گذشت ٥-٤ روز، سلولهایی که در طی عمل آنزیم تریسپین از سطح فلاسک جدا شده بودند به تدریج اتصالات خود را به سطح پلیت ایجاد کرده و سلولها شروع به رشد و تکثیر نمودند. در این مطالعه تا ٤ مرحله پاساژ سلولی انجام گرفت.

۴- کشت پولاریزه سلولهای اپی‌تلیال لوله رحم

نوع HA Milli Cell Insert با پرزهای ۰/۵*µm* (Millipore,USA) در داخل پلیت کشت ۲٤ حفره‌ای گذاشته و حدود ۲۰۰*µl* از ماتریکس خارج سلولی

1-Hank`s Balance Salt Solution
2-Petri dish
3-Collagenaze
4-Confluence

www.SID.ir

Archive of SID

(Uniscience Collaborative Biomedical (Matrigel) Products, Bedford,USA) داخل میلی‌سل ریخته و بعد ۵۰۰ μl سوسپانسیون سلولهای اپی‌تلیال روی ماتری‌ژل قرارداده شد و ۰/۵ml محیط کشت در اطراف میلی‌سل ریخته شد تا محیط کشت از طریق سوراخهای قسمت تحتانی میلی‌سل به سلولهای اپی‌تلیال لوله رحم برسد. سپس پلیت در یک انکوباتور با CO_2 ۵٪ و $O_2$۹۵٪ و درجه حرارت 37^0c گذاشته و ۷۲ ساعت بعد محیط کشت تعویض شد. سلولها به مدت ۷ روز کشت داده شدند و سپس زیر میکروسکوپ نوری (Ziss-Germany) مورد مطالعه قرار گرفتند.

۵- نوع سلول کشت داده شده :

میزان موفقیت جداسازی سلولهای اپی تلیال از سایر سلولهای لوله رحمی به وسیله میکروسکوپ با فاز کنتراست یا ایمنوهیستوشیمی بررسی شد.

۱-۵- روش ایمونوهیستوشیمی(۱۵):

تمام مواد شیمیایی بکار رفته در این آزمایش از Sigma تهیه شده است. سلولهای منولایر اپی‌تلیال اولیه و پاساژ داده شده برای سایتوکراتین و ویمنتین رنگ‌آمیزی شدند تا طبیعت اپی‌تلیالی آنها تأئید گردد. نیمی از سلولها برای شناسایی سایتوکراتین (تعیین مورفولوژی اپی‌تلیال) و نصف دیگر از سلولها برای شناسایی ویمنتین (تعیین مورفولوژی فیبروبلاستیک) رنگ‌آمیزی ایمنوشیمی شدند. ابتد محیط سلولها تعویض شد و سپس سلولها به مدت ۱/۵ دقیقه با محلول۵۰:۵۰ استن و متانل مجاور و با بافرتریس[1] ۰/۰۵M در سالین ایزوتونیک ۰/۱۵M شستشو داده شد. پس از آن سلولها با آنتی‌بادی اولیه سایتوکراتین با رقت۱:۴۰۰ و آنتی ویمنتین با رقت ۱:۲۰۰ که توسط بافرتریس رقیق شده بودند را به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه و سپس با بافر تریس در رقت ۱: ۲۰ از آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی (DAKO, DK-2600 Glostrup, Denmark) تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد تا از هر گونه واکنش متقاطع جلوگیری شود. محلول آنتی‌آلکالین فسفاتاز موشی که حاوی یک محلول سوبسترا/رنگ[2] شامل ۲mg نفتول فسفات[3]، ۰/۲ml دی‌متیل فرمامید[4]، ۱۰ml محلول لوامیزول[5] ۱M و ۱۰mg TR Fast Red Salt بود و در ۱۰ml بافر تریس تهیه شده بود به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و سپس از محلول رقت ۱:۴۰ در بافرتریس تهیه شد و سلولها بعد از شستشو به مدت ۳۰ دقیقه با آن انکوبه شدند. و سرانجام سلولها با تریس شستو داده شد و بعد با Gill's Haematoxylin به مدت ۱ دقیقه انکوبه و بعد بر روی لام قرار داده شدند و توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۶- قابلیت زیست و کیفیت سلولها

۱ـ۶ـ بررسی مورفولوژیک سلولها با میکروسکوپ نوری:

سلولها در زیر میکروسکوپ به صورت کشت منولایر و کشت پولاریزه کاملاً شفاف می‌باشند و نور را از خود عبور می‌دهند. در صورتی که سلولهای غیر طبیعی و در حال مرگ به صورت تیره و با گرانولهای داخلی کاملاً مشخص دیده می‌شوند که در اینصورت مسلم است که سلولها وارد فاز مرگ شده‌اند.

۲ـ۶ـ روش رنگ سنجی(۱۶):

از محلول ذخیره ۵mg/ml قرمز خنثی[6] (۳- آمینو ۳-۷- دی‌متیل‌آمینو ۲- متیل فنازین هیدرو کلراید) (Merck-Germany) با رقت ۴۰ $\mu g/ml$ در آب مقطر تهیه و به مدت یک شب در انکوباتور 37^oC قرار داده شد. سپس لوله حاوی قرمز خنثی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰g سانتریفوژ گردید تا رسوب‌های کریستالی از محیط رنگ خارج شود. از محلول روئی رنگ برای انجام آزمایشات استفاده شد. پس از آن محیط رویی

1-Buffer tris

2-Substrate/ Stain
3-Naphtol AS Phosphate
4-Dimethyl formamide
5-Levamisole
6-Neutral red

www.SID.ir

Archive of SID

سلولـها به آرامی خارج و ۲۰۰μl از رنگ قرمز خنثی بـه آن اضافه و به مدت ۳ ساعت انکوبه شـدند (سلولـهای زنـده، رنـگ قرمـز خنثـی را توسـط لیزوزمهـای غشـاء سیتوپلاسمی سلول جذب می‌کنـد و بعـد از ثابـت‌کـردن سلولـها با فرمالدئید و لیز سلولی با اتانل و اسید استیک میزان رنگ آزاد شده از سلولـهای زنده توسط دسـتگاه الایزاریدر[1] در طول مـوج ٥٤٠nm خوانـده شـد و آنگـاه درصد سلولـهای زنده نسبت به مرده محاسبه گردید.

۳ـ۶ـ روش رنگ‌سنجی Trypan blue (۱۶):

تریپـان بلـو (Merck-Germany) ٠/٤٪ در PBS[2] تهیـه شد. ابتدا سلولـها در معرض تریپسین قـرار داده شـد و سوسپانسیون سـلولی بـه نسـبت ۱:۱ (رقـت سـلول بـه تریپان بلو) تهیه گردید و بر روی لام نئوبـار قـرار داده شـد. بـا شـمارش تعـداد سلولـهای مـرده توسـط میکروسکوپ، نسبت سلولهای مـرده بـه کـل سلولـهای موجود و درصد سلولـهای زنده محاسبه گردید.

۷- بررسی محیط‌های کشت مختلف بر روی قابلیت حیـات سلولـهای لولـه رحم انسان:

قابلیـت زیسـت سلولـهای لولـه رحمـی در محیط‌های کشـت ROMI-1640, DMEM/Ham`s F12 و Ham`s F10 در مرحله کشت اولیـه و پاسـاژ بوسـیله رنگ‌آمیزی حیاتی مورد مطالعه قرار داده و مقایسه شد.

۸- تهیـه جنـین هـای اضـافه وارزیـابی آنهـا از نظـر مورفولوژیکی:

تعداد ۲۱۰ جنین اضافه از بیماران تحت درمان بـا IVF[3] یا ICSI[4] تهیه شـد. از تمـام بیمـاران رضـایتنامه کتبـی برای استفاده از جنینهای اضـافه آنهـا دریافـت شـد. در این بیماران بـرای تحریـک تخمـک گـذاری از پروتوکـل طـولانی (Buserelin, Hoechest) GnRHa و HMG (Pergonal, Serono) استفاده گردید. پاسخ به درمان به وسـیله سـونوگرافی لگنـی واژینـال بـا دسـتگاه (Aloka-SD900-Japan) و انـدازه‌گیـری مکـرر میـزان استرادیول سرم پی‌گیری شـد. تخمـک گـذاری بوسـیله ۱۰۰۰۰ واحد HCG بطور عضـلانی تحریـک گردیـد. ۳٦ ساعت بعد تخمکها با هدایت سونوگرافی جمع‌آوری شد. پـس از انجـام IVF یـا ICSI بـاروری اووسـیت ۲۰-۱٦ ساعت بعد از تلقیح بـه وسـیله وجـود دو پرونوکلئـوس تأیید شـد. ٤٨ سـاعت بعـد، بعـد از جمـع آوری تخمـک، حدود ٤ جنین ٤-۸ سلولی به داخل رحم منتقل گردیـد و بقیه جنین‌ها پس از ارزیابی آنها از نظـر مورفولـوژی و عـدم درخواسـت زوج بـرای منجمـدکـردن[5] جنـین‌هـای اضافه، امکان استفاده این جنین‌ها، برای تحقیقات بعـدی فراهم شد.

۹- بررسی محیطهای کشت مختلف بر روی تکوین جنینهای انسان:

جنین‌های اضافی بدست آمده ابتدا از نظر مورفولوژی بررسی و پس از درجه‌بندی، در محیطهای کشت DMEM/Ham`sF12, RPMI-1640, Ham`sF10 قرار داده شدند و مراحل رشد وتقسیم آن تا مرحله بلاستوسیست توسط میکروسکوپ اینورت لوپ در زمانهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج با استفاده از آزمون مجذور کا و با $P<0/05$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

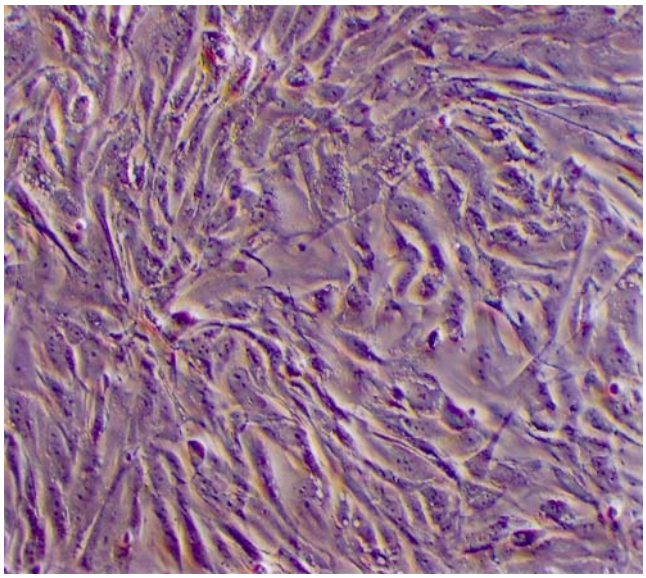
کیفیت و نوع سلول طی کشت اولیـه و پاسـاژ سلولـهای آمپول لولـه رحم:

مشاهده کشت اولیه سلولـهای آمپول لولـه رحم توسـط میکروسـکوپ اینـورت Phase-Contrast در روز ۷-٦ نشان داد که سلولـها بسـیار متـراکم هسـتند و الگـوی اپی‌تلیوئیدی دارند و حرکت مژکها قابل رؤیت می‌باشـد. همچنین چندین توده سلولی در حال تقسیم میتوز دیـده

1-ELISA Reader
2-Phosphat Buffer Saline
3-In Vitro Fertilization
4-Intracytoplasmic Sperm Injection
5-Freeze

www.SID.ir

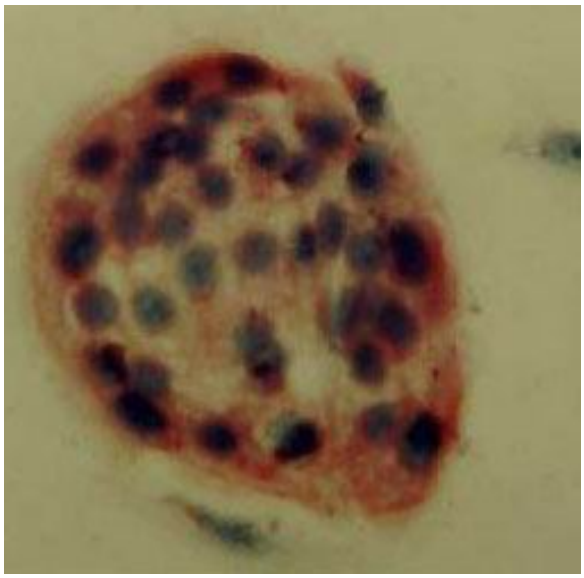
Archive of SID



شکل شماره ۱- مورفولوژی سلولهای اپی‌تلیال لوله رحم بعد از گذشت ۵-۴ روز در محیط کشت DMEM/Ham`sF12 و با تشکیل پوشش سلولی تک لایه ۱۰۰٪

شد. هیچ رابطه‌ای بین رشـد و کیفیـت سـلول در محـیط آزمایشگاه با سن بیمار و مرحله سیکل قاعدگی مشاهده نشد. سلولـهای جمع‌آوری شده در مرحلـه فولیکـولی و ترشحی همگی ظاهر اپی‌تلیوئیدی در کشت اولیه داشتند. (شکل شماره ۱) بررسی ایمنوهیستوشیمی انجـام شـده در کشت اولیه نشـان داد کـه اکثریـت (۹۸٪) سلولـهای کشـت داده شـده از نـوع اپـی‌تلیـالی بـوده و درصـد سلولـــهای اســـتروما بســـیار انـــدک مـــی‌باشـــد (شکل شماره ۲).

سلولـها تا چندین پاساژ (چهار پاسـاژ در ایـن مطالعـه) قادر به زنده ماندن بودند. در طـی پاسـاژها زمـان لازم برای تشکیل حالت پوشش سلولی تک لایه حدود ٤ روز بود. مورفولوژی سلولـها با ادامه پاساژ تغییر مـی‌کـرد. بطوریکه در پاسـاژ اول، سلولـــها اپـی‌تلیوئیـدی بودنـد در صـــورتی کـــه در پاســـاژ دوم و ســـوم سلولـــها شـــبیه سلولـــهای فیبروبلاســـت بودنـــد کـــه ظـــاهری دراز، دوکی شکل با چنـدین زائـده سیتوپلاسـمیک دراز داشتند.



شکل شماره ۲- تصویر ایمنوهیستوشیمی سلولهای لولهٔ رحم بعد از ۵ روز کشت منولایر-سلولهای آنتی‌سایتوکراتین مثبت (سلولهای اپی‌تلیال) به طور فراوان دیده می‌شود

کشت پولاریزه سلولـهای آمپول لولـه رحم انسان:

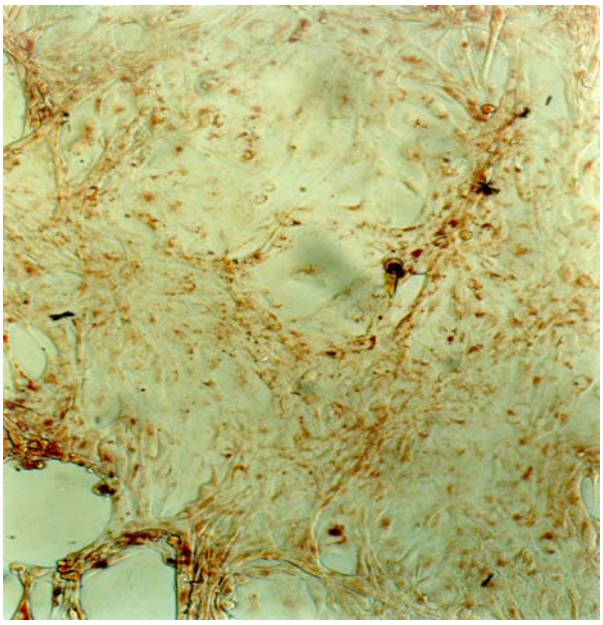
سلولـهای اپی‌تلیالی در کشت منولایر از نظر سـاختمانی بصورت پهـن، اپـی‌تلیوئیـدی و سنگفرشـی بودنـد و تـا زمانیکه تمام سطح پلاستیک را اشغال کنند به رشد خود ادامـه دادنـد و میتـوز فـراوان داشـتند. در صـورتیکه سلولـها در کشت پـولاریزه میتـوز محـدود و پـولاریزه داشـتند و ماننـد حالـت in vivo تمـام سـطوح فوقـانی، تحتانی، جانبی سلولـها از همدیگر قابل تشخیص بود.

قابلیت زیست سلولـها در محیط‌های کشت مختلف:

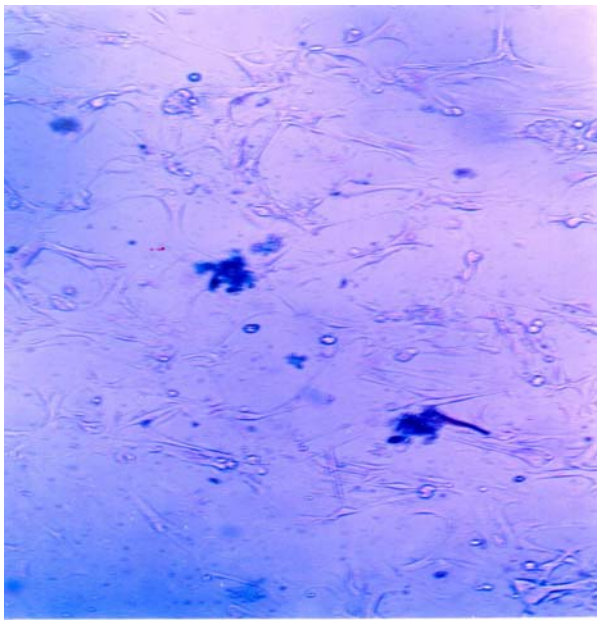
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی حیاتی نشان داد کـه قابلیـت حیـــات سلولـــها در طـــی کشـــت اولیـــه سلولـــهای اپـــی‌تلیـــال لولـــه رحـــم در محـــیط‌هـــای کشـــت DMEM/F12 RPMI-1640 و Ham`s F10 بـه ترتیـب ۹۹/۸٪، ۹۵٪ و ۹۳٪ بـود کـه بطـور معنـی‌داری محـیط کشت DMEM/F12 نسبت به دو محیط دیگـر ارجحیـت داشت. ولی پـس از پاسـاژ سـلولی و کشـت سلولـــها و

www.SID.ir

Archive of SID



شکل شماره ۳- قابلیت حیات سلولی به روش قرمز خنثی



شکل شماره ۴- قابلیت حیات سلولی به روش تریپان بلو

انجام کشت پولاریزه تفاوت معنی‌داری در قابلیت حیات بین محیط‌های کشت مختلف دیده نشد.

مقایسه میزان رشد و تکامل جنین‌های ۸-۴ سلولی در محیط‌های کشت مختلف:

میزان رشد و تکامل جنین‌های ٤-۸ سلولی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. درصد جنینها ۸-٤ سلولی که پس از ۷۲ ساعت به مرحله ۸ سلولی (مورولا) رسیده‌اند بطور معنی‌داری در محیط Ham`sF10 ( P<۰/۰۵) نسبت به محیط DMEM/F12, RPMI-1640 بیشتر بود(شکل شماره ۳). تنها ٦ مورولا (۵/۱٪) جنینها در محیط Ham`sF10 به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند و در محیطهای DMEM/F12 و RPMI-1640 هیچ جنین ٨-٤ سلولی به مرحله بلاستوسیست نرسیده بود. تفاوت معنی‌داری بین محیطهای کشتRPMI-1640 و DMEM/Ham`sF12 در تکامل جنین ٨-٤ سلولی به مرحله مورولا و بلاستوسیست دیده نشد(P>۰/۰۵).

بحث

در این مطالعه به منظور ایجاد شرایطی مناسب و مشابه با داخل بدن برای رشد و تکامل جنین قبل از لانه‌گزینی، سلولهای اپی‌تلیال لوله رحم به دو روش منولایر و پولاریزه کشت داده شدند و قدرت حیات و کیفیت آنها بعد از کشت اولیه و چند بار پاساژ سلولی با محیطهای مختلف کشت مقایسه شد. با توجه به اینکه لقاح و مراحل تکاملی رشد جنین تا مرحله بلاستوسیت در داخل لوله رحم رخ می‌دهد و سلولهای اپی‌تلیال لوله رحم گلیکوپروتئین خاصی تولید می‌کند که مانع توقف تکاملی جنین در مرحله ٤-۸ سلولی می‌شود(۱۷) و بعلاوه تماس و میانکنش[1] بین جنین و سلولهای لوله رحم باعث تکامل جنین می‌شود(۱۸). اخیراً نشان داده شده که چندین فاکتور مفید برای رشد جنین مانند CSF-1[2]، LIF[1]، EGF،

1-Interaction
2-Colony Stimulation Factor

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱- مقایسه میزان رشد و تکامل جنین‌های ۴-۸ سلولی در محیط‌های کشت مختلف

مراحل جنینی / محیط	تعداد جنین ۴-۸ سلولی	تعداد جنین در مرحله مورولا	تعداد جنین در مرحله بلاستوسیست
Ham`sF10	۱۱۷	۹۳ (٪۷۹/۴)	۶ (٪۵/۱)
RPMI/1640	۴۵	۳۱ (٪۶۸/۸)	۰ (٪۰)
DMEM/F12	۴۸	۳۰ (٪۶۲/۵)	۰ (٪۰)

*** با توجه به نتایج جدول فوق می‌توان نتیجه گرفت که تکوین جنین در محیط Ham`sF10 به طور معنی‌داری بیش از RPMI-1640, DMEM/F12 بوده است(P<۰/۰۵).**

IL-2[۳] به وسیله سلولـهای اپی‌تلیـال لولــه رحـم تولیـد می‌شود(۱۹-۲۰). بنابراین به منظـور رسـیدن بـه حالـت فیزیولوژیک و مشابه با داخـل بـدن، در ایـن مطالعـه از سلولـهای اپی‌تلیال لولـه رحم انسان اسـتفاده شـد. اگـر چه مطالعات مختلف نشان داده است که کشت همزمـان با استفاده از سلولـهای با منشأ لولـه رحمی (۱۳) و غیر لولــه رحمـی (۱۱-۱۲) هـر دو قـادر بـه بهبـود رشـد و تکامـل جنـین در محـیط آزمایشـگاهی مـی‌باشـند؛ ولـی مطالعه مقایسه‌ای بین تـأثیر سلولــهای بـا منشـأ لولــه رحمی و غیر لولـه رحمی بر روی تکامل جنین در محیط آزمایشـگاه صـورت نگرفتـه اسـت. بعـلاوه اسـتفاده از سلولـهای لولـه رحـم حیـوانی از نظـر اخلاقـی مطلـوب نبود زیرا خطر انتقال بیماری‌های ناشناخته حیـوانی بـه جنین یا مادر وجود دارد.

در این مطالعه از لولــه رحمـی غیرپاتولوژیـک اسـتفاده شــد. زیــرا محــیط پاتولوژیــک لولــه رحــم در هیدروسالپنکس میزان حاملگی را کاهش و سبب افزایش ســقط جنــین مــی‌شــود کــه ممکــن اســت به دلیل عملکرد و ترشحات مضـر سلولــهای اپـی‌تلیـال لولـه رحم باشد(۲۱).

بهترین حالت برای داشتن شرایطی مشابه با داخل بـدن استفاده از کشت لولـه رحم دسـت نخـورده[۴] مـی‌باشـد. اگر چـه بافـت از نظـر سـاختمانی در ایـن روش تغییـر نمی‌کند ولـی بـدلیل عـدم پرفیـوژن[۵] و نرسـیدن محـیط کشت به قسمتهای مرکزی، بافت سریعاً نکروزه شـده و از بین می‌رود. لذا استفاده از این مدل در سیستم کشـت همزمان مقدور نبوده است؛ زیرا نیـاز دارد کـه سلولــها حداقل ٦-٥ روز در محیط کشـت زنـده بـاقی بماننـد تـا جنین به مرحله بلاستوسیت برسد. لذا ما در این مطالعه از کشت سـلولی منفـرد (منـولایر و پـولاریزه) اسـتفاده نمودیم.

این مطالعه نشان داد که در کشت اولیـه بـدون در نظـر گرفتن زمان انجام بیوپسی (مرحله فولیکولی یا ترشحی سـیکل قاعـدگی) بطـور موفقیـت آمیـزی در روز ٦-٧ پوشش تک لایه سلولی ایجاد می‌شود و سلولـها قادر به زنده ماندن بمدت طولانی می‌باشند. اکثر سلولـها در این کشت منشأ اپی‌تلیوئیدی داشـتند کـه بعـد از پاسـاژهای سوم و چهارم سلولــها از حالـت اپـی‌تلیوئیـدی بحالـت فیبروبلاستی تبدیل شدند. این نتایج با یافته‌های Yeung و همکاران (۲۲)، Bongso و همکاران (۲۳) و Takeuchi

3-Leukemin Inhibitory Factor
4-Epidermual Growth Factor
1-Interleukin-2

2-Explant culture
3-Perfusion

www.SID.ir

Archive of SID

شکل شماره ۵- کشت جنین در محیط کشت Ham`sF10 در وضعیت موررولا

و همکـــاران (۲٤) کـــه بـــه ترتیـــب از محیطهـــای RPMI/1640, DMEM/F12 و Ham`sF10 برای رشد و تکثیر سـلولهای اپی‌تلیـال لولـه رحـم انسـان اسـتفاده نمودند مطابقت داشت. لذا با توجـه بـه تغییـر ماهیـت و مورفولوژی سلولـها در طـی پاسـاژهای مختلـف بهتـر است از پاساژهای سوم بـه بعـد بـرای کشـت همزمـان استفاده نشود.

سلولـــهای اپـی‌تلیـال لولـــه رحـم از دو نـوع مشـخص مژک‌دار و ترشحی می‌باشند(۲۵). این مطالعه نشـان داد که در مرحله کشت اولیه سلولی هر دو سـلول مـژک‌دار و ترشحی دیده مـی‌شـود کـه بـا ادامـه پاسـاژ سـلولی، سلولـهای مژک‌دار، مژک خـود را از دسـت مـی‌دهنـد و تبـدیل بـه نـوع ترشـحی مـی‌شـوند یـا در آزمایشـگاه می‌میرند و اجازه می‌دهند که نوع ترشحی در پاساژهای اول به بعد اکثریت سلولـها را تشکیل دهند. احتمالاً بدلیل فقدان نقش فیزیولوژیک برای انتقال تخمـک و جنـین در محیط آزمایشـگاه و فقـدان حرکـات پریسـتالتیک لولـه رحم، سلولـهای مژک‌دار عملکرد خود را از دست داده و نقش ترشحی به خود مـی‌گیرنـد. همچنـین بـا توجـه بـه اینکه مژک‌سازی در سلولـهای اپی‌تلیـال در انتهـای فـاز فولیکـولی سـیکل قاعـدگی بـه دنبـال افـزایش میـزان هورمـون اسـتروژن ایجـاد مـی‌شـود(۲٦). فقـدان ایـن هورمون در محیط آزمایشگاه ممکن است سبب از دست رفتن مژک این سلولـها شود. به نظر می‌رسد سلولـهای ترشحی در حضور مواد مغذی موجود در محیط کشـت خیلی فعال می‌باشند و ترشحات زیادی را داخـل محـیط آزاد می‌کنند؛ لذا بهتر اسـت سلولـــهای اپـی‌تلیـال لولـــه رحم برای انجام کشت همزمـان را بعـد از پاسـاژ اولیـه استفاده کرد.

ایـن مطالعـه هماننـد مطالعـهٔ قبلـی مـا نشـان داد کـه سلولـهای اپی‌تلیال لولـه رحم در هنگام کشـت بـر روی پلاســتیک، مورفولــوژی پــولاریزه خــود را از دســت می‌دهنـد. مطالعـه قبلـی نشـان داده بـود کـه سلولـــهای اپـــی‌تلیـــال انـــدومتر در کشـــت منـــولایر، مورفولـــوژی پولاریزه خود را از دست می‌دهد(۲۷). با توجه به اینکـه علـت پـولاریزه شـدن سلولـــهای اپـی‌تلیـالی اتصـال مولکلولـهای چسبنده سلولی (اینتگـرین)[1] بـه مـاتریکس خارج سلولی (ECM)[2] می‌باشد(۲۸) لـذا در ایـن مطالعـه به منظور تولید سلولـهای پولاریزه اپی‌تلیال لولـه رحـم مشابه با حالت in vivo، سلولـهای لولـه رحمـی پـس از پاســاژ ســلولی بــر روی ECM کشــت داده شــد تــا سلولـهای اپی‌تلیالی پولاریزه به دست آید. بـا توجـه بـه اینکه مورفولوژی سلول با عملکرد آن ارتبـاط دارد(۲۷)؛ احتمـالاً اسـتفاده از سلولـــهای اپـی‌تلیـال لولـــه رحـم پـولاریزه نسـبت بـه غیـر پـولاریزه در کشـت همزمـان ارجحیت خواهد داشت.

یکـی از مشـکلات مهـم در کشـت همزمـان عـدم وجـود محیطی مناسب بـرای کشـت همزمـان سلولـــهای لولـــه رحم و جنین می‌باشد. بـرای مثـال محیطـی کـه معمـولاً

1-Intergrine
2-Extra Cellular Matrix

www.SID.ir

Archive of SID

برای سلولهای لوله رحمی مناسب است برای جنین نامناسب بوده و عکس آن هم معمولاً دیده می‌شود(۲۹). بدین منظور در این مطالعه استفاده از محیط‌های متداول کشت برای سلولهای لوله رحمی و اثرات آنها را ابتدا بر روی سلولهای لوله رحمی در مرحله کشت اولیه و پاساژهای سلولی در حالت منولایر و پولاریزه بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بهترین محیط کشت برای مرحله اولیه کشت و پاساژ اولیه سلولها به ترتیب DMEM/ F12 (با قابلیت حیات تقریباً ۱۰۰٪)، RPMI-1640 (با قابلیت حیات ۹۵٪) و Ham`s F10 (با قابلیت حیات ۹۳٪) می‌باشد؛ ولی در طی پاساژهای دوم، سوم و چهارم سلولها در محیط کشت منولایر و پولاریزه تفاوت معنی‌داری بین محیط‌های کشت مختلف دیده نشد($P<0/05$). مطالعات مختلف نیز بر مناسب بودن محیط کشت DMEM/ F12 بر رشد و تکثیر سلولهای اپی‌تلیال لوله رحمی دلالت می‌کند(۲۹-۳۰). بررسی اثر همین محیط‌های کشت بر روی تکوین جنین‌های ٤-۸ سلولی نشان داد که Ham`s F10 به طور معنی‌داری بهتر از RPMI- 1640, DMEM/ F12 بود.

بطوریکه ۹۳٪ جنین‌ها پس از ۷۲ ساعت به مرحله مورولا رسیده بودند که این نتایج در مقایسه با نتایج Feng و همکاران (۳۱) بهتر می‌باشد. Feng و همکاران اثر Ham`s F10 بعلاوه سرم انسانی را بر روی اووسیت‌های بارورشده انسان مطالعه کرده و نشان داده‌اند که بعد از ۷۲ ساعت ٤٥٪ جنین‌ها به مرحله مورولا می‌رسند. علت این تفاوت شاید بدلیل تفاوت در نوع بیماران با کیفیت تخمک و اسپرم یا محیط آزمایشگاه باشد. لذا پیشنهاد می‌شود ابتدا از محیط کشت DMEM/ F12 برای تکثیر و پاساژ سلولها استفاده کرده و در هنگام قراردادن جنین، محیط کشت از DMEM/F12 به Ham`s F10 تغییر داده شود.

تشکر و قدردانی

مؤلفین مقاله از معاونت تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به دلیل تأمین اعتبار طرح و از مسئولین اطاق عمل بیمارستان میرزاکوچک‌خان به دلیل تهیه بافت لوله رحم تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

1-Erbach G.T., Lawitts J.A., Papaioannou V.E., Biaggers J.D. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. Biol Reprod. 1994;50(5):1027-33.
2-Harlow G.M., Quinn P. Development of preimplantation mouse embryos in vivo and in vitro. Aust J Biol Sci. 1982;35(2):187-93.
3-June T., Fischer B. Correlation between diameter and DNA or protein synthetic activity in rabbit blastocysts. Biol Reprod. 1988;39(5): 1111-6.
4-Carney E.W., Foote R.H., Effects of super ovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. J Reprod Fertil. 1990;89(2):543-51.
5-Telford N.A., Watson A.J., Schultz G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. Mol Reprod Dev. 1990; 26(1): 90-100. Review.
6-Braude P., Bolton V., Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. Nature. 1988;332(6163):459-61.
7-Quinn P., Kerin J.F., Warnes G.M. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril. 1985;44(4):493-8.

www.SID.ir

Archive of SID

8-FitzGerald L., DiMattina M. An improved medium for long-term culture of human embryos overcomes the in vitro developmental block and increases blastocyst formation. Fertil Steril. 1992; 57(3):641-7.
9-Thibodeaux J.K., Godke R.A. In vitro enhancement of early-stage embryos with co-culture. Arch Pathol Lab Med. 1992 ;116(4):364-72. Review.
10-Wiemer K.E., Hoffman D.I., Maxson W.S., Eager S., Muhlberger B., Fiore I., Cuervo M. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. Hum Reprod. 1993; 8 (1):97-101.
11-Menezo Y.J., Guerin J.F., Czyba J.C. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. Biol Reprod. 1990;42(2):301-6.
12-Quinn P., Margalit R. Beneficial effects of co culture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. J Assist Reprod Genet. 1996;13(1):9-14.
13-Vlad M., Walker D., Kennedy R.C. Nuclei number in human embryos co-cultured with human ampullary cells. Hum Reprod. 1996; 11 (8):1678-86.
14-Bongso A., Ng S.C., Fong C.Y., Ratnam S. Cocultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Fertil Steril. 1991;56(2):179-91. Review.
15-Biallie H.S., Pacey A.A., Warren M.A. Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. Hum Reprod. 1997;12:1985-1992.
16-Babich M., Borenfreund E. Application of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology. ATLA 1991;18:129-144.
17-Wagh P.V., Lippes J. Human oviductal fluid proteins. V. Identification of human oviductin-I as alpha-fetoprotein. Fertil Steril. 1993;59(1): 148-56.
18-Joo B.S., Kim M.K., Na Y.J., Moon H.S., Lee K.S., Kim H.D. The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. Fertil Steril. 2001;75(1):193-9.
19-Barmat L.I., Worrilow K.C., Paynton B.V. Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver coculture cells. Fertil Steril. 1997; 67(4):775-9.
20-Ghaffari M., et al. Leukaemia inhibitory factor in human postmenopausal endometrial and Fallopian tube cells in vivo and in vitro. 11th world congress on human reproduction, Montreal, Canada (2002)P-012.
21-Murray C.A., Clarke H.J., Tulandi T., Tan S.L. Inhibitory effect of human ydrosalpingeal fluid on mouse preimplantation embryonic development is significantly reduced by the addition of lactate. Hum Reprod. 1997;12(11):2504-7.
22-Yeung W.S.B., Ho P.C., Lau E.Y.L., Chan S.T.H. Improved development of human embryos in vitro by a human oviducal cell co-culture system. Human reproduction. 1992;7:1144-1149.
23-Bongso A, Ng SC, Sathananthan A.H., Ng PL, rauff M., Ratnam S.S. Establishment of human ampullary cell cultres. Hum Reprod. 1989;4:486-494.
24-Kazuhiro Takeuchi, Yukihiro Nagata, Bruce A., Sandow, Gary D, Hodgen. Primary culture of human fallopian tube epithelial cells and co-culture of early mouse per-embryos. Molecular reproduction & development. 1992;32:236-242.
25-Patek E. The epithelium of the human Fallopian tube. A surface ultrastructural and cytochemical study. Acta Obstet Gynecol Scand. 1974;31(Suppl):1-28.
26-Donnez J., Casanas-Roux F., Caprasse J., Ferin J., Thomas K. Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. Fertil Steril. 1985;43(4):554-9.
27-Ghaffari M. Effects of artificial extracellular matrix on function of human endometrial epithelial cells in vitro. Med J Reprod Infertility. 2000;2:40-49.
28-Sugrue S.P., Hay E.D. Response of basal epithelial cell surface and Cytoskeleton to solubilized extracellular matrix molecules. J Cell Biol. 1981;91(1):45-54.
29-Gardner D.K., Lane M. Embryo culture system: In "in vitro fertilization". In Trounson A, Gardner DK (Eds). 1993;PP:85-114.
30-Baillie H.S., Pacey A.A., Warren M.A., Scud more I.W., Barratt C.L. Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. Hum Reprod. 1997;12(9): 1985-92.

www.SID.ir

Archive of SID

31-Feng H.L., Wen X.H., Presser S.C. Effect of different co-culture system in early human embryo development. Hum Reprod. 1996;11(7): 1525-8.

www.SID.ir