Archive of SID

تاثیر سلولهای قطبی شده رحم بر تکوین جنینهای موش و میزان سلول بلاستوسیستهای حاصل از هم‌کشتی

محمدرضا باغبان‌اسلامی‌نژاد Ph.D.☆، مجتبی رضازاده Ph.D.☆★♦، سعید کاظمی‌آشتیانی Ph.D.☆
پوپک افتخاری‌یزدی Ph.D.☆

☆ پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنینی‌شناسی

پست الکترونیک: Email:info@royaninstitute.org

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۱۱/۱۸، پذیرش مقاله: ۸۴/۲/۱۰

* **هدف:** بررسی رشد و تکوین جنینهای دوسلولی موش بر روی تک‌لایه‌های قطبی شده سلولهای پوششی رحم انسان

* **مواد و روشها:** برای این تحقیق بافت اندومتریوم انسانی از بیماران هیسترکتومی شده تهیه گردید و سلولهای پوششی آن با استفاده از کلاژناز ۰/۲۵ درصد (نوع I) جدا و بر روی ژل (ECM: Extracellular Matrix) به حالت قطبی و سطح پلاستیک به حالت غیرقطبی کشت شد. پس از تایید ماهیت پوششی سلولهای کشت شده روی پلاستیک با استفاده از ایمونوهیستوشیمی و قطبی بودن سلولهای کشت شده روی ژل ECM با روش میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission) جنینهای دوسلولی موش بر روی تک‌لایه‌های قطبی و غیرقطبی کشت گردید و میزان تکوین به طور روزانه ثبت و باروشهای آماری تجزیه و تحلیل شد. در پایان کشت، تعدادی بلاستوسیست به صورت کاملا اتفاقی انتخاب و با روش افتراقی رنگ‌آمیزی و میانگینهای سلولی با روشهای آماری مقایسه گردید.

* **یافته‌ها:** مشاهده مقاطع میکروسکوپ الکترونی نشان داد که سلولهای کشت شده روی ژل ECM استوانه‌ای شکل و کاملا قطبی هستند، در حالی که سلولهای کشت شده روی پلاستیک، پهن و دوکی شکل می‌باشند. نتایج هم‌کشتی حاکی از آن بودکه جنینهای دوسلولی کشت شده روی تک‌لایه‌های قطبی در مقایسه با غیرقطبی در تمام مدت ۹۶ ساعت کشت، تکوین‌بیشتری دارند به طوری‌که در پایان روز چهارم در گروه قطبی تشکیل بلاستوسیست ۸/۵درصد بیش از گروه غیرقطبی بود با این وجود تفاوتها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. نکته حائز اهمیت تعداد سلول بلاستوسیستهای حاصل از تکوین جنینهای دو سلولی بر روی تک‌لایه‌های قطبی بود. این جنینها به‌طور معنی‌داری تعداد بلاستومر بیشتری در مقایسه با جنینهای کشت شده بر روی تک‌لایه‌های غیرقطبی داشتند.

* **نتیجه گیری:** روی هم رفته به‌نظر می‌رسد که سلولهای قطبی از لحاظ افزایش تعداد سلول و احتمالا بهبود کیفیت بلاستوسیست به رشد و تکوین جنین کمک می‌نمایند.

گل واژگان: سلولهای قطبی شده، اپی‌تلیوم آندومتریوم، تکوین جنین موش

نشریه پزشکی یاخته، سال هفتم، بهار ۸۴، شماره ۲۵، صفحات ۱۸-۱۱

مقدمه

جنین در بدن مادر توسط سلولها و مایع لوله رحمی و رحم تغذیه می‌شود (۱، ۲). کشت آن در محیط آزمایشگاهی، در واقع به مفهوم محرومیت از محیط مادری و مایعات مغذی آن است (۳، ۴). با وجود این، کشت جنین پستانداران در محیط آزمایشگاهی امکان‌پذیر بوده ولی تکوین آن در چنین شرایطی از لحاظ میزان تکوین (۵، ۶، ۷)، تعداد سلول (۶) پارامترهای بیوشیمیایی گوناگون (۸) و میزان توان‌زیستی پس از انتقال از سطح پایین‌تری نسبت به محیط بدن برخوردار است. تلاشهای زیادی در جهت بهبود شرایط انجام گرفته است که از جمله می‌توان به دست‌کاری محیطهای کشت از لحاظ الکترولیتی و منابع انرژی اشاره کرد ولی این تلاشها موفقیت کمتری در پی‌داشته است (۹، ۱۰). راه دیگر برای بهبود شرایط، هم‌کشتی است که دراصل نوعی شبیه‌سازی محیط امبریوتروفیک دستگاه تناسلی مادر در محیط آزمایشگاهی محسوب می‌شوند در چنین‌سیستمهایی جنین به خوبی رشد کرده و به مرحله بلاستوسیست و بلاستوسیست در حال خروج از زونا می‌رسد (۱۱). با وجود اثبات تاثیرات مثبت سیستمهای هم‌کشتی، هنوز هم مکانیسم عملکرد آنها تا حدود زیادی ناشناخته باقی‌مانده است. در این ارتباط برخی از محققین معتقدند که سلولهای هم‌کشتی با ترشح مواد امبریوتروفیک (۱۲) و برداشت مواد امبریوتوکسیک (۱۳) به تکوین جنین کمک می‌کنند. Bongso و همکاران معتقدند که تماس بین سلول هم‌کشتی و جنین برای برقراری ارتباط سلولی به منظور انتقال فاکتورهای امبریوتروفیک نیز ضرورت دارد (۱۴).

به طور معمول، محققین برای ایجاد هم‌کشتی، ابتدا سلول پوششی را بر سطح پلاستیکی ظروف کشت داده، پس از تشکیل تک لایه، جنین مورد مطالعه را روی آن قرار می‌دهند. مطالعات متعدد نشان داده است که جنین روشی (استفاده از ظروف‌پلاستیکی برای کشت سلول)، سبب

www.SID.ir

Archive of SID

از دست رفتن قطبیت ساختاری و عملکرد متمایز سلول می‌گردد (۱۸،۱۷،۱۶،۱۵). درچنین شرایطی سلول کشت یافته، شکل مکعبی خود را از دست داده و پهن می‌شود و اتصالات محکم از دست می‌رود. از سوی دیگر، محققین نشان داده‌اند که چنانچه شرایط کشت بر اساس دو ویژگی محیط in vivo سلولهای پوششی طراحی‌شود، سلول پوششی قطبیت و عملکرد خود را حفظ می‌نماید. این دو ویژگی عبارتند از: تغذیه از راه سطح قاعده‌ای – جانبی و تماس با ماده خارج سلولی (۲۲،۲۱،۲۰،۱۹). با به‌کارگیری این شرایط، Classen-Linke و همکاران در سال ۱۹۹۷، سلولهای پوششی رحم انسان را به حالت قطبی کشت دادند. مطالعه این محققین نشان داد که تحت چنین شرایطی فیزیولوژی سلولهای کشت یافته مشابه با حالت in vivo حفظ می‌گردد (۲۳).

تا به حال چندین گزارش نشان داده است که حفظ قطبیت سلولهای پوششی در طی هم‌کشتی با اسپرم سبب بهبود حرکت و ظرفیت لقاحی اسپرم می‌گردد (۲۴، ۲۵، ۲۶). ولی اطلاعات در ارتباط با تاثیر هم‌کشتی این سلولها بر جنین بسیار اندک است و به همین دلیل، ما تصمیم گرفتیم با قطبی کردن سلولهای پوششی رحم انسان بر روی ژل ECM، تاثیر این سلولها را درهم‌کشتی با جنین موش مورد ارزیابی قرار دهیم.

مواد و روشها

کشت سلول

بافت اندومتریوم انسان از بیماران هیسترکتومی بیمارستانهای آرش و امام‌خمینی تهران تهیه شد. استفاده از بافت اندومتریوم انسانی‌در تحقیق حاضر، توسط کمیته اخلاقی پژوهشکده رویان مورد تصویب قرار گرفت. در اتاق عمل بیمارستانهای مذکور، بافت اندومتریوم بلافاصله پس از عمل هیسترکتومی از رحم جدا شد و با محلول (HBSS: Hanks Balanced Salt Solution) شستشو شد. سپس به قطعات کوچک یک میلی‌متری بریده شده، بخش کوچکی از آن برای بررسی میکروسکوپ الکترونی با محلول کارنوفسکی فیکس گردید.

برای جداسازی سلولهای پوششی اندومتریوم، قطعات بافتی درون آنزیم کلاژناز نوع I (۰/۲۵درصد) قرار گرفت و در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه شد. در اثر عمل آنزیم، غدد اندومتریوم از بافتهای اطراف جدا گردیده، داخل محلول آنزیمی شناور شدند. برای جداسازی بخش اپی‌تلیال از بافت هضم نشده، تکنیک unit gravity sedimentation استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا محلول فوق به لوله‌های ۱۵ سی‌سی منتقل شد و سپس محتویات لوله هم زده شد و به‌صورت عمودی قرار گرفت. پس از ۴۰ ثانیه، $\frac{2}{3}$ بالایی محلول (حاوی بخش اپی‌تلیال) به لوله نو انتقال یافت و $\frac{1}{3}$ پایینی آن (حاوی بافت هضم نشده) دور ریخته شد. محلول حاوی بخش اپی‌تلیالی سانتریفوژ شد و رسوب سلولی حاصل در داخل محیط DMEM/HUMAN'S F12 محتوی ۱۰۰واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Sigma USA)، ۵درصد (FCS: Fetal Calf Serum, Gibco)، ۱۰نانوگرم در هر میلی‌لیتر (EGF: Epidermal Growth Factor; Sigma USA) ۱۰میکرولیتر بر میلی‌گرم رتینوییک اسید به حالت معلق درآورده شد و سپس داخل Millicell CM Insert (Sigma) پوشیده شده با ژل ECM کشت شد. به هر Insert، بخش اپی‌تلیال به اندازه‌ای اضافه شد که ۳۰درصد سطح آن را بپوشاند. همچنین سوسپانسیون محتوی غدد اندومتریومی در داخل دیشهای ۲۴ چاهکی از جنس پلاستیک polystyrene کشت گردید. محیط سلولها هر ۳ روز یک بارعوض شد.

آماده‌سازی برای مطالعه میکروسکوپ الکترونی گذاره

سلولهای غیرقطبی بر روی Coverslip(Sigma USA) کشت شده و پس از آماده‌سازی به روش معمول، با استفاده از روش Flat Embedding قالب‌گیری شد. سلولهای قطبی با استفاده از پنس نوک تیز از روی Insert جدا شده و به روش معمول مراحل آماده‌سازی بافت را پشت سر گذاشت و قالب‌گیری و در پایان برشهای ۵۰۰ و ۷۰ نانومتری تهیه گردید. برشهای ۵۰۰ نانومتری پس از رنگ‌آمیزی با تولوییدین‌بلو با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت و برشهای ۷۰ نانومتری با اورانیل استات و سیترات سرب رنگ‌آمیزی شد و با میکروسکوپ الکترونی ۱۰۰ کیلو ولت (Ziess,Germany) بررسی گردید.

ایمونوهیستوشیمی

برای تعیین نوع سلول در کشت اولیه از آنتی‌سایتوکراتین ۷ استفاده شد برای این منظور از کیت Dako Envision System (Holland) استفاده گردید.

به منظور رنگ‌آمیزی ابتدا پراکسید داخلی سلولها با استفاده از peroxidase block به مدت ۵ دقیقه مهار گردید. سپس سلولها با آنتی‌بادی اولیه (سایتوکراتین ۷)، رقیق شده به نسبت یک به پانزده با بافر ۰/۰۵مولار Tris-Hcl به مدت ۳۰ دقیقه رنگ شدند. آن گاه پلی‌مر نشان‌دار شده با پراکسیداز حاوی آنتی‌بادی ثانویه اثر داده شد (۳۰دقیقه) و در پایان DAB substrate chromogen به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه استفاده شد که در اثر آن رسوب قهوه‌ای رنگ در سیتوپلاسم ظاهر گردید. هسته سلولها با هماتوکسیلین به مدت ۲ دقیقه رنگ شد (شکل ۱a).

جنین و هم‌کشتی

ابتدا موشهای ماده از نژاد NMRI به سن تقریبی ۶ تا ۸ هفته با استفاده از تزریق ۱۰ واحد PMSG و ۱۰ واحد HCG (۴۸ ساعت پس از تزریق اول) تحریک شدند و داخل قفسهای محتوی موش نر از همان نژاد قرار گرفتند و ۱۵ ساعت بعد، از لحاظ داشتن پلاک واژنی به عنوان شاخص حاملگی مورد معاینه قرارگرفتند. این موشها ۴۴ تا ۴۸ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

پس از تزریق HCG به روش نخاعی کردن قربانی شدند و لوله رحم آنها جدا گردیده، در داخل قطره‌ای از محیط کشت DMEM/Ham's F12 قرار گرفت. سپس جنینهای دوسلولی داخل آن با روش flushing خارج گردید.

به موازات تحریک تخمک‌گذاری و تهیه جنین از موش، تک‌لایه‌های قطبی (تک‌لایه‌های روی ژل ECM) و غیرقطبی (تک‌لایه‌های سطح پلاستیک) به روشی که در بخش قبلی توضیح داده شد، آماده گردید. ۷ روز پس از آغاز کشت، تک‌لایه‌ها به مرحله confluency رسیدند. در این روز محیط سلولها با DMEM/Ham's F12 محتوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA: Bovine Serum) Albumin) جایگزین شد و پس از ۲۴ ساعت جنینهای دو سلولی روی آنها کشت گردید. در مطالعه حاضر، گروههای قطبی و غیرقطبی به ترتیب تحت عناوین گروه آزمون I و آزمون II خوانده می‌شوند و گروه محیط DMEM/Ham's F12، گروه کنترل در نظر گرفته می‌شود.

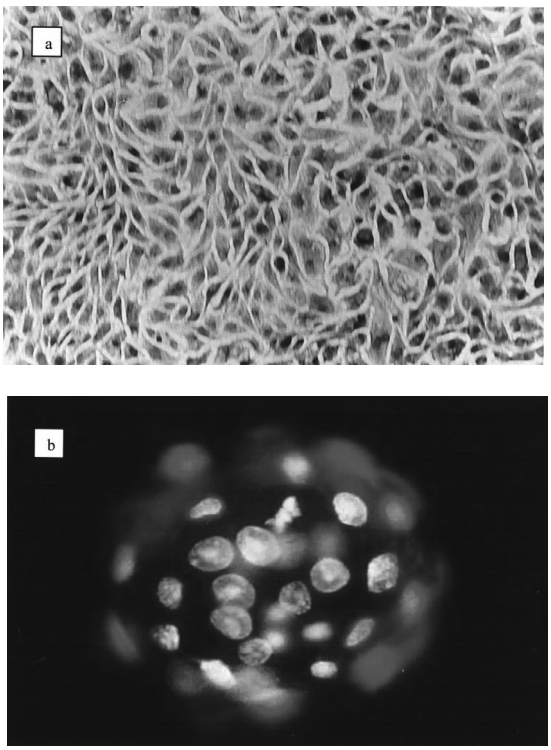
در تحقیق حاضر، هر آزمایش هم‌کشتی ۵ بار تکرار شد. در طی هم‌کشتی، میزان تکوین تا مراحل بالاتر، هر ۲۴ ساعت به مدت ۹۶ ساعت مورد مشاهده قرار گرفته و در فرمهای ویژه‌ای ثبت شد.

جنینهایی که بیش از ۲۵درصد قطعه‌قطعه شده بودند (۲۷) یا بلاستومر ظاهری تیره و دانه‌دانه داشت، به عنوان جنین دژنره ثبت شد و در مورد مورولا یا بلاستوسیست، آنهایی که کلاپس بودند، به عنوان دژنره درنظر گرفته شدند. در انتهای هم‌کشتی نتایج حاصل با روش آماری χ^2 موردتجزیه و تحلیل قرار گرفت.

رنگ‌آمیزی افتراقی بلاستوسیستها

در پایان دوره کشت تعدادی بلاستوسیست به طور اتفاقی انتخاب شدند و با روش Thouas و همکاران به صورت افتراقی رنگ‌آمیزی گردیدند (۲۸). بدین‌ترتیب که ابتدا بلاستوسیست در داخل ۵۰۰ میکرولیتر محلول شماره یک «محیط MTF: Murine Tubal) Fluid) حاوی ۱درصد triton x-100 و۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر پروپیدیوم یدید» به مدت ۱۰ ثانیه قرار گرفت و سپس به‌داخل ۵۰۰ میکرولیتر محلول شماره دو (محلول فیکساتیو اتانول خالص محتوی ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیس بنزآمید یا هوخست ۳۳۲۵۸) منتقل شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت باقی ماند و آنگاه داخل یک قطره گلیسرول قرار گرفته و بر روی یک لام چسبانده شد و توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به لامپ ماوراءبنفش و فیلترهای excitation (۴۶۰نانومتر برای آبی و قرمز و۵۰۰نانومتر برای قرمز) مشاهده شد و سلولهای آن شمارش گردید. با این روش توده سلولی داخلی آبی رنگ و تروفواکتودرم قرمز رنگ شد (شکل ۱b).

در پایان نتایج شمارش سلولی با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه موردتجزیه و تحلیل قرار گرفت.



شکل ۱: a) فتومیکروگراف سلولهای کشت یافته روی پلاستیک، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، b) بلاستوسیست‌های حاصل از تکوین جنین‌های دو سلولی بر روی تک لایه قطبی، رنگ‌آمیزی افتراقی **(مشاهده تصویر رنگی در انتهای مقالات)**

یافته‌ها

کشت سلول

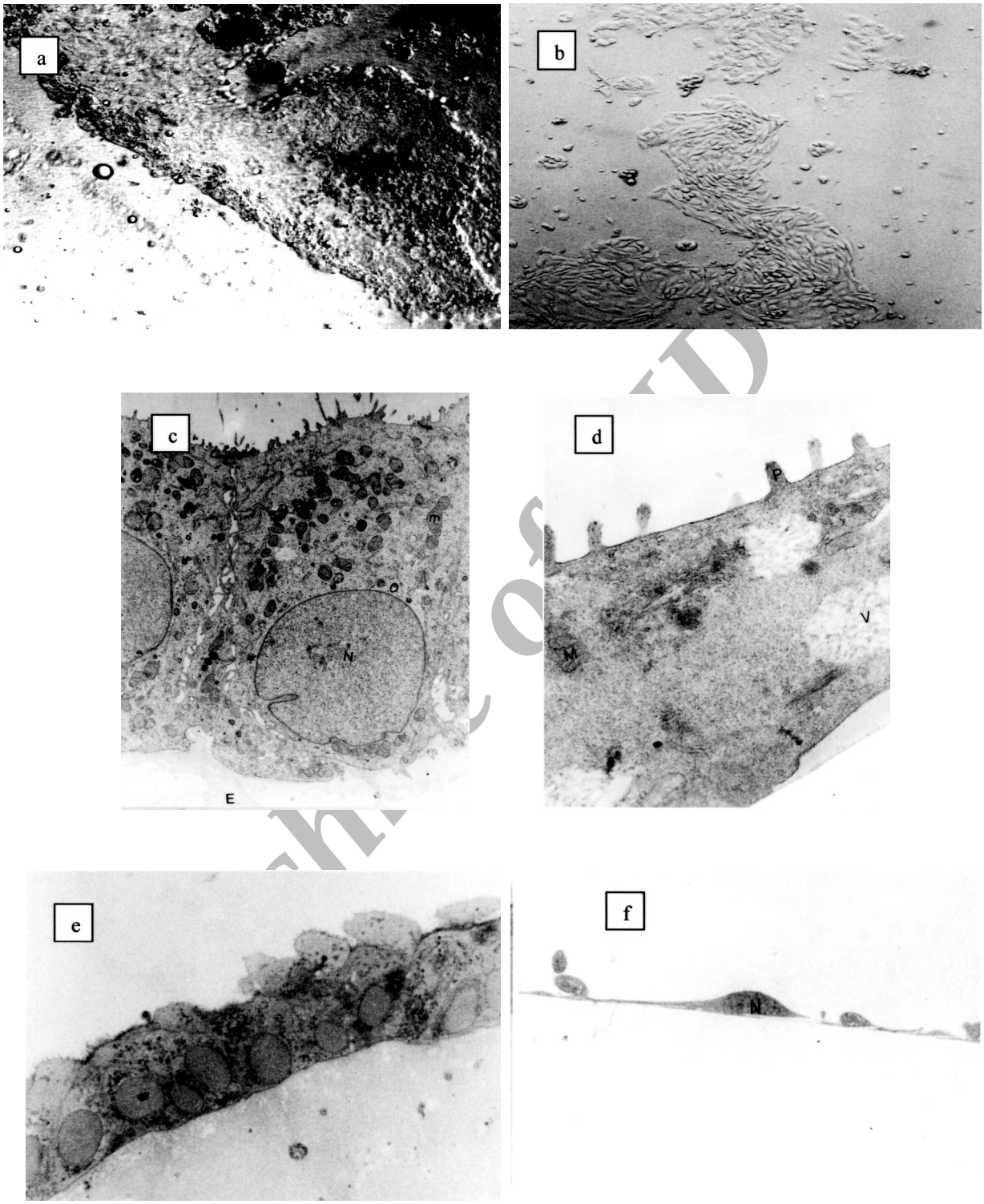
یک روز پس از آغاز کشت بر روی ژل ECM، سلولهای اپی‌تلیال تکثیر شده و در طی ۷ روز به مرحله Confluency رسیدند. در روزهای اول کشت در سطح ژل ECM چندین جزیره سلولی قابل مشاهده بود که رفته‌رفته این جزایر به هم‌پیوسته و یکپارچه شدند. سلولهای کشت شده بر روی ژل ECM کاملا متراکم بوده، و سطح مقطع گردی داشتند (شکل ۲a) در حالی که آنهایی که بر روی سطح پلاستیک قرار داشتند، کشیده به نظر رسیدند و فواصلی بین آنها وجود داشت (شکل ۲b). این سلولها در طی ۷ روز به مرحله Confluency رسیدند.

فراساختار

سلولهای کشت یافته بر روی ژل ECM، مشابه با اپی‌تلیوم قطعات بافتی، ظاهری کاملا استوانه‌ای و قطبی داشتند (شکل ۲e) و هسته در این سلولها در بخش قاعده‌ای واقع بوده و در سطح آنها میکروویلی فراوانی مشاهده شد (شکل ۲c). بین دوسلول مجاور اتصال محکم و دسموزوم برقرار و در زیر سلولها غشا پایه وجود داشت. هسته سلولهای قطبی یوکروماتین و فرو رفتگی‌هایی در پوشش آن به چشم می‌خورد.

www.SID.ir

Archive of SID



شـکل ۲: a) فـتومیکروگراف سـلولهای کـشت یـافته بـر روی ژل ECM و b) پـلاستیک پـلی‌اسـتیرن. مـیکروسکوپ فازکنتراست،بزرگنمایی ۱۰۰ c) الکترون میکروگراف سلولهای کشت یافته بر روی ژل ECM بزرگنمایی×۳۰۰۰ و d) پلاستیک پـلی اسـتیرن، بـزرگنمایی ×۲۰۰۰۰و e) فـتومیکروگراف سـلولهای کـشت یـافته بـر روی ژل ECM و f) پـلاستیک پـلی اسـتیرن، رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، بزرگنمایی×۱۰۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: تکوین و دژنراسیون جنینهای دو سلولی موش در هم‌کشتی‌های سلولهای پوششی رحم با گروه کنترل

صفر		۲۴ ساعت			۴۸ ساعت			۷۲ ساعت			۹۶ ساعت		
گروه	دو سلولی	۴-۸ سلولی	مورولا	دژنره	مورولا	بلاستوسیست	دژنره	بلاستوسیست	بلاستوسیست در حال خروج از زونا	دژنره	بلاستوسیست	بلاستوسیست در حال خروج از زونا	دژنره
کنترل	۱۲۴	۷۲ (۵۸/۰۶)	۲۱ (۱۶/۹۳)	۰(۰)	۴۳ (۳۴/۶۷)	۱۸ (۱۴/۵۱)	۲۷ (۲۱/۷۷)	۳۳ (۲۶/۶)	۸ (۶/۴۵)	۵۶ (۴۵/۱۶)	۲۰ (۱۶/۱۲)	۱۵ (۱۲/۰۹)	۸۹ (۷۱/۷۷)
آزمون I	۱۰۶	۷۱ (۶۶/۹۸)	۳۵ [a] (۳۳/۰۱)	۰(۰)	۵۵ [a] (۵۱/۸۸)	۲۳ (۲۱/۶۹)	۱۳ (۱۲/۲۶)	۵۶ [b] (۵۲/۸۳)	۱۹ [a] (۱۷/۹۲)	۲۳ [b] (۲۲/۶۴)	۴۴ [b] (۴۱/۵۰)	۳۲ [b] (۳۰/۱۸)	۳۰ [b] (۲۸/۳۰)
آزمون II	۱۰۹	۶۸ (۶۲/۳۸)	۳۲ [c] (۲۹/۳۵)	۰(۰)	۵۴ [c] (۴۹/۵۴)	۲۲ (۲۰/۱۸)	۱۶ (۱۴/۶۷)	۵۲ [d] (۴۷/۷۰)	۱۷ [c] (۱۵/۵۹)	۳۱ [c] (۲۸/۴۴)	۳۹ [d] (۳۵/۷۷)	۳۰ [c] (۲۷/۵۲)	۴۰ [d] (۳۶/۶۹)

ارقام داخل پرانتز به درصد بیان شده است.
آزمون I: قطبی رحم، آزمون II: غیرقطبی رحم، کنترل: DMEM/Hams F12
a: آزمون I و کنترل (P<۰/۰۵)، b: مقایسه آزمون I و کنترل (P<۰/۰۰۱)، c: مقایسه آزمون II و کنترل (P<۰/۰۵)، d: مقایسه آزمون II و کنترل (P<۰/۰۰۱)

جدول ۲: میانگین سلولی بلاستوسیستهای حاصل از تکوین جنینهای دو سلولی موش در گروههای رحم و کنترل

گروه	تعداد جنین	میانگین کل	میانگین درصد ICM	میانگین درصد TE
کنترل	۱۵	۷۰/۴۶±۱۹/۰۱	۷۹/۸۶±۳/۹۳	۲۰/۱۴±۳/۹۳
آزمون I	۱۴	۱۱۸/۲۵±۲۸/۳۹ [a, c]	۸۱/۳۶±۲/۱۸	۱۸/۶۴±۲/۱۸
آزمون II	۱۵	۹۵/۸۰±۲۴/۳۲ [b]	۸۰/۴۸±۳/۱۷	۱۹/۵۲±۳/۱۷

آزمون I: قطبی رحم، آزمون II: غیرقطبی رحم، کنترل: محیط DMEM/Ham's F12
a: مقایسه آزمون I و کنترل (P<۰/۰۰۱)، b: مقایسه آزمون II و کنترل (P<۰/۰۰۵)، c: مقایسه آزمون I و آزمون II (P<۰/۰۵)

سیتوپلاسم این سلولها حاوی میزان زیادی میتوکندری کروی دراز و همچنین مقادیر زیادی مخازن rER بود. به طور کلی سلولهای کشت یافته بر روی ژل ECM تشابه زیادی به سلولهای پوششی قطعات بافتی داشتند.

سلولهای کشت یافته بر روی پلاستیک (سلولهای غیرقطبی) در مقاطع تهیه شده، دوکی شکل ظاهر شدند (شکل ۲f). این‌سلولها تنها چند زایده راسی کوتاه داشتند (شکل ۲d). امتداد دو سلول مجاور روی هم قرار گرفته و در بعضی موارد اتصالات شبیه دسموزوم برقرار بود.

اتصال محکم بین دو سلول مشاهده نشد. هسته سلولها نسبتا بزرگ بود و بخش عمده سلول را اشغال می‌کرد. سیتوپلاسم سلولهای غیرقطبی اندک بوده و ارگانل زیادی در آن مشاهده نشد و تنها چند میتوکندری و rER و واکوئلهای نسبتا درشت وجود داشت (شکل ۲d).

هم‌کشتی

در مجموع ۳۷۵ جنین دوسلولی در گروههای قطبی (آزمون I، n=۱۰۶) و غیرقطبی رحم (آزمون II، n=۱۰۹) و کنترل (n=۱۶۰ DMEM/Ham's F12) کشت شد. دو گروه هم‌کشتی در مقایسه با کنترل به طور معنی‌داری، تکوین را بهبود بخشیدند. در این گروه، میزان دژنراسیون جنین به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل‌بود. درصد بلاستوسیست و بلاستوسیست در حال خروج از زونای گروه قطبی بیش از گروه غیرقطبی بود ولی تفاوت معنی‌دار نبود (جدول ۱).

نتایج شمارش سلولی نشان داد که بلاستوسیست تکوین یافته در گروه قطبی و غیرقطبی بیش از گروه کنترل سلول دارد این‌تفاوت معنی‌دار بود (به ترتیب P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۰۵) همچنین از این لحاظ، گروه قطبی در مقایسه با گروه غیرقطبی بهتر عمل کرد و تعداد سلول بلاستوسیستهای حاصل از گروه قطبی به طور معنی‌داری بیش از غیرقطبی بود (P<۰/۰۵). میانگین درصد تروفواکتودرم در گروه قطبی بیش از دو گروه دیگر بود ولی تفاوتها معنی‌دار نبود (جدول ۲).

بحث

تا به حال سلولهای پوششی اندومتریوم انسان با هدفهای مختلفی بر روی ژل ECM کشت شده است. برای مثال Bentin-lay و همکاران، از چنین کشتی برای مطالعه تغییرات سطوح سلولهای اپی‌تلیالی در زمان لانه‌گزینی بلاستوسیست (۲۹، ۳۰) استفاده کرده‌اند. در حالی که Arnold و همکاران با کشت سلولهای پوششی اندومتریوم بر روی ژلECM سعی‌کردند تا نقش تنظیمی سلولهای داربستی را در ارتباط با عملکرد و مورفوژنزیس سلولهای پوششی روشن سازند. این محققین سلولهای داربستی را در زیر سلولهای پوششی و داخل ژل ECM کشت دادند (۳۱). Park و همکاران در سال ۲۰۰۳یک سیستم کشت سه‌بعدی از اندومتریوم ایجاد کردند که در آن سلولهای داربستی اندومتریوم انسان داخل مخلوطی از کلاژن I و ژل ECM و سلولهای

www.SID.ir

Archive of SID

پوششی بر سطح آن کشت شد. این محققین در مرحله بعد، به جای سلولهای پوششی اندومتریوم نوعی سلول موسوم به KLE (سلول سرطانی اندومتریوم با منشا اپی‌تلیال) را بر سطح مخلوط کلاژن I و ژل ECM کشت دادند و تهاجم سلولهای KLE به داخل بخش داربستی را مورد مطالعه قرار دادند (۳۲). از دیگر مطالعات مربوط به کشت سلولهای پوششی رحم بر روی ژل ECM می‌توان به تحقیق Classen-Linke و همکاران اشاره کرد. این‌محققین با کشت سلولهای پوششی رحم بر روی ژل ECM به بررسی رسپتورهای استروژن و پروژسترون در سلولهای کشت یافته پرداخته، با تکنیک ایمونوهیستوشیمی و RT-PCR نشان دادند که این رسپتورها در غشا سلولهای کشت شده وجود دارند. محققین مذکور، با اضافه کردن آنالوگ پروژسترون (MPA) به محیط کشت، تجمع گلیکوژن را در سیتوپلاسم سلولهای کشت یافته القا کردند. Classen و همکاران پیشنهاد کردند که کشت سلولهای پوششی رحم روی ژل ECM، وسیله‌ای ارزشمند برای مطالعه فرآیند تمایز و عملکردهای تولیدمثلی است (۲۳). یکی دیگر از اهداف کشت سلول بر روی ژلECM، استفاده آنها در سیستمهای هم‌کشتی به عنوان لایه feeder است. Pollardدر سال ۱۹۸۹ اظهار کرده است که حفظ قطبیت سلول پوششی، در سیستم هم‌کشتی، برای افزایش تاثیرات مثبت آن ضروری است (۳۳). یک سال بعد Ouhibi و همکاران سلولهای پوششی لوله رحم گاو و موش را قطبی کردند و پتانسیل امبریوتروفیک آنها را با انجام هم‌کشتی موردارزیابی قرار دادند. نتایج آنها حاکی از این بود که حفظ قطبیت لایه feeder، تکوین جنین را بهبود نمی‌بخشد (۳۴). نکته‌ای که باید به آن اشاره کرد این است که محققین فوق برای کشت قطبی از ژل ECM، به عنوان القاکننده مهم قطبیت، استفاده نکردند و همچنین قطبی بودن سلولها را ارزیابی ننمودند. این درحالی است که تعدادی از محققین، سلولهای پوششی لوله رحم را بر روی ژل ECM کشت داده‌اند و با کشت اسپرم بر روی آن، بهبود حرکت و ظرفیت لقاحی آن را گزارش‌نموده‌اند (۲۳، ۲۴، ۲۵). در مطالعه حاضر، سلولهای پوششی رحم انسان بر روی ژل ECM کشت شد و پس از ارزیابی و تایید قطبیت آن، توان آنها در بهبود تکوین موش مورد آزمایش قرار گرفت.

ارزیابی قطبیت سلول با استفاده از میکروسکوپ الکترونی Transmission توسط سایر محققین نیز انجام گرفته است (۱۷، ۳۵). یکی از نشانه‌های قطبیت در سطح فراساختاری، وجود اتصال محکم در مرز میان غشا راسی و جانبی سلول است. Vega Salas و همکاران اعتقاد دارند که تعامل میان ماده خارج سلولی و سلول پوششی سبب توزیع متفاوت پروتیینها در سطوح تماسی (contacting) و غیرتماسی Non contacting سلول می‌شوند (۳۶). همچنین این تعاملها محور قطبیت قاعده‌ای راسی (apical-basal axis of polarity) را تعریف می‌کند که از نشانه‌های آن محل قرارگیری اتصال محکم در مرز میان غشاهای جانبی و راسی است. اعتقاد بر این است که این اتصال از اختلاط پروتیینهای ویژه domainهای مختلف غشایی ممانعت به عمل می‌آورد. از دیگر نشانه‌های قطبیت سلول در سطح فراساختاری، کاهش فاصله دو سلول مجاور، استقرار قاعده‌ای هسته و تشکیل میکروویلی در سطح راسی سلولهاست. با درنظر گرفتن این معیارها، تصاویر مقاطع ظریف ما نشانگر قطبی بودن سلولهای کشت شده بر روی ژل ECM بود.

مشکل اصلی در این تحقیق انتخاب نوع محیط کشت بود. این محیط می‌بایست جنین و سلولهای feeder را به خوبی حمایت می‌کرد. Frasor و همکاران در سال ۱۹۹۶ این نکته را مورد بررسی قرار داده‌اند. این محققین جنینهای دوسلولی موش را با سلولهای پوششی لوله رحم در دو محیط HTF (محیط مناسب برای تکوین جنین) و MEM-α (محیط مناسب برای رشد سلولهای سوماتیک) هم‌کشتی دادند. نتایج نشان داد که رشد جنینها در گروه هم‌کشتی با محیط MEM-α بیش از گروه هم‌کشتی با محیط HTF است. در گروه MEM-α، ۷۷درصد جنینها به مرحله خروج از زونا رسیدند در حالی‌که تنها ۵۱درصد آنها در گروه HTF به این مرحله تکاملی دست یافتند. این محققین نتیجه گرفتند که در سیستمهای هم‌کشتی، تامین نیازهای سلولهای سوماتیک خودبه‌خود، سبب بهبود رشد جنین خواهد شد. در مطالعه حاضر نیز با در نظر گرفتن این نکته و آزمودن چندین محیط کشت، DMEM/Ham's F12 به عنوان محیط هم‌کشتی انتخاب گردید. در واقع این محیط تنها محیطی بودکه توانست کشت سلولهای پوششی بر روی ژل ECM را حمایت کند (۳۷). Freeman و همکاران نیز از محیط DMEM/Ham's F12 در سیستمهای هم‌کشتی استفاده نموده‌اند (۲۷). براساس نتایج حاصل میزان تشکیل بلاستوسیست اندکی بیش از نتایج تحقیق حاضر است که این مسئله را می‌توان به تفاوتهای ژنتیکی مابین موشهای مورد استفاده در دو تحقیق (B6C35 در مقابل NMRI) نسبت داد.

بر اساس نتایج حاصل، تقریبا ۷۱/۵درصد جنینهای دوسلولی در گروه هم‌کشتی قطبی پس از گذشت ۹۶ ساعت کشت، به‌مرحله تکاملی بلاستوسیست و بلاستوسیست در حال خروج از زونا رسیدند در حالی که این میزان در گروه غیرقطبی ۶۳درصد بود با وجود اختلاف ۸/۵درصد این تفاوتها معنی‌دار نبود. آنچه را که می‌توان مزیت گروه قطبی بر غیرقطبی در نظر گرفت، پرسلول بودن بلاستوسیستهای گروه قطبی در مقایسه با غیرقطبی است. به نظر می‌رسد که تاثیرات مثبت سلولهای قطبی به صورت افزایش تعداد سلول بلاستوسیست تجلی پیدا می‌کند. نتایج شمارش سلولی و مقایسه آماری آنها به خوبی موید این نکته است. محققین معتقدند که بالا بودن میانگین سلولی در بلاستوسیست نشانگر بالا بودن میزان تسهیمات اولیه در جنین است. این جنینها در مقایسه با جنینهای کم سلول، از توان زیستی بیشتری برخوردارند و به دلیل توانایی در تولید مایع بیشتر و در نتیجه کسب قطر مناسب و تولید بیشتر Zona lysin، لانه‌گزینی بهتری دارند (۳۸، ۳۹).

مطالعات نشان می‌دهد که در بلاستوسیست اولیه موش، ۶۰درصد سلولها از نوع تروفواکتودرم و ۴۰درصد از نوع ICM است. باپیشرفت تکامل این درصدها تغییر می‌کند به طوری که در بلاستوسیست پیش از لانه‌گزینی، تروفواکتودرم حدود ۸۳درصد و ICM ۱۷درصد سلولهای

www.SID.ir

Archive of SID

یک بلاستوسیست را تشکیل می‌دهند (۴۰). در توضیح این موضوع، Hardy و همکاران در سال ۱۹۸۹ نشان داده‌اند که در طی ۳۶ ساعت اول پس از تشکیل بلاستوسیست، تروفواکتودرم به صورت لگاریتمی افزایش یافته و همزمان با آن، افزایش تعداد سلولهای بخش ICM به دلیل رخ دادن آپوپتوز به آهستگی صورت می‌گیرد و نتیجه کلی این است که درصد تروفواکتودرم در زمان بلاستوسیست expand افزایش می‌یابد (۴۱). نتایج شمارش سلولی Sherban و همکاران نیز موید این نکته است (۴۲) در کار حاضر نیز براساس نتایج به دست آمده، درصد تروفواکتودرم در گروههای قطبی بیش از غیرقطبی بود (بدون تفاوت آماری). لذا اگر بپذیریم که زیاد بودن درصد تروفواکتودرم نشانه مرحله تکاملی بالاست به نظر می‌رسد که جنینهای حاصل از گروه هم‌کشتی قطبی، در مرحله تکاملی بالاتری قرار داشتند.

به نظر می‌رسد که تاثیرات مثبت سلولهای قطبی بر تکوین جنین موش که به شکل افزایش میانگین سلولی بروز پیدا می‌کند، با مورفولوژی خاص این سلولها مرتبط است. با توجه به اینکه سلولهای feeder تاثیرات خود را با ترشحات امبریوتروفیک اعمال می‌کنند، شاید سلولهای قطبی شده ترشحات متفاوتی دارند. به هرحال این فرضیه، مطالعات بیشتری می‌طلبد. گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد پروتیینهای ترشحی سلولهای قطبی شده لوله رحم در مقایسه با غیرقطبی آن متفاوت است (۴۳). همچنین Woldesenbet و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داده‌اند که سلولهای قطبی شده لوله رحم بز، ترشحات مشابهی با قطعات بافتی کشت شده دارند (۴۴). نکته دیگر در ارتباط با مکانیسم تاثیر سلولهای قطبی شده، نقش تاثیرات مثبت تماس مستقیم سلولهای هم‌کشتی با جنین است. قطع این تماس تاثیرات مثبت هم‌کشتی را کاهش می‌دهد. درکشت قطبی به دلیل اینکه سلولها در مقایسه با غیرقطبی متراکم‌تر هستند، هر جنین با تعداد بیشتری از سلولها در تماس است و شاید تاثیرات بیشتری دریافت می‌کند. به هرحال تعیین دقیق‌نوع، میزان ترشحات سلولهای قطبی شده و نیز ارتباط بین میزان سطح تماس جنین و سلول قطبی با افزایش سلولاریتی بلاستوسیست به مطالعه بیشتری نیاز دارد.

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان بوده و نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدتهای صمیمانه مسئولین محترم پژوهشکده رویان ابراز می‌دارند.

References

1. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM: Improved pregnancy rate in human in vitro fertilizationwith the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril 1985;44: 493-498
2. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA: Successful culture in vitro of sheep and cattleova. J Reprod Fertil 1972; 30: 493-497
3. Neider GL, Macon GR: Uterine and oviductal protein secretion during earlypregnancy in the mouse. J Reprod Fertil 1987; 81: 287-29.
4. Leese, HJ: The formation and function of oviduct fluid. J Reprod Fertil 1988; 82: 283-856
5. Bowman P, McLaven A: Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. JEmbryol Exp Morphol 1970; 24: 203-207
6. Harlow GM, Qinn P: Development of preimplatation mouse embryo in vivo and invitro. Aust J Biol Sci 1982; 35: 187-193
7. Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD: Differential growth of themouse preimplantation embryo in chemically defined media. Biol Reprod 1994; 50:1027-1033
8. Jung T, Fisher B: Correlation between diameter and DNA or protein synthetic activityin rabbit blastocyst. Biol Reprod 1988; 39: 1111-1116
9. Carney EW, Foote RH: Effects of super ovulation, embryo recovery, culture systemand embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. J Reprod Fertil1990; 89: 543-551
10. Fitzgerald L, Di Mattina M: Improved medium for long-term culture of human embryosovercoms the in vitro developmental block and increase blastocyst formation. Fertil steril1992; 57: 641-647
11. Barmat LI, Worrilow KC, Payton BV: Growth factor experssion by human oviduct andbuffalo rat liver co-culture cells. Fertil steril 1997; 67: 775-779
12. Thibodeaux J, Godke R: In vitro enhancement of early stage embryos with co-culture.Arch Pathol Lab Med 1992; 116: 364-372
13. Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR: Factors affecting the in vitrodevelopment of blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod Fertil1991; 92: 125-131
14. Bongos A, Soon-Chye NG, Chui-Yee Fong, Shan Ratnam: Co-cultures: a new lead inembryo quality improvement for assisted reproduction. Fertil steril 1991; 56: 179-191
15. Glasser ER, Julian J, Decker GL, Tang JP, Carsen DD: Development of morphologicaland functional polarity in primary cultures of immature rat uterine epithelial cells. J Cell Biol1988; 107: 2409-2423
16. Jacobs AL, Decker GL, Glasser SR, Carsen DD: Vectorial secretion of prostaglandins bypolarized rodent uterine epithelial cells. Endocrinology 1990; 126: 2125-2136
17. Schatz F, Gordon RE, Lanfer N, Gurpide E: Culture of human endometiral cells underpolarizing conditions. Differentiation 1990; 42: 184-190
18. Mani SK, Decker GL, Glasser SR: Hormonal Responsiveness by immature rabbit uterineepithelial

www.SID.ir

Archive of SID

cells polarized in vitro. Endocrinology 1991; 128: 1563-1573
19. Ailenberg M, Fritz IB: Control at levels of plasminogen activator activity secreted bysertoli cells maintained in a two-chamber. Endocrinology 1988; 12: 2613-2618
20. Carsen DD, Tang J-P, Julian J, Glasser SR: Vectorial secretion of proteoglycans bypolarized rat uterine epithelial cells. J Cell Biol 1988; 197: 2425-2434.
21. Chembard M, Verrire B, Gabrion J, Mauchamp J: Polarization of thyroid cells in culture:evidence for basolateral localization of the iodide pump and at the thyroid stimulatinghormone receptor-adenly cyclase complex. J Cell Biol 1983; 96: 1172-1177
22. Hardley MA, Byers SW, Sn arez Quarez-Quian CA, Kleinman HA, Dym M: Extracellularmatrix regulates sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ celldevelopment in vitro, J Cell Biol 1985; 101: 1511-1522
23. Classen-Linke I, Kusche M, Knauthe R, Beier HM: Establishment of a humanendometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsiveepithelial cells. Cell Tissue Res 1997; 284: 171-185
24. Pollard JW, Plante C, King WT, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS: Fertilizing capacityof bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial calls. Biol Reprod 1991;44: 102-107
25. Sidhu KS, Mat KE, Rodger JC: Sperm-oviduct epithelial cell monolayer co-culture: an invitro model of sperm female tract interactions in a marsupial, the tamer wallaby (macropusengenii). J Reprod Fertil 1988; 114: 55-61
26. Ellington JE, Jones AE, Davitt CM, Schneider CS, Brishois RS, et al: Human spermfunction in co-culture with human, macaque or bovin oviduct epithelial cells monolayers.Hum Reprod 1998; 13: 2797-2804
27. Freeman MR, Bastias MC, Hill GA, Osteen KG: Co-culture of mouse embryos with cellsisolated from the human ovarian follicle, oviduct and uterine endometrium. Fertil Steril 1993;1: 138-142
28. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO: Simplified technique fordifferential staining of inner cell mass and trophoectoderm cells of mouse and bovineblastocysts. Reprod, Biol, Med, Online 2001/149 on web 17 june 2001
29. Bentin-Ley U, Horn T, Siogren A, Sorensen S, Falck Larsen J, et al: Ultra structure ofhuman blastocyst-endometrial interactions in vitro. J Reprod Fertil 2000; 120: 337-350
30. Bentin-Ley U, Siogren, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T: Presence of uterinepinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation. In vitro humReprod 1999; 14: 515-520
31. Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M and Lessey BA: Endometrial stromal cells regulateepithelial cell growth in vitro: a new co-culture modal. Hum Reprod 2001; 5: 836-845
32. Park DW, Choi DS, Ryn HS, Know HC, Joe H, Min CK: A well-defined in vitro threedimensional culture of human endometrium and its applicability to endometrial cancerinvasion. Lett 2003; 195: 185-192
33. Pollard JW, Xu KP, Porie R, King WA, Betteridge KJ: Influence of various oviductalepithelial cell culture systems on the development of early cleavage stage bovine embryos invitro. Theriogenology 1989; 31: 239
34. Ouhibi N, Hamidi J, Guillad J, Menezo Y: Co-culture of one cell mouse embryo ondifferent cell support. Hum Reprod 1990; 5: 737-743
35. Bentin-Ley U, Pederson B, Linderberg S, Larsen JB, Hamberger L, Horn T: Isolation andculture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. J Reprod Fertil1994; 161: 327-335
36. Vega Salas DE, salas PJ, Gunderson D, Rodriguez-Boulan E: Formation of theapical pole of epithelial (madin-Darby Canine Kidney) cells: Polarity of an apical protein isindependent of tight junctions while segregation of a basolateral marker requires cell-cellinteractions. I Cell Biol 1987; 104: 905-916
37. Frasor J, Sherbehn R, Soltes B, Molo MW, Binor Z, Radwanska E, Rawlins R: Animal experimentation: optimizing tubal epithelial cell growth promotes mouse embryohatching in co-culture. J Assit Reprod Gen 1996; 5: 423-430
38. Boatman DE: In vitro growth of non-human primate pre-and peri-implantationembryos. In Bavister B.d>(ed.). Mammalian preimplantation Embryo. Plenum Press, 1987: 273-308
39. Schiewe MC, Hazeleger NI, Sclimenti C, Balmaceda JP: Physiological characterizationof blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching modal. Fertil Steril 1995; 63: 288-294
40. Handyside AH, Hunter S: Cell division and death in the mouse blastocyst beforeimplantation. Roux,s Arech Dev Biol 1986; 195: 519-526
41. Hardy K, Handyside AH, Winston RM: The human blastocyst: cell number, deathand allocation during late preimplantation development in vitro. Development 1989; 107:597-604
42. Sherban R, Frasor J, Rad wanska, Binor Z molo MW, Hibner M, Mack S and Rawlines RG: Comparison of mouse embryo development in open and micro drop Co-culture systems.Hum Reprod 1996; 10: 2223-2229
43. Thomas PG, Ignotz GG, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP, Currie B: solation Culture and characterization of equine oviduct epithelial cells in vitro. Mol Reprod Dev 1995; 41: 468-478
44. Woldesenbet S, Newton GR: Comparison of proteins synthesized by polarized caprineoviductal epithelial cells and oviductal explants in vitro. Theriogenology 2003; 60: 533-543

www.SID.ir