دانشور
پزشکی

تأثیر فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی بر تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی بلاستوسیست‌های موش سفید آزمایشگاهی در محیط آزمایشگاه

نویسندگان: دکتر قاسم ساکی[1]، دکتر علیقلی سبحانی*[2] و دکتر محمد اکبری[3]

۱. استادیار گروه آناتومی و جنین‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز
۲. دانشیار گروه علوم تشریحی و مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. استاد گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی تهران
* نویسنده مسئول: Email: sobhania@sina.tums.ac.ir

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال سیزدهم - شماره ۶۲
اردیبهشت ۱۳۸۵

تاریخ وصول: ۸۳/۸/۱۳
تاریخ پذیرش: ۸۴/۹/۲۹

چکیده

مقدمه: این مطالعه برای بررسی میزان سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیست‌های حاصل از جنین ۲ سلولی موش سفید آزمایشگاهی در حضور و عدم حضور فاکتور مهارکننده لوسمی در محیط کشت طراحی شده است.

مواد و روش کار: به این منظور، ابتدا به موش‌های ماده نژاد ICR با سن ۱۰- ۸ هفته ۷/۵ واحد بین‌المللی PMSG و پس از ۴۸ ساعت ۷/۵ واحد بین‌المللی hCG به روش داخل صفاقی تزریق شد. بلافاصله پس از تزریق hCG موش‌های ماده به‌صورت دو تایی داخل قفس نر با سن ۱۲-۱۰ هفته از همان نژاد قرار گرفتند تا جفت‌گیری صورت گیرد. صبح روز بعد موش‌های ماده دارای پلاک واژن حامله تلقی شدند. ۵۰-۴۸ ساعت پس از تزریق hCG موش‌های ماده با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته و به روش عمل فلاشینگ، جنین‌های دو سلولی جمع‌آوری شدند. جنین‌های دو سلولی حاصل که از نظر ظاهری سالم به نظر می‌رسیدند پس از شستشوی پی در پی به‌طور کاملاً تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند و هر گروه در محیط‌های کشت KSOM+aa (گروه کنترل)، $KSOM + AA + 1500\,^{IU}/_{ml}\,LIF, KSOM + AA + 1000\,^{IU}/_{ml}\,LIF, KSOM + AA + 500\,^{IU}/_{ml}\,LIF$ تا ۱۲۰ ساعت در انکوباتور تحت شرایط ۳۷°C و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. بلاستوسیست‌های حاصل با رنگ‌آمیزی دوگانه یا افتراقی رنگ‌آمیزی شده، سپس با استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهز به لامپ اشعه ماورای بنفش، سلول‌های توده‌ای داخلی که به رنگ آبی بودند شمارش شدند.

نتایج: تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های دو سلولی در محیط کشت بدون فاکتور مهارکننده لوسمی برابر با $19 \pm 2/6$ بود و در محیط‌های کشت با غلظت‌های $1500\,^{IU}/_{ml}\,LIF, 1000\,^{IU}/_{ml}\,LIF, 500\,^{IU}/_{ml}\,LIF$ به ترتیب برابر بود با $26 \pm 2/2, 24 \pm 2/1, 28 \pm 2/4$. تست آماری انجام شده نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین دو نوع محیط کشت (با و بدون فاکتور مهارکننده لوسمی) بود. این نتایج بیانگر این واقعیت بود که فاکتور مهارکننده لوسمی بر میزان سلول‌های توده‌ای داخلی اثر مثبت داشته، باعث افزایش تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی شده است ($p=۰/۰۲$).

نتیجه‌گیری: در مجموع به نظر می‌رسد افزایش فاکتور مهارکننده لوسمی به محیط کشت مخصوص بلاستوسیست می‌تواند بلاتوسیست‌هایی با تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی بیش‌تر در اختیارمان قرار دهد، اگرچه اثبات این امر به مطالعات بیش‌تر و گسترده‌تر نیاز دارد.

واژه‌های کلیدی: فاکتور مهارکننده لوسمی، سلول‌های توده‌ای داخلی، بلاستوسیست

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

فاکتور مهارکننده‌لوسمی(leukemia inhibitory factor=LIF) یک گلیکوپروتئین ترشحی با وزن مولکولی ۶۷-۳۸ کیلودالتون بوده، برای اولین بار توسط متکالف (Metcalf) و همکارانش در سال ۱۹۸۶ در مرکز تحقیقات پزشکی ملبورن استرالیا کشف شد [۱]. این فاکتور از گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های با وزن مولکولی تقریباً ۲۰ کیلودالتون به‌دست می‌آید [۲] و از جنین [۳]، سلول‌های اپی‌تلیالی بخش آمپولاری لوله رحم [۴] و سلول‌های اندومتر رحم [۵] ترشح می‌شود. مطالعات نشان داده که فاکتور مهارکننده لوسمی در تکامل جنین‌ها نقش داشته، باعث افزایش تکوین و هچینگ موش [۵]، گوساله [۶]، گوسفند [۷] و افزایش میزان حاملگی در گاو به هنگام انتقال جنین‌های کشت داده شده در محیط کشت به رحم می‌شود [۷]. گیرنده فاکتور مهارکننده لوسمی بر سطح سلول‌های عصبی، مگاکاریوسیت‌ها، میوبلاست‌ها، استئوبلاست‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های توده‌ای داخلی و سلول‌های اندومتر رحم دیده شده [۸] و دارای اعمالی مانند جلوگیری‌از تمایز سلول‌های ریشه‌ای جنین (stem cells) [۹]، تحریک آزادسازی کلسیم از استخوان [۱۰] القای سنتز پروتئین‌ها [۱۱]، القای تکثیر و افزایش توان زیستی سلول‌های جنینی [۱] است. همچنین این فاکتور، نقش ویژه‌ای در عمل جایگزینی جنین در دیواره رحم دارد [۱۲] و در صورت فقدان این فاکتور دیده شده که جنین موش می‌تواند به‌طور نرمال تا مرحله بلاستوسیست تکوین یابد، اما جایگزین نمی‌شود [۱۳]. مشخص شده است که فاکتور مهارکننده لوسمیِ مشتق از اپی‌تلیوم‌آندومتر موش بر جنین‌ها به روش پاراکرین عمل می‌کند و بر اپی‌تلیوم رحم به‌صورت اتوکرین تأثیرکرده، اجازه عمل جایگزینی را می‌دهد که احتمالاً ممکن است سیگنال‌های پاراکرین هم به بافت جنینی و هم به اپی‌تلیوم رحم در طول جایگزینی بلاستوسیست بفرستد [۱۴]. همچنین در مورد تأثیر دوزهای متفاوت این ماده بر رشد سلول‌های توده‌ای داخلی و تکوین جنین گزارش‌های متفاوتی تا به حال ارائه شده است [۱۵و۱۶].

لذا با توجه به این‌که مایع رحم که مورولا و بلاستوسیت برای مدتی در آن شناور می‌مانند دارای فاکتور مهارکننده لوسمی است و این فاکتور در محیط کشت مورد استفاده جهت کشت بلاستوسیت‌ها وجود ندارد، تصمیم گرفته شد تا غلظت‌های متفاوت فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی را در شرایط آزمایشگاهی یکسان به محیط کشت اضافه کرده، تأثیر دوزهای متفاوت این فاکتور بر تعداد سلول‌های داخلی که سلول‌های حساس به شرایط کم مطلوب (suboptimal) محیط کشت است و شاخص نسبت توده سلول داخلی به کل سلول‌های جنین که یکی از شاخص‌های مهم Viability در نظر گرفته می‌شود بررسی شود.

مواد و روش‌ها

الف) القای تخمک‌گذاری و جفت‌گیری: به‌منظور تحریک تخمک‌گذاری مقدار ۷/۵ واحد بین‌المللی هورمون گنادوتروپین سرم خون مادیان PMSG و ۴۸ ساعت بعد ۷/۵ واحد بین‌المللی گنادوتروپین جفت انسانی hCG به روش داخل صفاتی به موش‌های سفید آزمایشگاهی نژاد ICR با سن ۱۰-۸ هفته تزریق شد. بلافاصله پس از تزریق hCG موش‌های ماده به‌صورت دوتایی داخل قفس نر با سن ۱۲-۱۰ هفته از همان نژاد قرار گرفتند تا جفت‌گیری صورت گیرد. برای اطمینان از وقوع حاملگی، موش‌های ماده‌ای که به مدت یک شب در قفس موش‌های نر قرار گرفته بودند، صبح زود بعد معاینه واژینال می‌شدند. موش‌های ماده‌ای که دارای پلاک واژن بودند، حامله تلقی شده، تا زمان مورد نظر در قفس دیگر نگهداری می‌شدند.

ب) به‌دست آوردن جنین: برای به‌دست آوردن جنین‌های دو سلولی ۵۰-۴۸ ساعت پس از تزریق hCG

Archive of SID

www.SID.ir

ابتدا موش‌های ماده با جابه‌جایی مهره‌های گردنی (cervical dislocation) کشته شدند و در شرایط استریل پوست، عضلات شکم و صفاق باز شده، با کنار زدن روده‌ها رحم درمعرض دید قرار گرفت. سپس لوله‌های فالوپ جدا و به یک قطره ۱۰۰-۵۰ میکرولیتری از محیط کشت HTF (human tubal fluid) حاوی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA (فراکسیون V فاقد اسید چرب) قرار داده شد جنین‌ها به سرعت از لوله رحم خارج شدند. جنین‌های دو سلولی حاصل که از نظر ظاهری سالم به نظر می‌رسیدند پس از شستشوی پی در پی به‌طور کاملاً تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند.

ج) کشت نمونه: برای کشت آزمایشگاهی جنین‌ها، محیط‌های کشت متفاوتی ساخته شده؛ ولی هنوز محیطی که موردپذیرش تمام مراکز و محققان باشد شناخته نشده است. بنابراین در هر مرکز و آزمایشگاه با توجه به شرایط از محیط خاص استفاده می‌شود. در این پروژه از محیط کشت KSOM که به آن اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری اضافه شده، استفاده گردید. برای آماده کردن محیط کشت حدود ۱۰- ۸ ساعت قبل از گرفتن جنین‌ها از لوله رحم موش، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت سرم دار شده، با عبور از فیلتر ۰/۲۲μm یک‌بار مصرف صاف شد. سپس محیط حاصل از عمل صاف کردن به ۴ بخش تقسیم شد (هر بخش تقریباً ۲ml). به یک بخش، فاکتور مهارکننده لوسمی اضافه نگردید (به‌عنوان محیط کشت کنترل) که تحت عنوان محیط کشت KSOM+AA نامگذاری شد و به سه بخش دیگر فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی با غلظت متفاوت (۵۰۰IU/ml، ۱۰۰۰IU/ml و ۱۵۰۰IU/ml) اضافه گردید. این محیط‌های کشت به‌ترتیب:

$KSOM+AA+1500\,IU/ml\,LIF, KSOM+AA+1000\,IU/ml\,LIF, KSOM+AA+500\,IU/ml\,LIF$

نامگذاری شدند.

بعد از آماده‌سازی چهار نوع محیط کشت، در هر دیش به ابعاد ۵۵ میلی‌لیتر در چهار ردیف و در هر ردیف چهار قطره (۳۰ میکرولیتری) گذاشته شد؛ به این صورت که در ردیف ۱ قطرات مربوط به محیط کشت بدون فاکتور مهارکننده لوسمی و در ردیف‌های ۲، ۳ و ۴ به ترتیب قطرات مربوط به محیط‌های کشت دارای غلظت‌های متفاوت ۵۰۰IU/ml، ۱۰۰۰IU/ml و ۱۵۰۰IU/ml قرار داده شدند. به‌منظور جلوگیری از تبخیر و تغییر اسیدیته (pH) و همچنین جلوگیری از نفوذ میکروارگانیسم‌ها به قطرات، قطرات توسط روغن معدنی «Mineral oil» پوشیده می‌شدند. پس از آماده کردن قطرات محیط، ظروف کشت به انکوباتور انتقال می‌یافتند تا قطرات محیط کشت قبل از استفاده کاملاً مطابق شرایط داخل انکوباتور ($5\%CO_2$، ۳۷°C) متعادل گردند. بعد از تعادل قطرات محیط کشت در هر قطره ۳-۲ جنین دو سلولی گذاشته شد. تعویض محیط کشت هر ۲۴ ساعت یک بار صورت گرفت و بعد از ۱۲۰ ساعت، کشت نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۱۰۰× یا ۲۰۰× صورت گرفت.

بلاستوسیست‌ها معمولاً دارای ۶ مرحله تکوینی هستند که عبارتند از:

۱) بلاستوسیست اولیه (early blastocyst). بلاستوسل کم‌تر از نیمی از حجم جنین را به خود اختصاص داده است.

۲) بلاستوسیست (Blastocyst): بلاستوسل بیش از نیمی از حجم جنین را اشغال کرده است.

۳) بلاستوسیست کامل (Full blastocyst): بلاستوسل به‌طور کامل جنین را اشغال کرده است.

۴) بلاستوسیست در حال اتساع (expanded blastocyst): در این حالت بلاستوسل بزرگ‌تر از حالت قبل متسع شده، پرده شفاف نیز نازک شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

۵) بلاستوسیست در حال خروج (Hatching blastocyst): سلول‌های تروفوبلاست شروع به پاره کردن پرده شفاف کرده و کمی بیرون می‌زنند.

۶) بلاستوسیست خارج شده (hatched blastocyst): در این مرحله بلاستوسیست به‌طور کامل از پرده شفاف خارج شده است.

در این پروژه به‌منظور یکسان‌سازی مطالعات، بلاستوسیست‌هایی که در مراحل ۱ تا ۴ بوده‌اند مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

د) رنگ‌آمیزی افتراقی بلاستوسیست‌ها: برای بررسی تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی روش رنگ‌آمیزی افتراقی یا دوگانه Thouas رنگ‌های فلوئورسنس Propidium Iodide و Hoechst 33258 مورد استفاده قرار گرفت [۱۷]. در این روش، ابتدا بلاستوسیست‌های حاصل از کشت نمونه (شکل ۱) به‌صورت جداگانه در ۵۰۰ میکرولیتر محلول S_1 (این محلول شامل محیط کشت HEPES HTF و Triton X-100 و Propidium است) به مدت ۱۰ ثانیه نگه داشته شدند. سپس بلافاصله بلاستوسیست‌ها به ۵۰۰ میکرولیتر محلول S_2 (این محلول شامل الکل اتانل ۱۰۰ درصد و Hoechst) منتقل شده، در دمای ۴°C به مدت یک شب (Overnight) باقی می‌ماندند. بعد از این مرحله، بلاستوسیست‌ها به داخل یک قطره گلیسرول به روی لام میکروسکپی انتقال یافته، توسط لامل پوشیده شدند. شمارش سلولی با استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهز به لامپ اشعه ماورای بنفش و فیلتر خروجی با طول موج ۴۶۰ نانومتر انجام گرفت. دراین نوع رنگ‌آمیزی، سلول‌های توده‌ای داخلی به رنگ آبی و سلول‌های تروفواکتودرم به رنگ قرمز دیده می‌شوند (شکل ۲). با توجه به تعداد معدود سلول‌ها، کلیه سلول‌ها با چشم شمرده و با استفاده از شمارش‌گر مخصوص شمارش سلولی تعداد آن‌ها ثبت می‌شد. با توجه به ساختمان بلاستوسیست‌ها شمارش سلولی با تنظیم میکروسکوپ در سه مقطع ازهربلاستوسیست به‌عمل آمد. جهت بالا بردن دقت در کار شمارش سلولی برای تمام جنین‌ها، این کار کلاً توسط یک نفر انجام شد و هر شمارش دوبار تکرار گردید.

ه) آنالیز آماری: با استفاده ازآزمون ANOVA اطلاعات به‌دست آمده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و اختلافات با $p<۰/۰۵$ معنادار محسوب شدند.

نتایج

تعداد بلاستوسیست‌های حاصل (شکل ۱) از کشت جنین‌های دو سلولی در چهار محیط کشت، تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی و همچنین نسبت تعداد سلول‌های توده‌ی داخلی به کل سول‌های جنین در هر گروه مورد مطالعه در جدول I آمده است. در این جدول میزان بلاستوسیست‌های به‌دست آمده از کشت جنین‌های دو سلولی در محیط کشت D,C,B,A به ترتیب برابر است با ۳۸/۸۲، ۵۷/۵۵، ۵۸/۵۳ و ۵۷/۰۵ درصد. تست آماری انجام شده نشان داده که فاکتور مهارکننده لوسمی باعث بهبود میزان بلاستوسیست می‌شود ($p=۰/۰۵$)، حال آن‌که بین سه گروه آزمایشی با غلظت‌های متفاوت فاکتور مهارکننده‌ی لوسمی اختلاف معناداری وجود ندارد ($p>۰/۰۵$).

تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی (شکل ۲) در بلاستوسیست‌های حامله در گروه‌های D,C,B,A به

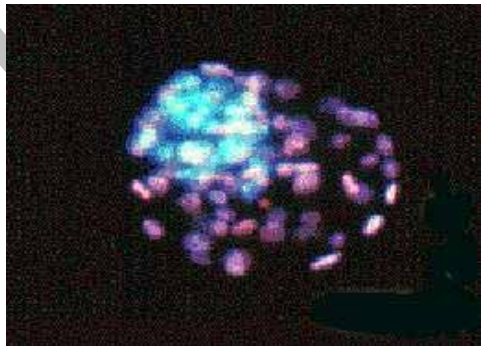
شکل ۱: بلاستوسیست حاصل از کشت جنین دو سلول

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: میزان بلاستوسیست و درصد سلول‌های توده‌ای داخلی (Inner Cell Mass=ICM) نسبت به کل سلول‌های حاصل از کشت جنین‌های دو سلولی در محیط کشت با غلظت‌های متفاوت فاکتور مهارکننده لوسمی

مشخصات	KSOM + AA (A)	KSOM + AA + 500 IU/ml LIF (B)	KSOM + AA + 1000 IU/ml LIF (C)	KSOM + AA + 1500 IU/ml LIF (D)
تعداد جنین دوسلولی کشت داده شده	۱۷۰	۱۷۲	۱۶۴	۱۶۳
میزان بلاستوسیست حاصل	۶۶ (٪۳۸/۸۲)	۹۹ (٪۵۷/۵۵)	۹۶ (٪۵۸/۵۳)	۹۳ (٪۵۷/۰۵)
تعداد سلول‌های توده داخلی	۱۹±۲،۶	۲۸±۲،۴	۲۴±۲،۱	۲۶±۳،۲
درصد ICM/Total cells	۲۸/۲	۳۳/۹	۳۲/۷	۳۲/۵



شکل ۲: بلاستوسیست رنگ‌آمیزی شده. سلول‌های توده‌ای داخلی به رنگ آبی و سلول‌های توده‌ای خارجی به رنگ صورتی دیده می‌شوند.

ترتیب برابر $6 \pm 2/4,19 \pm 2/1,28 \pm 2/2,24 \pm 3/26$ است. تست آماری نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایشی با و بدون فاکتور مهارکننده لوسمی است (جدول ۱)؛ یعنی فاکتور مهارکننده لوسمی بر میزان سلول‌های توده‌ای داخلی اثر مثبت داشته، باعث افزایش تعداد سلول‌های توده‌ای داخل در تمام گروه‌های آزمایشی می‌شود ($p<۰/۰۵$). اما تفاوت معناداری در اثر فاکتور مهارکننده لوسمی با غلظت‌های متفاوت بر روی تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی بلاستوسیست‌ها مشاهده نشد. همچنین با انجام تست آزمایشی ANOVA مشخص شد که نسبت میزان توده سلول داخلی به کل سلول‌ها در بین گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی معنادار است ($p<۰/۰۵$)؛ اما بین گروه‌های آزمایشی در این مورد نیز تفاوت معناداری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

بحث

ارتقای کیفیت شرایط کشت از اهداف ویژه بسیاری از محققان است، زیرا در شرایط آزمایشگاهی موجود دیده شده که سرعت و میزان تکوین جنین‌ها [۱۸] و فعالیت سنتزی آن‌ها [۱۹]، توان زیستی [۲۰] و تعداد سلول‌های جنین‌ها [۲۱] نسبت به جنین‌هایی که در محیط داخلی بدن رشد یافته‌اند کم‌تر است. به همین دلیل، تلاش‌های فراوانی به‌منظور بهبود محیط کشت جنین‌ها پی‌ریزی شده که از جمله می‌توان به روش هم کشتی یا کشت همزمان جنین اولیه با سلول‌های اپی‌تلیالی لوله رحم [۲۲]، فیبروبلاست رحم [۲۳] و سلول‌های مشتق از کلیه میمون سبز آفریقایی (Vero Cells) اشاره کرد [۲۴و۲۵] که نتایج حاصل از این نوع کشت نسبتاً رضایت بخش بوده است. گفته می‌شود که علت اصلی نتایج خوب سیستم هم کشتی این است که از سلول‌های تغذیه‌کننده

Archive of SID

www.SID.ir

(feeder cells) فاکتورهای رشد و دیگر مواد مغذی ترشح می‌شود و فاکتور مهارکننده لوسمی یکی از آن فاکتورها است [۱۳]. در این تحقیق به‌جای استفاده از سیستم هم کشتی و کشت همزمان بلاستوسیست‌ها و سلول‌های آندومتر رحم، از فاکتور مهارکننده لوسمی به‌دلیل آسانی دسترسی، سادگی کاربرد و عدم احتمال عفونت ویروسی استفاده شده است.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی بر جنین موش [۵]، گوساله [۶] و گوسفند [۷] مؤثر است. دانگلیسون (Dunglison) و همکاران او [۲۶] طی تحقیقی اعلام کردند که فاکتور مهارکننده لوسمی باعث بهبود تشکیل بلاستوسیست انسانی از ۱۸/۴ درصد به ۴۳/۶ درصد می‌شود. در همین رابطه لی – پینگ (Lai-Ping) و همکارانش اثر LIF و فاکتور رشد اپیدرمی (epidermal growth factor) را بر روی تکامل، جایگزینی و جنین‌های حاصل مطالعه کرده، گزارش کردند که در محیط‌های ساده، نتیجه اثر این مواد پایین‌تر از حد انتظار است؛ اما آن‌ها ضرورت کارهای بیش‌تر با LIF را در این زمینه مورد تأکید قرار دادند [۱۵].

مورتن (Morten) و همکاران او در یک مطالعه که اخیراً انجام شده، گزارش کرده که اضافه کردن LIF ۱۰۰۰IU/ml در محیط کشت در جنین‌های حاصل از گاومیش در زمان‌های مختلف، آثار متفاوتی بر تکامل جنین‌ها داشته است [۱۶]. در تحقیق حاظر مشخص شد که فاکتور مهارکننده لوسمی باعث بهبود تشکیل بلاستوسیست می‌شود و بین سه غلظت به‌کار گرفته شده (۵۰۰IU/ml، ۱۰۰۰IU/ml و ۱۵۰۰IU/ml) در مطالعه حاضر اختلاف معناداری دیده نشد. با توجه به یافته‌های این مطالعه و مطالعات مکمل دیگر، شاید بتوان غلظت پایه را ۵۰۰IU/ml در نظر گرفت؛ چرا که نتایج این مطالعه در گروه‌های مختلف با یافته‌های سایر محققان [۵،۱۵و۱۶] که غلظت پایه را ۱۰۰۰IU/ml پیشنهاد کرده‌اند هم خوانی دارد. همچنین در این مطالعه مشخص گردید که فاکتور مهارکننده لوسمی، تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی بلاستوسیست‌های مورد مطالعه را افزایش می‌دهد و این افزایش در غلظت‌های متفاوت فاکتور مهارکننده لوسمی یکسان است. در مورد این‌که این فاکتور چگونه میزان سلول‌های توده‌ای داخلی بلاستوسیست‌ها را افزایش می‌دهد و میزان آن را نسبت به تعداد کل سلول‌های بلاستوسیست بهبود می‌بخشد باید گفت که مکانیسم اثر آن دقیقاً مشخص نیست و اصولاً فاکتور مهارکننده لوسمی یک گلیکوپروئین است با فعالیت بیولوژیک متضاد (paradoxical) که به نوع سلول بستگی دارد؛ اما بعضی از محققین معتقد هستند که بهبود میزان سلول‌های توده‌ی داخلی نسبت به کل سلول‌ها موجب Viability جنین‌ها می‌شود [۱۶و۲۷] و برای مثال میزان تکثیر سلول‌های ریشه‌ای جنین (stem cells) را در محیط کشت افزایش می‌دهد و در عوض از تمایز آن‌ها جلوگیری می‌کند، اما بر عکس، تمایز سلول‌های Myeloid leukemia cell line را افزایش می‌دهد و پرولیفراسیون سلول‌ها را کم می‌کند [۲۷و۲۸]. همچنین تشکیل اکتودرم اولیه (Primitive ectoderm) را مهار کرده، میزان تشکیل اندودرم اولیه را بهبود می‌بخشد [۲۹،۳۰و۳۱]. اما شاید بتوان گفت که فاکتور مهارکننده‌ی لوسمی قطبیت سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و یا این‌که بر روی بیان ژن‌های مورد نیاز برای تمایز سلول‌های توده‌ای داخلی مؤثر باشد که این موضوع به مطالعات بیش‌تر و تحقیقات گسترده‌تر نیاز دارد. در مجموع می‌توان گفت با توجه به این‌که سلول‌های توده‌ای داخلی بلاستوسیست‌ها حساسیت زیادی نسبت به شرایط نامساعد محیط کشت دارند، اضافه کردن فاکتور مهار کننده لوسمی با غلظت پایه ۵۰۰IU/ml می‌تواند شرایط محیط کشت را بهبود بخشیده، میزان سلول‌های توده‌ای داخلی را افزایش دهد. پس به‌نظر می‌رسد لازم است اضافه کردن فاکتور مهار کننده لوسمی به محیط کشت متوالی (sequential) مورد بررسی قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه این‌که افزایش فاکتور مهارکننده لوسمی (LIF) به محیط کشت (KSOM) می‌تواند بلاتوسیست‌هایی با تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی بیش‌تر در اختیار قرار دهد که البته اثبات این امر به مطالعات بیش‌تر و گسترده‌تر نیاز دارد.

منابع

1. Hilton DJ: LIF, lots of interesting function. Trends Biochem Sci. 1992: 17: 72-76.
2. Hilton DJ., Nicola NA., Metcal FD: Pure function of murine leukemia inhibitory factor krebs ascites cells. Anal Biochem 1998: 173: 356-367.
3. Murray R., Lee F., chin cp: The gene for LIF and interleukin -6 are expressed in mouse blastocyst prior to the onset of hematopoiesis: Mol cell Biol. 1990: 10: 4953-4956.
4. Kehz MD., Attar E., Buradagunta S., Oliv DL., Kliman HJ., Arici A: Modulation of LIF gene expression and protein biosynthesis in the human fallopian tube. Am J obstet Gynecol. 1996: 175: 1611-1615.
5. Vagiagis D., Marsh MM., Frey RC., Salamonsen LA: LIF in human endometrial throughout the mansfrual cycle. J Endocrinol 1996: 148: 95-102.
6. Tsai HD., Chang CC., Hsieh YY., LO HY., Hsu Lw: Recombinant human LIF enhances the development of preimplatation mouse embryo in vitro. Fertil Steril. 1999: 71: 722-725.
7. Han Ym., Lee SE., Mogoe T., Lee KK., Fukui Y: Effect of human LIF on in vitro development of Ivf – derived bovine morula and blastocyst. Theriogenology. 1995: 44: 507-516.
8. Fry RC., Batt PA., Fairclough RJ., and Parr RA: Human LIF improves the viability of ovine embryos. Biol Reprod. 1999: 46: 470-474.
9. Nichol SJ., David Son D., Tagik T., Yoshida K., chambers I., Smith A: Complementary tissue specific expression of LIF and LIF receptor MRNA in early mouse embryogenesis.
10. Abe E., Tanaka H., Ishimi Y., Miaura C., Hyashi T., Magasawa H., Tomida M., Yanaguchi Y., Hozumi M., snda T: Differentiation indncing factor purified conditioned medium of mitogen- treated spleen cell culture stimulation bone resorption. Proc Natl Acad sci USA: 83: 5958-5962.
11. Baumann H., Wang GG: Hepatocyte – stimnlating factor 111shares structural and functional identity with LIF. J Immunol 1989: 143: 11163–11167.
12. Bhatt H., Brunet LJ., and Stewart CL: Uterine expression of LIF coincides with the onset of blastocyst implantation. Proc Natl Acad Sci USA. 1991: 88: 11408–11412.
13. Stewart CL., Kaspar Brunet LJ: Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor Nature. 1992: 359: 76–79.
14. Vogiagis D., Salmonsen LA: The role of leukemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. Endocrinology. 1999: 160: 181–190.
15. Lai-Ping C., Ho-Yin L. and Ariff B: Effect of suplimentation of leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor on murine embryonic development in vitro, implantation and outcome of offspring. Fertility and Sterility. 2003: 80 (2): 727-735.
16. Morten V., Birthe A., Jakob O.G. and Paul M-H. Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on in vitro produced bovine embryos and their outgrowth colonies. Molecular Rep. and Dev. 2005: 70: 445-454.
17. Thuas G: Simplified technique for differential staining of inner cell mass and Trophoectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod Bia Med. Online webpaper. 2001: 17: 150
18. Erbach GT., Lawitts SA., Papaionnou VE. and Biggers JD: Differetial growth of mouse preimplantation embryo in chemically defined. Biol Reprod. 1994: 50: 1027–1033.
19. June T., Fischer B: Correlation between diameter and DNA or protein Sythetic activity in rabbit blastocysts. Biol Reprod. 1988: 39: 1111–1117.
20. Carney EW. and Foote RH: Effect of Super Ovulation, embryo recovery, culture System and embryo transfer on development of rabbit embryo in vivo and in vitro. Reprod Fertil: 1990: 98: 543–551.
21. Harlow GM., Quinn p: Developmental of mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro. Aust Biol Sci. 1982: 35: 187-193.
22. Frasov J., Sherbahn R., Barbata S., Mold MW., Binsor Z: Optimizing tubal epithelial cell growth promotes mouse embryos hatching in co–culture. J Assist Reprod Genet. 1996: 423–430.
23. Barmat LI., Liu Hc., Spandorfer SD., Xuk Veeck L., Damario MA: Human development on antologour endometrial co culture versus conventional medium. Fertile steril. 1998: 70: 1109–1113.
24. Manezo YSR., Guerin SF., Czyba JC: Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayer of Vero cells. Biol Reprod. 1990: 42: 301–306.
25. Chen HF., HO ZN., Chen Sn., chao KH: Peptide extracted from vero cell cultures over come the blsatocyst block of mouse embryos in a serum free medium J Assist Reprod Genet. 1994: 11: 165–171.
26. Dunglison GF., Barlow DH., Sergeat IL: LIF Significantly enhances to blastocyst formation rates of human embryos cultured in Serum free medium. Hum. Reprod. 1996: 11: 191–196.
27. Eckert J., Tao T., Niemann H: Ratio of inner cell mass and trophoectoblatic cells in blastocysts derived from

Archive of SID

www.SID.ir

bovine 4 and 8 cells embryo and isolated blastomeres cultured in vitro in the presence or absence of protein and human LIF. Biol Reprod 1997: 57: 557–560.

28. Tsai HD., Chang CC., Hsieh YY., Hsu Lw., Chang SC., Lo HY: Effect of different concentration of recombinant LIF on different development stage of mouse embryo in vitro J. Assist Reprod Genet. 2000: 11: 352–355.

۲۹. ساکی قاسم، سبحانی علیقلی، اکبری محمد و همکاران: تأثیر فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی بر تکوین جنین دو سلولی موش، مجله پزشکی یاخته، بهار ۸۲، ۱۷ ۱۳-۹.

30. Geraring DP., Nicola NA., Metcal FD., Footes: Production of LIF in Escherichia Coli amodel procedure and its use in maintaining embryonic stem cell in culture. Biotechnology. 1989: 7: 1157–1161.

31. Shen MM., Leder P: Leukemia inhibitory factor is exprened by the preimplantotian uterus and selectively primitive ectoderm formation in vitro. Proc Nati Acad sciusa. 1992: 89: 8240–8244.

Archive of SID

www.SID.ir