Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
سال یازدهم ، شماره اول ، بهار ۱۳۸۲ ، ص ۵۸

بررسی اثرات فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) بر تکامل جنین های مورولای موش

سیدمرتضی کروجی[۱]، دکتر منصوره موحدین [۲]، مجتبی رضازاده ولوجردی[۳]

چکیده

جنین موش قبل از لانه گزینی انواع گیرنده های فاکتورهای رشد ولیگاندهای مربوطه را بیان می کند. یکی از این فاکتورها EGF است که توسط جنین قبل از لانه گزینی از مرحله هشت سلولی به بعد بیان می شود. EGF تکثیر و تمایز سلولی را تحریک نموده و به عنوان یک میتوژن که میتوز و تمایز سلولهای تروفواکتودرم را افزایش می دهد، عمل می کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر EGF بر روی تکامل جنین های مورولای موش در محیط کشت و یافتن غلظت مناسب آن در دامنهٔ مورد نظر بود. به این منظور از جنین های مورولای موش نژاد NMRI که پس از تحریک تخمک گذاری بدست آمده بودند، استفاده شد. سیر مراحل تکاملی جنین ها در چهار گروه شاهد (بدون استفاده از EGF در محیط کشت T6)، گروه آزمون ۱ (استفاده از EGF با غلظت ۱۰ng/ml)، آزمون ۲ (غلظت ٤ng/ml از EGF) و آزمون ۳ (غلظت ۱ng/ml از EGF) به مدت ۹٦ ساعت مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. یافته های حاصل از این مطالعه نشان داد که پس از ۹٦ ساعت ۸۳/۲ درصد جنین های گروه آزمون ۱ به مرحله خروج از زونا رسیدند که در همین روز این مقدار برای گروه های شاهد و آزمون ۲ و ۳ به ترتیب۷۰/٦، ٦۷ و ٦٦/۷ درصد بود که ما بین هر یک از گروه ها با گروه آزمون ۱ تفاوت معنی داری مشاهده شد. میزان دژنراسیون گروه آزمون ۱ در روز چهارم کشت به ۱٦/۸ درصد رسید که تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت اما در دو گروه آزمون ۲ و ۳ این مقدار بالا بود (به ترتیب ۳۳ و ۳۳/۳ درصد) که تفاوت های معنی داری با گروه شاهد و آزمون ۱ نشان دادند. در مجموع از پژوهش حاضر می توان نتیجه گیری کرد که تکوین جنین های مورولای موش در محیط کشت حاوی EGF با غلظت ۱۰ng/ml نسبت به دوزهای ٤ng/ml و ۱ng/ml و گروه شاهد بهتر و سریعتر تا مرحله خروج از زونا صورت می گیرد.

واژه های کلیدی: جنین موش، محیط کشت، EGF

مقدمه

لانه گزینی یک پروسه پیچیده است که نیاز به فاکتورهای مستمر بیوشیمیایی- فیزیکی و رابطهٔ متقابل ما بین آندومتر رحم و سلول های جنینی دارد. برای یک لانه گزینی موفق نیاز به مرحله تکاملی خاص جنینی و همچنین وضعیت خاص اندومتر و همزمانی اتفاقات با یکدیگر است[۱]. علیرغم آن که بیش از یک دهه از عمر لقاح در محیط کشت (IVF) و انتقال جنین می گذرد و پیشرفت های چشمگیری در سیستم کشت جنین حاصل شده است اما هنوز میزان درصد لانه گزینی جنین های حاصل از IVF پایین بوده و ایده آل نمی باشد. تحقیقات اخیر مشخص کرده است که بسیاری از فاکتورهای رشد یا سیتوکین ها دارای نقش اساسی و مهم در تکامل اولیهٔ جنین و روند لانه گزینی می باشند[۲،۳]. گزارشاتی مبنی بر بیان فاکتور رشد

۱- دانشجوی دکترای رشته علوم تشریح
۲و۳- استادیار گروه علوم تشریح - دانشکده علوم پزشکی
۱و۲و۳- دانشگاه تربیت مدرس - تهران

www.SID.ir

Archive of SID

اپیدرمی(EGF) ، دو زیر مجموعه از فاکتور رشد Transforming (TGF - α , β) و گیرنده های آنها، فاکتور رشد شبه انسولین II,I (IGF - I , II) ، فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) ، اینترلوکین (IL) و فاکتور مهار کننده لوسمی (LIF) در جنین و سیستم تناسلی موش صحرایی[۴]، گاو[۵]، گوسفند[۶] و انسان[۷] منتشر شده است.

از میان فاکتورهای رشد ، EGF تکثیر سلولی و تمایز را تحریک می کند[۸] و همچنین باعث بلوغ سیتوپلاسم تخمک نابالغ موش[۹ و ۱۰]، خوک[۱۱] و انسان[۱۲ ، ۱۳] می شود. در عین حال EGF از تخمدان[۱۴]، لوله های فالوپ[۱۵] و اندومتر[۱۶] پستانداران همراه با گیرنده های آنها تخلیص شده است.

هر چند که مکانیسم کامل عمل آن و زمان تأثیر EGF بر تکامل جنین و لانه گزینی هنوز ناشناخته باقی مانده است[۱۷]، شواهدی مبنی بر ترتیب ظهور و محل گیرنده های EGF همراه با تکامل تروفواکتو درم در جنین در دست است که این فرضیه را مطرح کرده است که گیرنده های فانکشنال EGF در تحریک تکامل تروفواکتودرم نقش داشته و ممکن است در تمایز بقیهٔ مشتقات اپی تلیوم جنینی همچون سیستم عصبی نیز مؤثر باشد[۱۸]، از سالها پیش مشخص شده بود که رشد جنین های قبل از لانه گزینی در صورتی که دسته جمعی کشت داده شوند بهتر از کشت منفرد جنین ها است[۱۹]. Dey و Paria[۲۰]، مشاهده کردند که اگر EGF به محیط کشت جنین هایی که به صورت منفرد کشت داده شده اند، اضافه شود، می توان رشد آنها را بهبود بخشید و پس از آن DaS و همکارانش[۲۱] به این نتیجه رسیدند که HB - EGF (Heparin Binding - EGF) می تواند شانس خروج از زونا و هم چنین تعداد سلولهای جنینی را در جنین هایی که منفرد کشت داده شده اند، افزایش دهد. از آنجا که وجود EGF در مایع لوله رحمی ثابت شده است[۲۲]، این فرضیه مطرح شده که گیرنده های EGF که در سطوح آپیکال جنین قرار دارند ، تحت واکنش متقابل با EGF با منشأ مادری، باعث افزایش رشد و پیشرفت تکامل جنین ها در بدن موجود زنده (in vivo) می شوند، که اگر این مسأله درست باشد همیشه رشد جنین های in vivo بهتر از رشد جنین های کشت داده شده در محیط آزمایشگاه می باشد[۱۸]. از این جهت بود که محققین به فکر افزودن EGF به محیط کشت جنین ها قبل از لانه گزینی افتادند تا شرایط ایجاد شده در آزمایشگاه را به in vivo نزدیک کنند. از سوی دیگر بسیاری از محققین بر منافع کشت هم زمان جنین ها قبل از لانه گزینی با تک لایه سلولی vero اذعان دارند[۲۲،۲۳،۲۴] و احتمال آزاد شدن مقادیر کمی از فاکتورهای تحریک کنندهٔ رشد و سیتوکین ها از جمله EGF را از تک لایه سلولی مطرح کرده اند. از آنجا که کشت هم زمان دارای مشکلات زیادی است محققین به دنبال آن بودند که با اضافه کردن مستقیم EGF به محیط کشت جنین قبل از لانه گزینی از منافع کشت همزمان نیز بهره مند شوند[۲۶]. در سالهای اخیر نیز مطالعات بر روی اثرات EGF همچنان ادامه داشته و برخی از محققین توانستند با افزودن EGF با غلظت ۱۰ ng/ml به محیط کشت جنین های تک سلولی گاو بدست آمده از لقاح در محیط کشت، درصد تکوین جنین ها به بلاستوسیست به صورت معنی داری افزایش پیدا کرد[۲۷].

Sirisathein و همکارانش[۲۸] هم به این نتیجه دست یافتند که EGF علاوه بر اینکه قادر است میزان تکوین جنین ها را افزایش دهد، تعداد بلاستومرهای بلاستوسیست های حاصله را هم افزایش داده و در ضمن از فرگمانتاسیون DNA هم می کاهد. البته در میان تحقیقات انجام شده مواردی وجود دارد حاکی از اینکه EGF اگزوژنوس قادر نمی باشد که رشد و تکوین زیگوت-ها را در محیط کشت بهبود بخشد[۲۹]. اما یک سؤال اساسی وجود دارد و این که EGF با چه میزانی به محیط کشت افزوده شود. مشاهدات نشان داده اند که در گونه ها و نژادهای مختلف این مقدار فرق می کند چنانچه در موش نژاد ICR مقدار ۰/۱ng/ml[۱۷] و در موش نژاد B6 C3 F1 میزان ٤ng/ml[۲۳] باعث پاسخ مناسب جنین ها قبل از لانه گزینی شده است. از آنجا که اتفاق نظر در مورد دوز مورد استفاده EGF در محیط کشت جنین های قبل از لانه گزینی وجود ندارد . پژوهش حاضر طراحی شد تا هم زمان با بررسی اثرات EGF بر تکامل جنین های مورولای موش در دامنهٔ مورد تحقیق دوز مناسب هم مشخص شود.

www.SID.ir

Archive of SID

روش بررسی

۱- حیوان آزمایشگاهی : موش های ماده از نـژاد NMRI بـا سـن ۹-٦ هفتـه پـس از تهیـه از انسـتیتو رازی تـهران تحـت شـرایط کنترل شده ۱۲ ساعت دوره روشنایی و ۱۲ ساعت دوره تاریکی و درجه حرارت c°۲۵-۲۲ در حیوان خانـه دانشـگاه تربیـت مـدرس نگهداری شدند. موش های نر بالغ از همـان نـژاد بـا سـن تقریبـی ۱۲-۱۰ هفته نیز برای جفت گیری انتخاب شدند.

۲- تحریک تخمـک گذاری و بدسـت آوردن جنیـن : بـه منظـور تحریـک تخمـک گذاری بـه مـوش هـای مـاده میـزان ۱۰ واحـد بین المللی از hMG (Serono Italy) بـه صـورت داخـل صفـاقی (IP) تزریق شده و پس از گذشت ٤٨ ساعت ۱۰ واحد بین المللی از hCG (Organon-Holland) به صورت IP تزریق شد. سپس به منظور جفت گیری موش های نر و ماده به صورت یـک بـه یـک کنار هم قرار گرفتند. صبـح روز بعـد بـا مشـاهده پـلاک واژنـی، موش های حامله جدا شدند، جهت بدست آوردن جنین مـورولا، موش های حامله پس از گذشـت ۸۰-۷۸ سـاعت از تزریـق hCG توسط در رفتگی گردنی کشته شده و لوله های رحم و رحم آنـها خارج شد و بـا تزریـق مقـداری محیـط کشـت T6 حـاوی سـرم (BSA) بـه داخـل لولـه هـای رحمـی و شـاخه هـای رحمـی در قطـره هـای T6 کـه قبـلاً آمـاده شـده بـود و محتـوی BSA (Bovine Serum Albumin) بـا میـزان mg/ml ۱۰بـود جنین های مورولا در مرحله Compact بدست آمدند.

۳-کشت جنین هـا و افـزودن EGF بـه محیـط کشـت و آزمـون آمـاری: جـهت تهیـه غلظـت هـای مـورد نظـر از ذخـیره ng/ml ۱۰۰۰، EGF استفاده شد و با افزودن به محیط کشـت T6 غلظت های ng/ml ۱، ٤ng/ml، ۱۰ng/ml، حاصل شد. سـپس بـه قطرات محیط کشت از هر یک از سه غلظت مورد نظر افزوده شد و قطرات محیط کشت حداقل به مـدت ۱۲ سـاعت در انکوبـاتور Co2 دار قرار داده شد. جنین هـای بدسـت آمـده بـه چـهار گروه شـاهد و آزمـون ۱ (غلظـت ۱۰ng/ml از EGF)، آزمـون ۲ (غلظت٤ ng/ml از EGF) و آزمون ۳ (غلظت ng/ml ۱ از EGF) تقسیم شدند. تکامل جنین های هر یـک از چـهار گروه بـه مـدت ۹٦ سـاعت توسـط میکروسکوپ معکـوس بررسـی و روزانـه گزارش شد. برای هـر یـک از چـهار گروه، آزمـایش ۵ تـا ۸ بـار تکـرار شد . نتـایج بدست آمـده تـوسط آزمـون آمـاری مجـذور کای آنالیز شده و سطح معنی دار در حد (P<0.05) تعیین شد.

نتایج

نتایج حاصل از این پژوهش در جداول ٤-۱ آمده اسـت و در مجموع ٤۹۲ جنین مورولا مورد بررسی قرار گرفت.

جـدول (۱) حـاکی از آن اسـت کـه پـس از گذشـت ۲٤ ساعت کشت ، بیشترین تعداد جنین هـای گروه شـاهد (۷۷٪) به مرحلهٔ بلاستوسیست اولیه و ثانویـه رسیدند و در همیـن مـدت درگروه آزمـون ۱ ، ۲ و ۳ بـه ترتیـب ۵۳/۸٪ ، ۵۳/۹٪ ، ۸۳/۳٪ از جنین ها به مرحله تکاملی بلاستوسیست اولیه و ثانویه رسیدند کـه تفاوت مشاهده شده ما بین گروه آزمون ۱ و شـاهد (P<۰/۰۰۱) و آزمون ۲ و شاهد (P<۰/۰۱) معنی دار بود اما تفاوت ما بیـن گروه آزمون ۱ و شاهد ظاهری بوده و معنی دار نبـود. در همیـن مـدت در حالی که ۱۹/۵ درصـد از جنیـن هـای گروه شـاهد بـه مرحلـه خروج از زونا (Hg) و خارج شدن کامل از زونا (Hd) رسیدند در گروه آزمون این مقدار ۳۹/۵٪ و گروه آزمون ۲ هم ۲۷/۳ درصـد و گروه آزمون ۳ تنها ٤ درصد بود که تفاوت های مشـاهده شـده ما بیـن گروه آزمـون ۱ و شـاهد ۱ بـا P<۰/۰۵ و آزمـون ۲ و ۳ بـا P <۰/۰۱ معنی دار بود. در همین روز بیشترین میزان جنیـن دژنـره مربوط به گروه آزمون ۱ (٦/۷٪) بود که تفاوت آن بـا گروههـای شاهد و آزمون ۳ معنی دار بود.

در مجمـوع ایـن جـدول حـاکی از آن اسـت کـه پـس از گذشت ۲٤ سـاعت کشـت،درصـد بـالاتری از جنیـن هـای گروه آزمون ۱ به مرحله خروج از زونا رسیدند.

جدول (۲) میزان تکامل گروه های شاهد و آزمون را پس از گذشـت ٤۸ سـاعت نشـان مـی دهـد. در حـالی کـه ۳۳٪ از جنیـن هـای گروه شـاهد در مرحلـه تکـاملی بلاستوسـیت اولیـه و ثانویه بودند . ۱۰ درصد جنین های گروه آزمون ۱ در این مرحلـه بودند که تفاوت معنی دار دیده شـد (P<۰/۰۰۱) و در ایـن زمـان ۱٦/۵٪ ، ۳۹/٦٪ از جنیـن هـای گروه هـای آزمـون ۲ و ۳ در ایـن مرحلـه تکـاملی بودنـد کـه تفـاوت مشـاهده شـده مـا بیـن گروه آزمـون ۲ و شـاهد معنـی دار بـود (P < ۰/۰۱). پـس از گذشـت ٤۸ ساعت کشـت، ۵۸/٤٪ از جنیـن هـای گروه شـاهد بـه مرحلـه

www.SID.ir

Archive of SID

خروج از زونا (Hg + Hd) رسیدند و این مقادیر برای گروههای آزمون ۱ و ۲ و ۳ به ترتیب ۷۸/۲٪ ، ۶۱/۲٪ ، ۴۴/۸٪ بود که تفاوت مشاهده شده ما بین گروه آزمون ۱ و شاهد معنی دار بود (P < ۰/۰۰۱) و غیر از تفاوت ما بین گروه آزمون ۲ و شاهد که ظاهری بود بقیه تفاوت های مشاهده شده نیز معنی دار بود. در همین روز بیشترین مقدار دژ نراسیون جنینی مربوط به گروه آزمون ۲ بود که با گروه شاهد و آزمون یک تفاوت مشاهده شده معنی دار بود. در مجموع می توان نتیجه گیری کرد که بالاترین میزان خروج از زونا مربوط به گروه آزمون ۱ بود و میزان دژنراسیون جنینی این گروه هم در این روز سیر صعودی کمتری داشت. جدول (۳) میزان تکامل جنین های چهار گروه را پس از گذشت ۷۲ ساعت کشت نشان می دهد. در این روز در حالی که ٦٦ درصد از جنین های گروه شاهد به مرحلهٔ تکاملی خروج از زونا رسیده بودند هنوز ۱۸/۵ درصد از جنین ها در مرحله تکاملی بلاستوسیست اولیه و ثانویه بودند. این مقادیر برای گروه آزمون ۱، ۸۳/۲٪ در مرحلهHd + Hg بود که تفاوت مشاهده شده کاملاً معنی دار محسوب می شود (P<۰/۰۱) و هیچیک از جنین ها در مرحله تکاملی بلاستوسیست باقی نماندند. در همین روز تفاوت معنی داری ما بین میزان درصد خروج از زونا برای گروه های آزمون ۲ (٦٦/۲٪) و آزمون ۳ (٦۲/۵٪)با گروه شاهد مشاهده نشد اما هر یک از این گروهها با گروه آزمون ۱ تفاوت معنی دار داشتند. بالاترین میزان دژنراسیون در این روز مربوط به گروه آزمون ۲ (۳۲٪) بود که با گروه های شاهد و آزمون ۱ هم معنی دار بود (P< ۰/۰۱). در مجموع از این جداول مشخص می شود که جنین های گروه آزمون ۱ بالاترین میزان درصد خروج از زونا از نظر تکامل از گروه های دیگر جلوتر هستند.

جدول (٤) میزان تکامل جنین های چهار گروه را پس از گذشت ۹٦ ساعت کشت نشان می دهد. در این روز ۷۰/٦ درصد جنین های گروه شاهد به مرحله خروج از زونا رسیدند و۱۳/٤ درصد از جنین ها هنوز در مرحلهٔ تکاملی بلاستوسیست بودند اما ۸۳/۲ ٪ جنین های گروه آزمون ۱ در مرحلهٔ خروج از زونا بودند که باز هم تفاوت مشاهده شده معنی دار بود (P< ۰/۰۵). در همین مدت ٦۷ درصد از جنین های گروه آزمون ۲ و ٦٦/۷ درصد ازجنین های گروه آزمون ۳ توانستند به این مرحله تکاملی برسند که با اینکه تفاوت های موجود با گروه شاهد معنی دار نبود اما با گروه آزمون تفاوت معنی دار داشتند (P< ۰/۰۱). در همین روز بیشترین میزان دژنراسیون مربوط به دو گروه آزمون ۲ و ۳ بود (به ترتیب ۳۳ و ۳۳/۳ درصد) که با هر یک از گروه های شاهد و آزمون ۱ تفاوت معنی دار داشتند اما اختلاف معنی داری بین میزان دژنراسیون گروه آزمون ۱ و شاهد دیده نشد. این جدول حکایت از آن دارد که در روز چهارم کشت هم. همچنان میزان خروج از زونا در گروه آزمون ۱ بالاتر از گروه های دیگر می باشد.

جدول ۱: مقایسه میزان تکامل ما بین گروه های شاهد و آزمون ۱ (غلظت ۱۰ng/ml از EGF)، آزمون ۲ (غلظت ٤ng/ml از EGF) و آزمون ۳ (غلظت 1ng/ml از EGF) پس از گذشت ۲٤ ساعت کشت.

گروه	تعداد جنین ها	تعداد M(%)	تعداد EB +LB(%)	تعداد Hg +Hd(%)	تعداد Deg(%)
شاهد	۱۷٤	٤ (۲/۳)	۱۳٤ (۷۷)	۳٤ (۱۹/۵)	۲ (۱/۱)
آزمون ۱	۱۱۹	۰(۰)	a*** ٦٤ (۵۳/۸)	a*** ٤۷ (۳۹/۵)	a** ۸ (٦/۷)
آزمون ۲	۱۰۳	۲ (۲)	b** ٦٤ (۵۳/۹)	۲۸ (۲۷/۳)	b* ۷ (٦/۲)
آزمون ۳	۹٦	f**,c** ۱۱ (۱۱/۵)	f **, e*** ۸۰ (۸۳/۳)	f***, e*,c*** ٤ (٤)	f * , e* ۱ (۱/۲)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ : مقایسه میزان تکامل ما بین گروه های شاهد و آزمون ۱ (غلظت ۱۰ng/ml از EGF)، آزمون ۲ (۴ng/ml از EGF) و آزمون۳ (غلظت ۱ng/ml از EGF) پس از گذشت ۴۸ ساعت کشت.

گروه	تعداد جنین ها	تعداد EB +LB(%)	تعداد Hg +Hd(%)	تعداد Deg(%)
شاهد	۱۷۴	۵۷ (۳۳)	۱۰۲ (۵۸/۴)	۱۵ (۸/۵)
آزمون ۱	۱۱۹	a*** ۱۲ (۱۰)	a *** ۹۳ (۷۸/۲)	۱۴ (۱۱/۸)
آزمون ۲	۱۰۳	b** ۱۷ (۱۶/۵)	d ** ۶۳ (۶۱/۲)	d** , b** ۲۳ (۲۲/۳)
آزمون ۳	۹۶	e* ۳۸ (۳۹/۶)	f*, e***, c* ۴۳ (۴۴/۸)	۱۵ (۱۵/۶)

جدول ۳ : مقایسه میزان تکامل ما بین گروه های شاهد و آزمون ۱ (غلظت ۱ng/ml از EGF)، آزمون ۲ (۴ng/ml از EGF) و آزمون ۳ (غلظت ۱۰ng/ml از EGF) پس از گذشت ۴۸ ساعت کشت

گروه	تعداد جنین ها	تعداد EB +LB(%)	تعداد Hg +Hd(%)	تعداد Deg(%)
شاهد	۱۷۴	۳۲ (۱۸/۵)	۱۱۵(۶۶)	۲۷ (۱۵/۵)
آزمون ۱	۱۱۹	a*** ۰ (۰)	a ** ۹۹ (۸۳/۲)	– ۲۰ (۱۶/۸)
آزمون ۲	۱۰۳	d * , b*** ۲ (۲)	d ** ۶۸ (۶۶)	d* , b** ۳۳(۳۳)
آزمون ۳	۹۶	f **, e *** ۱۱ (۱۱/۵)	e ** ۶۰(۶۲/۵)	۲۵ (۲۶)

جدول ۴ : مقایسه میزان تکامل ما بین گروه های شاهد و آزمون ۱ (غلظت ۱ng/ml از EGF)، آزمون ۲ (۴ng/ml از EGF) و آزمون ۳ (غلظت ۱۰ng/ml از EGF) پس از گذشت ۴۸ ساعت کشت

گروه	تعداد جنین ها	تعداد EB +LB(%)	تعداد Hg +Hd(%)	تعداد Deg(%)
شاهد	۱۷۴	۲۳ (۱۳/۴)	۱۲۳(۷۰/۶)	۲۸ (۱۶)
آزمون ۱	۱۱۹	a *** ۰ (۰)	a * ۹۹ (۸۳/۲)	– ۲۲ (۱۶/۸)
آزمون ۲	۱۰۳	b*** ۰ (۰)	d ** ۶۹ (۶۷)	d* , b** ۳۴(۳۳)
آزمون ۳	۹۸	c ** ۰ (۰)	e ** ۶۴ (۶۶/۷)	e ** , c ** ۳۲ (۳۳/۳)

a : تفاوت گروه آزمون ۱ با شاهد معنی دار است.
b: تفاوت گروه آزمون ۲ با شاهد معنی دار است.
c: تفاوت گروه آزمون ۳ با شاهد معنی دار است.
d: تفاوت گروه آزمون ۱ و ۲ معنی دار است.
e: تفاوت گروه آزمون ۱ و ۳ معنی دار است.
f: تفاوت گروه آزمون ۲ و ۳ معنی دار است.

M : مورولا
EB : بلاستوسیست اولیه
LB : بلاستوسیست ثانویه
Hg : در حال خروج از زونا
Hd : خارج شدن از زونا

* P<۰/۰۵ ** P<۰/۰۱ *** P<۰/۰۰۱

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

مسلم است که تکامل موفقیت آمیز جنین وابسته به ظهور ژن های لازم [۳۰]، تنظیم هورمونی [۳۱] منبع انرژی [۳۲] و فاکتورهای رشد با سیتوکین هایی که از لوله فالوپ، رحم و همچنین خود جنین ترشح می شود، می باشد [۱۷]. هر چند که هنوز جزئیات مکانیسم های درگیر به طور کامل مشخص نشده است ، اما مطالعات اخیر حاکی از آن است که همان طور که فاکتورهای رشد در روند لانه گزینی نقش دارند، در تکامل جنین هم مؤثر هستند [۲،۳]. امروزه مشخص شده است که فاکتورهای رشد مانند TGF-α ، H ، IGFI ، PDGF ، EGF در سیستم تناسلی ساخته می شوند [۸،۳۲] که باعث تمایز در مراحل تکامل اولیه پستانداران می گردند. اما زمان سنتز، مقدار و مکانیسم کامل آن هنوز ناشناخته باقی مانده و اتفاق نظر در مورد اثرات آنها بر تکامل جنین و لانه گزینی وجود ندارد [۱۷]. ما بین فاکتورهای رشد، EGF دارای نقش برجسته ای است و تکثیر سلولی و تمایز را تحریک کرده [۸]، باعث بلوغ سیتوپلاسم تخمک موش [۹،۱۰]، خوک [۱۱] و انسان [۱۲،۱۳] می شود و به عنوان یک عامل میتوژن، میتوز را افزایش داده و باعث تمایز تروفواکتودرم جوندگان می شود [۲۰] و همچنین درتخمدان ها [۱۳]، لوله فالوپ [۱۵،۳۳]، و اندومتر [۱۶،۳۴] پستانداران همراه با گیرنده های آنها وجود دارند. در ضمن گزارشاتی وجود دارد مبنی بر این که اگر EGF حضور نداشته باشد جنین قادر به لانه گزینی کامل نخواهد بود [۳۵].

ترشح اتوکرین فاکتورهای رشد توسط جنین و ظهور گیرنده های اختصاصی آن در برخی سلول نمایانگر آن است که فاکتورهای رشد در طی حوادث اولیه تکاملی نقش مهمی بر عهده دارند (۳۸-۳۶). پروتئین گیرنده EGF در سلول های لایه تروفواکتو درم و توده داخلی سلولی جنین موش [۳۹] و انسان [۴۰] کشف شده و معلوم گشته که نبود ژن گیرنده EGF برای جنین کشنده بوده و در این صورت بلاستوسیست قادر به تشکیل توده داخلی سلولی نمی باشد [۴۱].

کشت جنین به صورت in vitro می تواند باعث کم شدن ترشح پاراکرین فاکتورهای رشد و ظهور به موقع گیرنده های آنها شود [۳۸].

این عامل همراه با عدم وجود تحریکات پاراکرینی فاکتورهای رشد مشتق از لوله فالوپ و رحم می تواند مسئول آسیب پذیر بودن جنین های in vitro شود [۴۲]. برخی از محققین که به مطالعه آپوپتوز جنینی پرداخته اند [۴۳] به نقش TGF- α در تنظیم مرگ سلولی در بلاستوسیست های موش اشاره کرده اند. اضافه کردن این فاکتور رشد به محیط کشت جنین هایی که به صورت منفرد کشت داده شدند توانست باعث کاهش مرگ سلولی در توده داخلی سلولی شود. پس می بایست مکانیسم کامل و مرحله تکاملی خاصی که هر یک از فاکتورهای رشد و از جمله EGF می توانند بر تکامل جنین اثر گذارد مشخص گردد.

در پژوهش حاضر جنین مورولا انتخاب شد چرا که این مرحله تکاملی تحت تأثیر فاکتورها و سیتوکین های اسپرم یا تخمک نمی باشد. زیرا بعد از مرحله هشت سلولی ظهور ژنوم گامت تمام شده است [۱۷] و می توان از این مرحله به بعد به مطالعه تأثیرات EGF بر تکامل جنین پرداخت. نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن بود که در گروه آزمون یک که از EGF با میزان ۱۰ ng/ml استفاده شده بود میزان خروج از زونا به صورت چشمگیری نسبت به گروه کنترل و گروه های آزمون ۲ و ۳ افزایش نشان داد که این افزایش رشد از همان روز اول کشت مشخص بود.

در مورد دوز مؤثر EGF محققین گزارشات متفاوتی داشته اند از جمله Kim و همکارانش [۱۷] توانستند با استفاده از دوز ۰/۱ng/ml میزان درصد بالاتری خروج از زونا نسبت به دوزهای ۱ng/ml, ۱۰ng/ml, ۱۰۰ng/ml بدست آورند و از میان دوزهای استفاده شده ۱۰۰ng/ml کمترین میزان خروج از زونا را نشان داد. در حالی که Desai و همکارانش [۲۶] با دوز ٤ng/ml از EGF توانستند نتیجه مطلوبی بدست آورند و Shi [۲۹] نتوانست از میان دوزهای مورد استفاده، هیچیک را مفید تشخیص دهد. با توجه به این که نژادهای متفاوتی از موش استفاده شده به نظر می رسد که دوز اپتیمم وابسته به نژاد می باشد و نمی توان یک دوز واحد را برای نژادهای مختلف استفاده کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن بود که میزان دژنراسیون در گروه های آزمون ۱ و ۲ نسبت به گروه شاهد در ۲٤ ساعت اولیه کشت بالا بود و پس از گذشت ٤٨ ساعت در هر سه گروه بالاتر از گروه شاهد بود تا این که در روزهای سوم و چهارم کشت میزان دژنراسیون جنینی در گروه آزمون ۱ تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت اما دژنراسیون جنینی گروه های آزمون ۲ و ۳ به صورت معنی داری نسبت به گروه شاهد و گروه آزمون ۱ افزایش نشان داد که احتمالاً علت آن ایجاد تغییرات بیوشیمیایی محیط کشت توسط EGF است. در گروه ۱ که EGF توانست اثرات بهبود تکاملی خود را اعمال کند از روز دوم کشت به بعد از سیر صعودی میزان دژنراسیون جنین کاسته شد و شاید اگر در گروه های آزمون تعویض روزانه محیط کشت صورت می گرفت احتمال بدست آوردن نتیجه ی بهتر در گروه های آزمون وجود داشت و احتمالاً تغییرات بیوشیمیایی در اثر فعل و انفعالات ما بین EGF و ترکیبات محیط کشت رخ داده که برای جنین مناسب نبوده که احتمالاً با تعویض محیط کشت میزان دژنراسیون هم کمتر می شد. به نظر می رسد که غلظت مناسب از EGF اگزوژنوس می تواند اثر تحریکی بر روند لانه گزینی هم داشته باشد [۱۷] چرا که مشاهده شد با استفاده از غلظت ۱۰ng/ml از EGF درصد بالایی از جنین ها به مرحله خروج از زونا و خارج شدن کامل رسیدند و این روند نسبت به گروه شاهد خیلی زود آغاز شد یعنی در طی ۲٤ ساعت اولیه کشت اثرات تحریکی EGF اعمال شد و در طی ۹٦ ساعت کشت همیشه درصد بالاتری از گروه آزمون ۱ توانستند به مرحله خروج از زونا برسند و از آنجا که جنین های خارج شده از زونا به ظرف کشت می چسبیدند پس چسبیدن جنین ها که نمایی از روند لانه گزینی می باشد زودتر از گروه شاهد آغاز شد.

برخی از محققین هم پیشنهاد کرده اند که احتمالاً پروسه ی چسبندگی بیشتر تحت تأثیر EGF اگزوژنوس یا پاراکرین می باشد تا خروج از زونا [۱۷] و به هر حال نقش EGF را در لانه گزینی نمی بایست نادیده گرفت. غلظت مطلوب EGF می تواند فعالیت آنزیمی از جمله متالو پروتئینازها، کلاژنازها و فعالیت مولکول هایی که در چسبندگی نقش دارند را تنظیم کند [۱۷]. دلایل زیادی برای عدم موفقیت در لانه گزینی جنین های حاصل از محیط کشت ذکر شده است از جمله ای است تکاملی به علت ناهنجاری های کروموزومی جنین، شرایط نامناسب محیط کشت، عدم پذیرش اندومتر و غیره. موفقیت میزان لانه گزینی در برنامه های IVF-ET به دنبال بهبود محیط های کشت وروش های آن حاصل شده است و گزارشاتی هم مبنی بر افزایش میزان حاملگی به دنبال استفاده از فاکتورهای رشد منتشر شده است [۲،۳].

نتایج پژوهش حاضر و همچنین دیگران [۱۷] مؤید آن است که احتمالاً EGF تکامل جنین های مراحل پیشرفته تر تکامل و روند لانه گزینی می تواند مؤثر باشد و بنابراین یک محیط کشت ساده نمکی، مثل T6 قابلیت بر آوردن کلیه نیازهای جنین های مراحل پیشرفته تر را نداشته و نیاز به هم کشتی با سلول های سوماتیک یا افزودن EGF اگزوژنوس می باشد که البته به این منظور می بایست تحقیقاتی بر روی اثرات EGF بر جنین های انسانی در مرحله قبل از لانه گزینی و همچنین روند لانه گزینی صورت بگیرد تا محیط های کشت مورد استفاده بهبود پیدا کند که بالطبع نتیجه ی آن نیز بالا رفتن میزان حاملگی زوج های نابارور است. لازم به ذکر است که در این تحقیق تنها سه دوز از EGF بر روی جنین مورولای موش مورد آزمایش قرار گرفت و برای نتیجه گیری بهتر و دقیق تر می بایست دوزهای بیشتری بر روی کلیه مراحل تکامل جنین قبل از لانه گزینی مورد بررسی قرار گیرد که این قسمت نیز توسط مولفین در دست تحقیق می باشد. در ضمن انجام مطالعات بیولوژی مولکولی که به منظور مقایسه جنین in vivo و in vitro از نظر بیان ژن گیرنده EGF در سطح بلاستومرهای جنینی کاملا ضروری است که در این مطالعه انجام نشد. در خاتمه می توان نتیجه گیری کرد که EGF با غلظت مناسب دارای اثرات مثبت بر تکامل جنین مراحل پیشرفته و همچنین لانه گزینی است که البته مکانیسم کامل آن هنوز ناشناخته باقی مانده است و نیاز به تحقیقات بیشتر برای شناخت مکانیسم عمل EGF، نقش فانکشنال EGF و گیرنده های آن در جنین قبل از لانه گزینی و روند لانه گزینی می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Harvey .M.B, Leco. K.J, Arcellane-Pamlilio .M.Y, Zhang .X, Edwards .D.R, Schults. G.A. ***Role of growth factors during peri-implantation development.*** Mol Hum Reprod 1995; 10: 712-718.

2- Pfeifer .T.L, Chegini. N. ***Immunohistochemical localization of insulin-linke growth factor-I (IGF-I), IGF-I receptor, and IGF binding proteins 1-4 in human fallopian tube at various reproductive stages.*** Biol Reprod 1994; 50: 281-289.

3- Imai .T, Kurachi .H, Adachi. K, et al. ***Changes in epidermal growth factor receptor and the levels of its ligands during menstrual cycle in human endometrium.*** Biol Reprod 1995; 52: 928-938.

4- Zhang .X, Watson .A.J, Schultz. G.A, Armstromg .D.T. ***Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in preimplantation development. Investigation of gene expression by RT-PCR.*** J Reprod Fertil 1994; 100: 375-382.

5- Watson .A.J, Hogan .A, Halel .A, Weimer. K.E, Schultz .G.A. ***Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantatin bovine embryo.*** Mol Reprod Dev 1992; 31: 87-95.

6- Watson .A.J, Watson .P.H, Arcellana-Panlilio .M, Warnes .D, Walker. S.K, Schultz .G.A, Armstrong .D.T, Seamark .R.F. ***A growth factor phenotype map for bovine preimplantion development.*** Biol Reprod 1994; 50: 725-733.

7- Schultz .G.A, Heyner. S. ***Growth factors in preimplantation mammalian embryos. In: Milligan S, ed.*** Oxford Reu Reprod Biol 1993; 15: 43-81.

8- Hill. D.J. ***Growth factors and their cellular actions.*** J Reprod fertil 1989; 85: 723-730.

9- Downs. S.M, Daniel .S.A.J, Eppig .J.J. ***Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor. Evidence for a positive stimulus of somatic cell origin.*** J Exp Zool 1988; 245: 86-96.

10- Downs .S.M. ***Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro.*** Biol Reprod 1989; 41: 371-379.

11- Liyh .L.R.H, Jiao .L.H, Wang .W.H. ***Synergetic effects of epidermal growth factor and estradiol on cytoplasmic maturation of porcine oocytes.*** Zygote 2002; 10(4): 349-354

12- Carson .R.S, Zhang. Z, Hutchinson .L.A, Herington .A.C, Findlay .J.K. ***Growth factors in ovarian function.*** J Reprod Fertil 1989; 85: 735-746.

13- Das.K,Stout .L.E, Hensleigh .H.C, Taratz. G.E, Phipps .W.R, Leung .B.S. ***Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes.*** Fertil Steril 1991; 55: 1000-1004.

14- Maruo. T, Ladines-Llave. C.A, Samoto .T, Matsuo .H, Manalo .A.S, Ito .H, Mochizuki. M. ***Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression.*** Endocrinology 1993; 132: 924-931.

15- Morishige .K.J, Kurachi. H, Amemiya. K, Adachi .H, Adachi. K, Sakoyama. Y, Miyake. A, Tanizawa .O. Endocrinology 1993; 133: 199-207.

16- Berchuck .A, Soisson .A.P, Olt .G.J, Soper .J.T, Clarke-Pearson .D.L, Bast .R.C Jr, McCarty KS Jr. ***Epidermal growth factor receptor expression in normal and malignant endometrium.*** Am J Obstet Gynecol 1989; 161: 1247-1252.

17- Kim . C . H , Chae . H . D , Cheon . Y . P , Kang . B . M , Chang . Y . S and Mok . J . E. ***The effect of epidermal growth factor on the preimplantation***

www.SID.ir

Archive of SID

development , implantation and its receptor expression in mouse embryos. J Obstet Gynaecol Res 1999; 25(2): 87-93.

18- Wiley. L.M, Adamson .E.D, Tsark .E.C. ***Epidermal growth factor receptor function in early mammalian development.*** Bio Essays 1995; 17(10): 839-846.

19- Wlley. L.M, Yamami .S, and Van Muyden .D. ***Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development in vitro. Fertil Steril.*** 1986; 45: 111-119.

20- Paria .B.C, and Dey .S.K. ***Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors.*** Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 4756-4760.

21- Das .S.K, et al. ***Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced by the blastocyst at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantaion.*** Development 1994a; 120: 1071-1083.

22- Dardik. A, Smith .R.M, and Schultz .R.M. ***Colocalization of transforming growth factor alpha and a functional epidermal growth factor receptor (EGF receptor) to the inner cell mass and preferential localization of the EGF receptor on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst.*** Dev Biol 1992; 454: 396-409.

23- Ménézo. Y, Guerin. J, and Czyba. J. ***Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayer of Vero cells.*** Biol Reprod 1990; 42: 301-306.

٢٤- موحدین.م ، رضازاده ولوجردی. م ، حسینی .م، ***هم کشتی سلولهای . vero جنینهای دو سلول موش پس از انجماد شیشه ای*** . نشریه پزشکی یاخته ، پاییز ١٣٧٨ ، شماره ٣ :٧-١

25- Nematollahi .N, Valojerdi .M.R. ***Effect of vero cell co-culture on the development of frozen-thawed two-cell mouse embryos.*** J Assist Reprod Genet 1999; 16: 380-384.

26- Desai .N, Lawson .J, Goldfarb. J. ***Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage.*** Hum Reprod 2000; 15(2): 410-418.

27- Grazil - Bilska .A.T, Choi .J.T, Bilski .J.J, Weigl .R.M. ***Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after in vitro fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone.*** Theriogenology 2003 ; 59 (5-6) : 1449-57.

28- Sirisathin. S and Bracket .B.G. ***TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I.*** Mol Reprod Dev 2003; 65(1): 51-6

29- Shi Yan Sheng WXB. ***The effect of autocrine factors on development of early embryos of mouse.*** Zygote 2001; 34(1): 72-8

30- 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 : 90 - 100.

31- Fishel . S . B, Edwards . R . G, Evans . C . J. ***Human chorionic gonadotropin secreted by preimplantation embryos cultured in vitro.*** Science 1984 ; 223: 816-818.

32- Brison .D.R, Hewitson .L.C, Leese .H.J. ***Glucose, pyruvate, and lactate concentrations in the blastocoele cavity of rat and mouse embryuos.*** Mol Reprod Dev 1993; 35: 227-232.

33- Lei .Z.M, Rao .C.V. ***Expression of epidermal growth factor (EGF) receptor and its lignads, EGF and transforming growth factor-a in human fallopian tubes.*** Endocrinology 1992; 131: 947-957.

www.SID.ir

Archive of SID

34- Chegini .N, Rao. C.V, Wakim .N, Sanfilippo .J. ***Binding of 125I-epidermal growth factor in human uterus.*** Cell Tissue Res 1986; 246: 543-548.

35- Stewart. C.L, Kaspar. P, Brunet .L.J, Bhatt. H, Gadi .I, Kontgen .F, Abbondanzo .S.J. ***Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor.*** Nature 1992;359:76-79.

36- Adamson .E. ***Activities of growth factors in preimplantation embryos.*** J Cell Biochem 1993; 53: 280-287.

37- Kane .M, Morgan. P, and Coonan .C. ***Peptide growth factors and preimplantation development.*** Hum Reprod Update 1997; 3: 137-157.

38- Neill .C. ***Role of autocrine mediators in the regulaion of embryo viability: lessons from animal models.*** J Assist Reprod Genet 1998; 15: 460-165.

39- Brison .D, and Schultz .R. ***RT-PCR-based method to localize the spatial expression of genes in the mouse blastocyst.*** Mol Reprod Dev 1996; 44: 171-178.

40- Chia .C, Winston .R, and Handyside. A. EGF, ***TGF and EGFR expression in human preimplantation embryos.*** Development 1995; 121: 299-307.

41- Threadgill .D, Dlugosz .A, Hensen. L. et al. ***Targeted disruption of mouse EGF-receptor: effect of genetic background on mutant phenotype.*** Science 1995; 269: 230-233.

42- Colling. M , GR . R , Rodriguez-Tarduchy .G, et al. ***Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis.*** Bio Essays 1994; 16: 133-138.

43- Brison .D, and Schultz. R. ***Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha.*** Biol Reprod 1997; 56: 1088-1096.

www.SID.ir