

تاثیر تک لایه‌های قطبی و غیر قطبی سلول‌های پوششی لوله رحم انسان بر تکوین جنین‌های دو سلولی موش

مجتبی رضا زاده (Ph.D.)⁺**

محمد رضا باغبان اسلامی نژاد (Ph.D.)*

پوپک افتخاری یزدانی (Ph.D.)^{****}

سعید کاظمی (Ph.D.)^{***}

چکیده

سابقه و هدف: بهبود رشد و تکوین جنین پستانداران در محیط آزمایشگاهی همواره مورد توجه بوده و در این ارتباط کارایی سیستم‌های هم‌کشتی جنین با سلول‌های سوماتیک به اثبات رسیده است. در مطالعه حاضر سیستم هم‌کشتی ویژه‌ای که در آن سلول‌های پوششی لوله رحم به حالت قطبی کشت شده است، مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های لوله رحم انسانی از بیماران تحت عمل برداشت رحم (hysterectomy) تهیه شد و سلول‌های پوششی آن به روش آنزیمی جدا گردید و بر روی سطوح پلاستیک (به حالت غیر قطبی) و ژل ECM (به حالت قطبی) کشت گردید. ماهیت پوششی سلول‌ها با روش ایمنی بافتی - شیمیایی و قطبی بودن آنها با روش میکروسکوپ الکترونی (Transmission Electron Microscopy) تأیید شد. آنگاه جنین‌های دو سلولی موش NMRI به روش Flushing تهیه شد و سیستم‌های هم‌کشتی آن با سلول‌های کشت یافته بر روی پلاستیک (غیر قطبی) و ژل ECM (قطبی) ایجاد گردید. رشد و تکوین جنین‌ها به‌طور روزانه و به مدت 96 ساعت در فرم‌های ویژه‌ای ثبت گردید و نتایج حاصل با روش آماری X^2 آنالیز شد در انتهای دوره کشت تعدادی بلاستوسیست از گروه‌های مختلف به روش افتراقی به منظور شمارش سلولی رنگ آمیزی گردید و نتایج آن با استفاده از آزمون One-way ANOVA مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج ایمنی-بافتی - شیمیایی نشانگرماهیت پوششی سلول‌های کشت یافته بود. مقاطع میکروسکوپ الکترونی قطبی بودن کامل سلول‌های کشت یافته بر روی ژل ECM را تأیید کرد. این سلول‌ها استوانه‌ای شکل بوده و بر روی غشاء پایه قرار داشتند و کمپلس اتصالی (به ویژه اتصال محکم) تشکیل شده بود؛ در حالی که سلول‌های کشت یافته بر روی پلاستیک (غیر قطبی) دوکی شکل بودند و اتصال شبه دسموزوم بین آن‌ها برقرار بود. نتایج رشد و تکوین نشان داد که در تمام مدت 96 ساعت دوره کشت، جنین‌های سیستم‌های هم‌کشتی در مقایسه با گروه شاهد تکوین بهتری دارند. مقایسه سیستم قطبی با غیر قطبی نشان داد که سیستم قطبی از لحاظ درصد تشکیل بلاستوسیست تفاوت معنی‌داری با غیر قطبی ندارد. نکته حائز اهمیت بر سلول بودن بلاستوسیست‌های سیستم قطبی نسبت به غیر قطبی بود و از این لحاظ دو سیستم تفاوت معنی‌داری داشتند.

استنتاج: بلاستوسیست‌های رشد یافته بر روی سلول‌های قطبی لوله رحم انسان، سلول بیش‌تری در مقایسه با جنین‌های سیستم غیر قطبی کسب می‌کنند و بر سلول بودن بلاستوسیست نشانه‌ای از کیفیت بالای آن است.

واژه‌های کلیدی: لوله رحم، سلول‌های پوششی

⁺✉ تهران: زعفرانیه، خیابان آصف، کوچه سیمین - پژوهشکده رویان
*** متخصص جنین‌شناسی (دانشیار) پژوهشکده رویان

* متخصص جنین‌شناسی (استادیار) علوم تشریح (جنین‌شناسی) پژوهشکده رویان و دانشگاه تربیت مدرس
** متخصص جنین‌شناسی (استاد) علوم تشریح (جنین‌شناسی) پژوهشکده رویان و دانشگاه تربیت مدرس
**** متخصص جنین‌شناسی (استادیار) پژوهشکده رویان

تاریخ دریافت : 84/2/10 تاریخ تصویب: 84/8/8

مقدمه

مورد تأثیر سلول‌های قطبی شده پوششی لوله رحم در سیستم‌های هم کشتی با جنین، گزارش‌ها بسیار اندک بوده و در این رابطه می‌توان به مطالعه اوهیبی² و همکاران (1990) اشاره کرد. این محققین سلول‌های پوششی لوله رحم گاو را بر روی Transwell بدون استفاده از ماده خارج سلولی کشت دادند و بدون ارزیابی قطبیت سلول‌های پوششی از سلول‌های حاصل در سیستم هم کشتی با جنین‌های موشی سود بردند. نتایج نشان داد که جنین سلول‌هایی تأثیری در بهبود رشد و تکوین جنین ندارند (24). در تحقیق حاضر، سلول‌های پوششی لوله رحم انسان بر روی ژل ECM کشت شد و پس از ارزیابی و تایید قطبیت سلول با روش میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission)، سیستم هم کشتی با جنین موش ایجاد گردیده نتایج حاضر حاکی از تأثیرات مثبت سلول‌های پوششی قطبی شده لوله رحم در بهبود کیفیت بلاستوسیت‌های حاصل از تکوین جنین‌های موش بر روی آنها بود.

مواد و روش‌ها

- کشت سلول:

نمونه‌های لوله رحم انسانی از بیماران تحت عمل برداشت رحم (Hysterectomy) در بیمارستان‌های آرش و امام خمینی تهران تهیه شد. در آزمایشگاه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان عملیات جداسازی و کشت سلول پوششی انجام شد. بدین ترتیب که یک برش طولی در امتداد لوله رحم ایجاد گردید و مخاط آن از لایه عضلانی جدا شد و به قطعات ریز تقسیم گردید. برای جداسازی سلول از مخاط از روش آنزیمی استفاده گردید برای این منظور قطعات مخاطی به مدت یک ساعت و در دمای

همواره سیستم‌های هم کشتی برای محققین در ارتباط با درمان نازایی اهمیت فراوانی داشته و مطالعات متعدد، کارایی این سیستم‌ها را در بهبود جنبه‌های مختلف تکوین جنین به اثبات رسانده است. تا به حال سیستم‌های هم کشتی متنوعی طراحی شده و در این میان، سیستم‌های هم کشتی با سلول‌های پوششی لوله رحم مورد توجه خاصی بوده است (1-7). هدف این سیستم‌ها، فراهم کردن محیط مشابه با لوله رحم در محیط کشت بوده، به طوری که گامت‌ها و جنین‌ها بتوانند تحت تأثیر ترشحات سلول‌های پوششی به رشد و تکوین خود با سرعتی مشابه با محیط لوله رحم ادامه دهند. اما سیستم‌های رایج هم کشتی، با توجه به روش ایجاد تک لایه‌های سلولی، در فراهم کردن محیط‌های مشابه با محیط بدن ناتوان بوده‌اند. معمولاً برای ایجاد تک لایه، سلول‌های پوششی لوله رحم با استفاده از آنزیم از بافت جدا شده و بر روی ظروف پلاستیکی کشت می‌شود. در چنین شرایطی، سلول‌های پوششی قطبیت ساختاری و عملکرد تخصصی خود را از دست می‌دهند (7-11) این سلول‌ها به شکل یک لایه سلول پوششی پهن ظاهر می‌شوند که در سطح خود چند زائده شبه میکروویلی دارند. مطالعات متعدد نشان داده است که برای جلوگیری از چنین تغییرات ساختاری و حفظ قطبیت سلول به هنگام کشت، استفاده از ماده خارج سلولی در کشت سلول پوششی ضرورت دارد (12-16). جوشی¹ و همکاران در سال 1995 با استفاده از ماده خارج سلولی (ماتریژل)، سلول‌های پوششی لوله رحم گاو را به حالت قطبی کشت دادند و پس از آن محققین دیگر سلول‌های پوششی لوله رحم سایر حیوانات و نیز انسان را بر روی ژل ماده خارج سلولی یا ژل ECM (Extra cellular matrix) کشت دادند (17-23). در

2. Ouhibi

1. Joshi

Insert (Sigma U.S.A) Plate Insert گسترانیده شد. داخل ظرف کشت شش‌خانه‌ای قرار گرفت. به محیط کشت قطبی علاوه بر سرم و آنتی‌بیوتیک، فاکتور رشد اپیدرمال (Sigma U.S.A) و اسیدرتینوئیک (Sigma;USA) و ترانسفرین (Sigma;USA) هر کدام به میزان 10ng/ml اضافه گردید.

2- ارزیابی سلولهای کشت شده:

برای تایید ماهیت پوششی سلول‌ها از روش ایمنی-بافتی شیمیایی استفاده گردید. برای این منظور از کیت Envision system (Dako;Holand) استفاده شد. روش کار براساس دستورالعمل کارخانه سازنده بود. با این روش آنتی‌سایتوکراتین 7، سیتوپلاسم محتوی ساتوکراتین 7 را قهوه‌ای رنگ می‌کند (تصویر 1، a).

اتاق در معرض تریپسین نوع 0/5I درصد (Sigma U.S.A) قرار گرفت. حاصل این هضم تحت 1200 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب به دست آمده در داخل محیط Dulbecp's modified eagls medium/ HAM's-F12, Sigma, USA) DMEM/ 10 محتوی HAM's, F12 درصد سرم (Fetal Calf serum, 100 IU/ml Gibco, Denmark) FCS پنی‌سیلین و 100 IU/ml استرپتومایسین (Sigma U.S.A) معلق گردید. سپس سلول‌ها با غلظت 6×10^5 سلول در میلی‌لیتر بر سطح پلاستیک ظرف کشت شش‌خانه‌ای از جنس Polysterene (غیر قطبی) و ژل ECM (قطبی) کشت گردید. برای انجام کشت قطبی، ژل ECM به صورت لایه نازک بر سطح Millicell Culture

تصویر شماره 1: (a) ایمونوسیتوشیمی سلول‌های کشت یافته بر روی پلاستیک. سیتوپلاسم سلول‌های پوششی به دلیل وجود سایتوکراتین 7 قهوه‌ای رنگ شده است. بالا و چپ: غدد اندومتریوم اسنان (کنترل مثبت). بالا و راست: سلول‌های کشت یافته لوله رحم که تمام مراحل رنگ‌آمیزی به استثنای مرحله استفاده از آنتی‌سایتوکراتین 7 را طی کرده‌اند (کنترل منفی). (b). تصویر مقطع ظریف سلول‌های کشت یافته بر سطح ژل ECM ($\text{Bar}=1/6\mu\text{m}$). (c) تصویر مقطع ظریف مقطع ظریف سلول کشت یافته بر روی پلاستیک ($\text{Bar}=1/6\mu\text{m}$). (d) تصویر مقطع ظریف سلول‌های کشت یافته بر حسب ژل ECM ($\text{Bar}=200\text{nm}$) مژک C: گرانول ترشعی S: (e) رنگ‌آمیزی افتراقی بلاستوسیت (توده سلولی داخلی: آبی رنگ، تروفواکتودرم: قرمز رنگ).

جنین‌های مورد مطالعه از موش‌های ماده NMRI به سن تقریبی 8-6 هفته تهیه شد بدین ترتیب که ابتدا موش‌ها با تزریق 10 IU فولیگون (Intevet, Holland, IU, 10 گونادوتروپین کوریونیک انسانی (Human Chorionic gonadotropin, organon, Holland) تحریک شدند و داخل قفس‌های موش‌ها همان نژاد قرار گرفتند. 44-48 ساعت پس از تزریق HCG موش‌های دارای پلاک واژنی قربانی شدند و جنین‌های دو سلولی آن‌ها با روش Flushing خارج گردید.

در مطالعه حاضر گروه‌های قطبی و غیرقطبی به ترتیب گروه مطالعه I و II گروه محیط DMEM/HAM'S-F12 گروه شاهد در نظر گرفته شد. هر آزمایش هم کشتی 5 بار تکرار گردید. و در طی هم کشتی میزان تکوین جنین به مراحل بالاتر هر 24 ساعت به مدت 96 ساعت در فرم‌های ویژه ثبت شد. جنین‌هایی که بیش از 25 درصد قطعه قطعه شده بودند یا بلاستومر آن‌ها ظاهری تیره و دانه دانه داشتند به عنوان جنین دژنره ثبت شد و در مورد مورولا و بلاستوسیت آن‌هایی که فروریخته (Collapse) بودند به عنوان دژنره در نظر گرفته شدند در انتهای دوره هم کشتی نتایج حاصل با روش آماری X^2 آنالیز شد.

برای ارزیابی قطبیت سلول‌ها در زمان کشت بر روی ژل ECM از روش میکروسکوپ الکترونی گذاره استفاده شد. مواد مورد نیاز این بخش از شرکت سیگما تهیه شد. روش کار به این ترتیب بود که ابتدا سلول‌ها با استفاده از محلول کارنوفسکی (1/5 ساعت) و اسمیوم (1 ساعت) به ترتیب فیکس اولیه و ثانویه شدند و آنگاه با درجات صعودی اتانول آبیگری گردیدند و مراحل آغشتگی را با استفاده از مخلوط 1:3، 1:1، 3:1 رزین و استون و رزین خالص طی کردند. در پایان سلول‌های کشت یافته بر روی ژل ECM به روش معمول قالب‌گیری شدند و سلول‌های کشت شده روی پلاستیک با روش Flat embedding قالب گرفته شدند.

3- تهیه جنین و ایجاد سیستم هم کشتی:

سلول‌های پوششی به حالت قطبی و غیرقطبی به روشی که در بخش پیشین توضیح داده شد کشت گردیدند. یک هفته پس از آغاز کشت سلول‌ها سطح پلاستیک و ژل ECM را پر کردند. در این زمان محیط سلول‌ها با DMEM/HAM'S-F12 حاوی 5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر (BSA, sigma, USA) جایگزین شد. پس از 24 ساعت جنین‌های دو سلولی روی آن‌ها کشت گردید.

سلول‌های کشت یافته بر روی ژل ECM درمقاطع میکروسکوپی استوانه‌ای شکل ظاهر شدند. این سلول‌ها بر روی لایه نازکی از غشاء پایه قرار داشتند و در سطح آزاد آن‌ها میکروویلی فراوان بود ولی مژک به ندرت مشاهده شد. دو سلول مجاور با کمپلس اتصال به هم متصل بودند. هسته تقریباً کروی شکل سلول در بخش مرکزی و متمایل به قاعده قرار داشت و کروماتین آن یکنواخت بود. در داخل سیتوپلاسم سلول دستگاه گلژی بزرگ، قطرات چربی الکترون دنس، میتوکندری‌های کروی و بیضی شکل و مخازن rER وجود داشت. در بخش راسی سیتوپلاسم در بعضی مقاطع گرانول‌های ترشحی حاوی مواد الکترون تابناک (Lucent) مشاهده شد (شکل 1؛ b,d). سلول‌های کشت یافته بر روی پلاستیک، درمقاطع میکروسکوپی دوکی شکل با هسته‌ای درشت و کشیده ظاهر شدند. هسته در ضخیم‌ترین بخش سلول واقع بوده، قسمت اعظم آن را اشغال می‌کرد و در دو طرف آن سلول به شکل نوار باریکی به طرفین امتداد می‌یافت و بین دو سلول مجاور اتصال محکم برقرار نبود (شکل 1، c).

2- هم‌کشتی:

در مجموع 363 جنین دو سلولی موش نژاد NMRI با پنج بار تکرار آزمایش کشت شد. 100 جنین به گروه مطالعه I (قطبی لوله رحم) 103 جنین به گروه مطالعه II (غیرقطبی لوله رحم) و 110 جنین به گروه کنترل محیط (DMEM/HAM'S-F12) اختصاص یافت. نتایج تکوین و دژنراسیون جنین‌ها در نمودار 1 و 2 آمده است.

4- رنگ آمیزی تفکیکی بلاستوسیست‌ها:

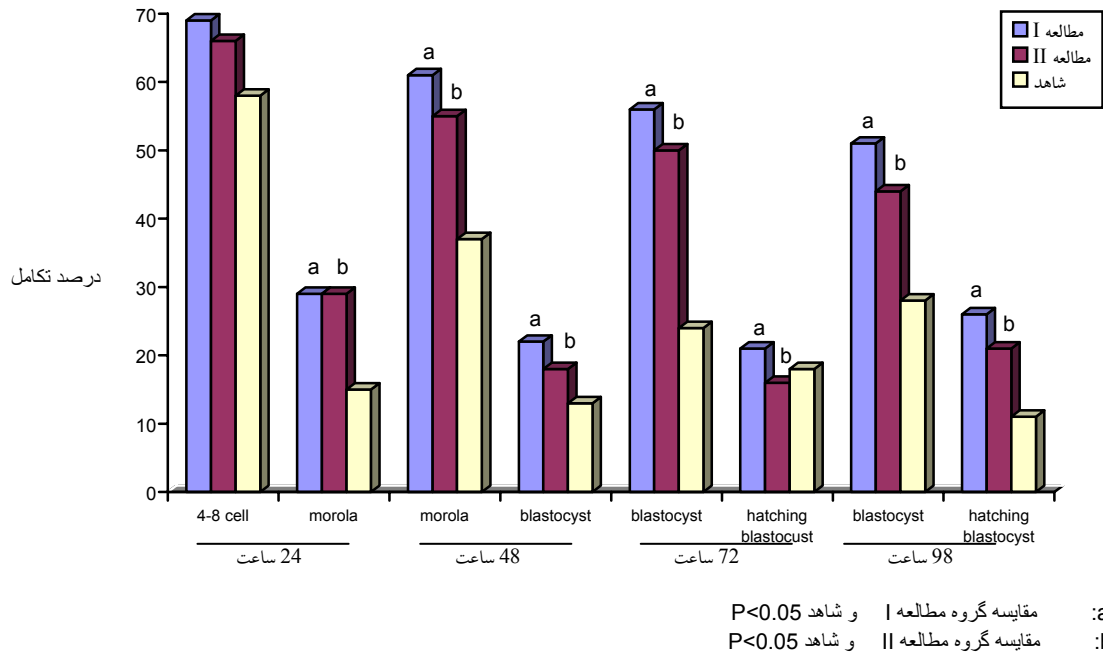
در مطالعه حاضر، از هر گروه، تعدادی بلاستوسیست به طور اتفاقی برای رنگ آمیزی تفکیکی دو بخش انتخاب گردیدند. برای این منظور از روش رنگ آمیزی (Inner cell mass) ICM و (Trophoectoderm) TE Thouas و همکاران استفاده گردید (23). برای رنگ آمیزی از محلول شماره یک شامل محیط MTF (Murine tubal fluid) حاوی یک درصد ... و 100 میکروگرم در میلی‌لیتر پروپیدیم یدید (Sigma; USA) و محلول شماره دو شامل فیکساتیواتانول خالص حاوی 25 میکروگرم در میلی‌لیتر بیس بنزید یا هوخست 33258 (Sigma, USA) استفاده گردید. بدین ترتیب که ابتدا بلاستوسیست به مدت 10 ثانیه درون 500 میکرولیتر محلول شماره یک و سپس 12 ساعت درون 500 میکرو لیتر محلول شماره 2 قرار گرفت و در انتها به درون یک قطره گلیسرول واقع بر روی لام منتقل شد و یک لامل بر روی آن قرار گرفت. بلاستوسیست‌های رنگ‌شده، توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به لامپ‌ماورا بنفش مورد مشاهده قرار گرفتند. با این روش

توده	سلول	داخلی
------	------	-------

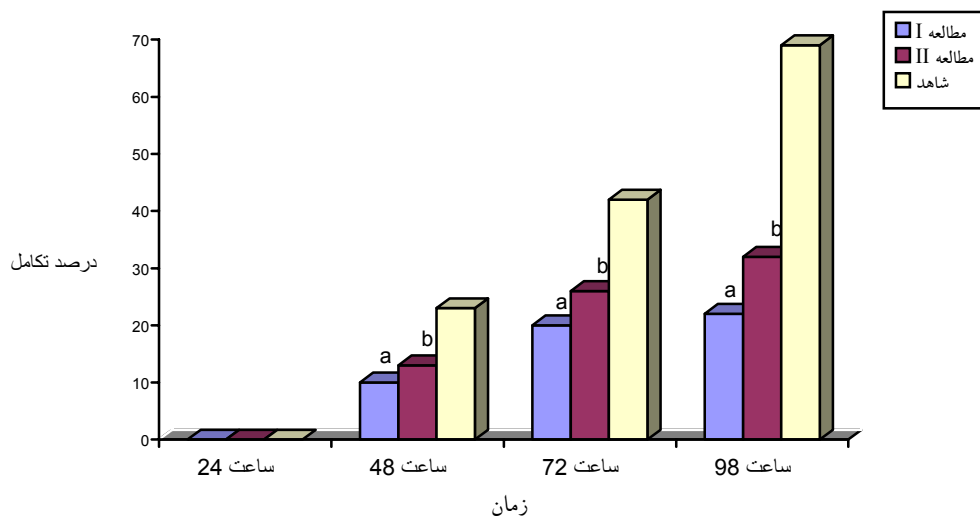
آبی رنگ و تروفواکتورم قرمز رنگ شد (شکل 1، e) و سلول‌های هر بخش به تفکیک قابل شمارش بود. نتایج حاصل با آزمون آماری One-way ANOVA آنالیز گردید.

یافته‌ها

1- فراساختار



نمودار شماره 1: مقایسه تکوین جنین های دو سلولی موش در گروه های هم کشتی لوله رحم و گروه شاهد



a: مقایسه گروه مطالعه I و شاهد $P < 0.05$
 b: مقایسه گروه مطالعه II و شاهد $P < 0.05$

نمودار شماره 2: مقایسه دژنراسیون جنین‌های دوسلولی موش در گروه‌های هم‌کشتی لوله رحم و گروه کنترل

تفاوت معنی دار نبود. از نظر دژنراسیون جنین‌ها، گروه مطالعه I با 11 درصد کم‌ترین دژنراسیون را داشت از این نظر با گروه مطالعه II تفاوت معنی دار نبود ولی در مقایسه با شاهد این تفاوت معنی دار بود ($P < 0.05$). همچنین درصد دژنراسیون جنین در گروه مطالعه II کمتر از شاهد بود ($P < 0.05$).

ج) ساعت 72 هم‌کشتی: در این زمان، اغلب جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند و تعدادی در حال خروج از زونا بودند و درصد کمی نیز دژنره شده بودند. درصد بلاستوسیست و بلاستوسیست در حال خروج زونا در گروه مطالعه I بیش از دو گروه دیگر بود این درصدها در مقایسه با گروه مطالعه II معنی دار نبود ولی تفاوت آن با گروه شاهد معنی دار بود (به ترتیب $P \leq 0.001$ و $P < 0.05$) گروه مطالعه II به نوبه خود در مقایسه با شاهد درصد بیشتری از جنین‌ها را به مرحله تکاملی بلاستوسیست و بلاستوسیست در حال خروج از زونا رسانده بود (بدون تفاوت آماری). از نظر درصد دژنراسیون، بیش‌ترین میزان در گروه شاهد (12/43)

الف) ساعت 24 هم‌کشتی: در این زمان، جنین‌ها به مرحله 4-8 سلولی و مروزا تکوین یافته بودند و هیچ جنینی دژنره نشده بود 30 درصد جنین‌ها در گروه مطالعه I به مرحله مروزا رسیده بودند، در حالی که این درصد در گروه‌های مطالعه II و کنترل به ترتیب 30/09 درصد و 15/62 درصد بود. تفاوت بین گروه‌های مطالعه و شاهد معنی دار بود ($P < 0.05$). درصد جنین‌های 4-8 سلولی نیز در گروه مطالعه I بیش از مطالعه II و مطالعه II بیش از شاهد بود اما تفاوت‌ها معنی دار نبود.

ب) ساعت 48 هم‌کشتی: برخی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند و نیز درصد مروزا نسبت به روز قبل افزایش داشت. تفاوت درصد بلاستوسیست بین گروه مطالعه I و II معنی دار نبود ولی این تفاوت بین گروه مطالعه I و شاهد معنی دار بود ($P < 0.05$) همچنین در گروه مطالعه II حدود 19/41 درصد جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند که در مقایسه با درصد بلاستوسیست گروه شاهد

3/58	3/58	26/35		
80/55±	19/45±	^b 101/86±	15	غیرقطبی لوله رحم
4/73	4/73	73/46± 18/36	15	کنترل
78/51±	21/49±			

a: مقایسه قطبی با شاهد (p<0.005) ، b: مقایسه غیر قطبی با شاهد (p<0.005)

c: مقایسه قطبی با غیر قطبی (p<0.05)

درصد) و کمترین در گروه مطالعه I (22 درصد) اتفاق افتاده بود و تفاوت معنی دار بود.

د) ساعت 96 هم کشتی: در این ساعت، در مقایسه با روز قبل، درصد بلاستوسیت‌های در حال خروج از زونا و درصد جنین‌های دژنره افزایش یافته بود. در مجموع بلاستوسیت‌های گروه مطالعه I بیش از گروه مطالعه II بود با این وجود تفاوت معنی دار نبود. گروه‌های مطالعه I و II هر کدام در مقایسه با گروه شاهد با تفاوت آماری معنی داری درصد بیش‌تری از جنین‌ها را به مرحله بلاستوسیت (P≤0.001) و بلاستوسیت در حال خروج از زونا (P<0.05) رسانده بودند. کمترین دژنراسیون در گروه مطالعه II اتفاق افتاده بود که از این نظر با گروه مطالعه II تفاوت معنی دار نبود ولی با گروه شاهد تفاوت آن چشمگیر بود.

3- میانگین‌های سلولی بلاستوسیت:

در مجموع 44 جنین رنگ شد از این تعداد 14 جنین به گروه مطالعه I و 15 جنین به گروه مطالعه II و 15 جنین به گروه شاهد اختصاص داشت. نتایج در جدول شماره 1 آمده است. گروه مطالعه I با میانگین 121/14±35/59 سلول در بلاستوسیت و مطالعه II، 101/86±26/35 سلول تفاوت معنی دار با گروه شاهد (73/46±18/36 سلول) داشت. از این نظر تفاوت میان گروه مطالعه I و II نیز معنی دار بود (P<0/05). از لحاظ میانگین درصد ICM و TE، بین گروه‌ها تفاوت معنی داری وجود نداشت.

جدول شماره 1: میانگین سلولی بلاستوسیت‌های حاصل از تکوین جنین‌های دو سلولی موش در گروه‌های لوله رحم و شاهد

گروه	تعداد جنین	میانگین کل	ICM میانگین درصد	TE میانگین درصد
قطبی لوله رحم	14	^a 121/14±	19/26±	80/74±
		35/59	3/04	5/60

بحث

پولارد¹ و همکاران در سال 1989 اظهار کرده‌اند که حفظ قطبیت سلول در محیط کشت برای بهبود نتایج هم کشتی ضروری است (18). دو سال بعد محققین فوق سلول‌های لوله رحمی گاو را قطبی کرده و اسپرم گاو را با آن هم کشتی دادند و با گروه غیر قطبی مقایسه کردند (18). در گروه قطبی 34/4 درصد اسپرم‌ها به مدت 48 ساعت توان حرکتی خود را حفظ کردند؛ در حالی که در گروه غیر قطبی، این میزان 0/8 درصد بود. هم‌چنین در گروه قطبی، ظرفیت لقاحی اسپرم به مدت 30 ساعت حفظ شد. حفظ توان حرکتی و ظرفیتی لقاحی اسپرم به مدت طولانی در هم کشتی با سلول‌های قطبی شده لوله رحم توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (19، 20)، از طرف دیگر و همکاران در سال 1990 گزارش کردند که رشد و تکوین جنین در سیستم‌های هم کشتی وابسته به قطبیت سلول‌های feeder نیست (این موضوع در پاراگراف بعدی بحث شده است)؛ در حالی که بر اساس نتایج تحقیق حاضر به نظرمی‌رسد حفظ قطبیت سلول‌های پوششی در سیستم هم کشتی برای بهبود رشد و تکوین جنین ضروری باشد. اگر دو پارامتر درصد تشکیل بلاستوسیت و تعداد سلول بلاستوسیت‌های حاصل را به عنوان دو شاخص مهم ارزیابی نتایج سیستم هم کشتی در نظر بگیریم بر اساس نتایج مطالعه حاضر، سلول‌های قطبی شده هر دو شاخص را بهبود می‌دهند. ولی مطالعات آماری نشان داد که

1. Pollard

تنها بهبود شاخص دوم (تعداد سلول بلاستوسیست) معنی‌دار است. به عبارتی با وجود بالا بودن درصد تشکیل بلاستوسیست در گروه قطبی، تفاوت آن با غیرقطبی معنی‌دار نبود. در حالی که مقایسه میانگین سلولی بلاستوسیست‌ها نشان داد که میانگین (Total cell number) TCN در گروه قطبی به

طور معنی‌داری بیش از گروه غیر قطبی است. محققین معتقدند که بالا بودن میانگین سلولی در بلاستوسیست نشانگر بالا بودن میزان تسهیلات اولیه در جنین بوده، چنین جنین‌هایی توان زیستی بالایی داشته و به دلیل تولید مایع بیش‌تر و کسب قطر مناسب و تولید فراوان Zonallysin¹، لانه‌گزینی بهتری دارند.

اوهیبی¹ و همکاران در سال 1990 سلول‌های پوششی لوله رحم گاو را بر روی Transwell با استفاده از محیط B₂ قطبی کردند و جنین‌های تک سلولی نوعی موش (سوئیس آلبینو موسوم به OP1) را روی آن کشت دادند و نتایج این محققین نشان داد که رشد و تکوین جنین‌ها با قطبی بودن سلول‌های Feeder بهبود نمی‌یابد (24). به عبارتی در سیستم‌های هم‌کشتی رشد جنین‌ها وابسته به قطبیت نیست. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که قطبیت سلول‌های Feeder در سیستم هم‌کشتی بر روند رشد و تکوین جنین تأثیرات مثبت اعمال می‌کند که این با نتایج اوهیبی و همکاران (1990) تناقض دارد. نکته‌ای که می‌بایست در اینجا به آن اشاره شود این است که با وجود این که ضرورت ماده خارج سلولی برای قطبی کردن سلول پوششی به اثبات رسیده، اوهیبی و همکاران (1990) از این ماده در محیط کشت سلول‌های پوششی استفاده نمودند و با کشت سلول پوششی بر روی Transwell و با تشکیل تک لایه سلولی و بدون ارزیابی قطبیت، از تک لایه

فوق برای هم‌کشتی استفاده کردند. در حالی که در کار حاضر سلول‌های پوششی بر روی ماده خارج سلولی کشت شده و قطبیت آن‌ها با روش میکروسکوپ الکترونی مورد تایید قرار گرفت. البته این تنها اختلاف کار حاضر با تحقیق اوهیبی و همکاران (1990) نبود و اختلافات دیگری از لحاظ گونه موش مورد استفاده (NMRI در مقابل OP1)، نوع سلول‌های قطبی (سلول‌های پوششی لوله رحم انسان در مقابل گاو)، نوع محیط کشت (DMEM/HAM'S F12 در مقابل B₂) و مرحله تکاملی جنین مورد استفاده در سیستم هم‌کشتی (جنین دو سلولی در مقابل جنین تک سلولی) وجود داشت که هر کدام از این عوامل بر روی رشد و تکوین جنین موش در سیستم هم‌کشتی تأثیر گذار است.

یکی از یافته‌های جالب مطالعه حاضر درصد‌های مشابه تعداد سلول ICM و TE در گروه‌های مختلف مورد مطالعه بود. در گروه مطالعه I از تعداد 121 سلول بلاستوسیست 81 درصد مربوط به TE و 19 درصد ICM بود؛ در حالی که در گروه شاهد با وجودی که تعداد سلول بلاستوسیست به طور معنی‌داری کمتر از گروه مطالعه I بود (تقریباً 73 سلول) درصد‌های TE (79 درصد) و ICM (21 درصد) تفاوت معنی‌داری با درصد‌های مشابه از گروه مطالعه I نداشتند. به نظر می‌رسد مکانیسم‌های تخصیص سلول به بخش‌های ICM و TE بلاستوسیست صرف نظر از میزان کل سلول تعداد سلول معینی برای بخش‌های مختلف جنین اختصاص می‌دهند. فریسور² و همکاران (1996) نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند (25).

به نظر می‌رسد دلیل معنی‌دار نبودن میزان درصد تشکیل بلاستوسیست در گروه‌های قطبی مطالعه حاضر، نوع محیط هم‌کشتی (DMEM/HAM'S F12) باشد. این محیط علی‌رغم این که محیط مناسبی برای کشت

2. frasor

1. Ouhibi

میان آن دو و قطع تماس، سبب کاهش اثرات هم کشتی خواهد شد (27). با توجه به این قضیه و با در نظر گرفتن این که در کشت بر روی ژل ECM سلول ها به صورت متراکم رشد می نمایند، در زمان هم کشتی هر جنین با تعداد زیادی سلول Feeder تماس پیدا کرده و احتمالاً تأثیرات بیش تری دریافت می نماید. در کشت قطبی سلول ها در مقایسه با غیر قطبی متراکم تر بوده و در نتیجه در زمان هم کشتی، هر جنین با تعداد بیش تری از سلول های سوماتیک تماس مستقیم برقرار می کند و احتمالاً تأثیرات بیش تری دریافت می نماید. نظریه دیگر احتمالاً ترشح گلیکوپروتئین توسط سلول های Feeder و نقش امبریوتروفیک آنها را مطرح می کند این نظریه از آن جا ناشی شده است که محیط جمع آوری شده از کشت سلول های Feeder، به اندازه سلول، رشد و تکوین جنین را بهبود بخشیده است. به عبارتی سلول های Feeder با رهاسازی مواد امبریوتروفیک به داخل محیط کشت و برداشت مواد سمی از آن به رشد و تکوین جنین کمک می نمایند (28، 29، 30). با توجه به فرا ساختار سلول های قطبی شده (رشد و توسعه ارگانل هایی نظیر دستگاه گلژی، شبکه اندوپلاسمی خشن و میتوکندری) به نظر می رسد این سلول ها پتانسیل ترشحی بیش تر و احتمالاً متفاوتی را در مقایسه با سلول های غیر قطبی دارند. البته در تحقیق حاضر ترشحات سلول ها مورد مطالعه قرار نگرفت ولی مطالعه محققین پیشین متفاوت بودن ترشحات سلول های قطبی شده را به اثبات رسانده است (21-31).

سلول های سوماتیک محسوب می شود، به دلیل فقدان فاکتورهای مورد نیاز، محیط مناسبی برای کشت جنین تلقی نمی شود. با این وجود با در نظر گرفتن تحقیقات پیشین، محیط DMEM/HAM'S F12 به عنوان محیط هم کشتی در نظر گرفته شد. در این ارتباط فریسور و همکاران (1996) دو محیط HTF (محیط جنینی) و MEM α (محیط سلول های سوماتیک) را در سیستم های هم کشتی مورد مقایسه قرار دادند و دریافتند که گروه MEM α ، 26 درصد بیش از گروه HTF جنین ها را به مرحله خروج از زونا می رساند (25). لذا این تفکر مطرح شد که در سیستم های هم کشتی، تامین نیازهای سلول های سوماتیک خود به خود سبب رشد و تکوین جنین خواهد شد. در مطالعه حاضر نیز با در نظر گرفتن این فرضیه و آزمون چندین محیط کشت (از جمله HTF MEM α , T6) محیط DMEM/HAM'S F12 به عنوان محیط هم کشتی انتخاب گردید در واقع این تنها محیطی بود که توانست سلول های Feeder را حمایت کند. البته این محیط توسط سایر محققین نیز به عنوان محیط هم کشتی مورد استفاده قرار گرفته است (26).

شاید بتوان در قالب مکانیسم های امبریوتروفیک سیستم های هم کشتی، تأثیرات مثبت سلول های قطبی شده را توضیح داد. در ارتباط با مکانیسم اثر سلول های Feeder در هم کشتی با جنین نظرات مختلفی ارائه شده است. یک نظر به این است که در سیستم هم کشتی سلول feeder با تماس مستقیم با جنین تأثیرات مثبت خود را اعمال می کند؛ به طوری که قرار دادن یک فیلتر

فهرست منابع

1. Whittingham DG. Development of zygots in cultured mouse oviducts. I. The effect of varying oviductal conditions. *J exp zool*. 1968; 169: 399-406.
2. Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in

- conditioned medium. *J Reprod. Fert.* 1989; 85: 715-720.
3. Gandolfi F, Moor RM. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod fert.* 1987; 81: 23-28.
 4. Krisher RL, Petters RM, Johnson BH, Archibong AE. Development of porcine embryos from the one-cell stage to blastocyst in mouse oviducts maintained in organ culture. *J exp zool.* 1989; 249: 235-239.
 5. Layranos TC, Seamark RF. Addition of steroids to embryo-uterine monolayer co-culture enhances embryo survival and implantation in vitro. *Reprod fertile Dev.* 1989, 41-46.
 6. Minami N, Bavister BD, Iritani A. Development of hamster two-cell embryos in the isolated mouse oviduct in organ culture system. *Gamete Res.* 1988; 19: 235-240.
 7. Sakkas D, Trounson AO, Kola I. In vivo cleavage rates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in co-culture with oviduct cells. *Reprod Fertile Dev.* 1989; 1: 127-136.
 8. Glasser SR, Julian J, Decker GL, et al. Development of morphological and functional polarity in primary cultures of immature rat uterine epithelial cells. *J cell Biol.* 1988; 107: 2409-2423.
 9. Jacobs AL, Decker GL, Glasser SR, Julian J, Carsen DD. Vectorial secretion of prostaglandin by polarized rodent uterine epithelial cells. *Endocrinology.* 1990; 126: 2125-2136.
 10. Mani SK, Decker GL, Glasser SR. Hormonal responsiveness by immature rabbit uterine epithelial cells polarized in vitro. *Endocrinology.* 1991; 128: 1563-1573.
 11. Schat ZF, Gordan RE, Laufer N, Gurpide E. Culture of human endometrial cells under polarizing Conditions *Differentiation.* 1990; 42: 184-190.
 12. Dickens CJ, Southgate J, Lees HJ. Use of primary culture of rabbit oviduct epithelial cells to study the ionic basis of tubal fluid formation. *J Reprod Fertile.* 1993; 98: 603-610.
 13. Hardley MA, Byers SW, Suarez-Quian CA, Kleinman HK, Dym M. Extracellular matrix regulates sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and yerm cell development in vitro. *J cell Biol.* 1985; 101: 1511-1522.
 14. Hardley MA, Djakiew D, Byers SW, Dym M. polarized secretion of androgen-binding protein and transferrin by sertoli cells grown in a bicameral culture system. *Endocrinology* 1987; 120: 1097-1103.
 15. Kleinman HK, Mc Garvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, et al. Basement membrane complexes with

- biological activity. *Biocheistry*. 1986; 25: 312-318.
16. Mohfondi A, Nicollier M, et al. Establishment at endometrial glandular epithelial cell snbculture in a serum free, hormonally etefined medium, on a basement membrane matrix. *Biol cell*. 1991; 171: 255-265.
 17. Joshi MS. Growth and differentiation of the cultured secretory cells of the cow oviduct on reconstituted basement membrane. *J Exp zool*. 1991; 260: 229-238.
 18. Pollard JW, Plantec. King WT. Hansen PJ and et al fertilizing capacity of bovine sperm may be maintarned by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 102-107.
 19. Sidhu KS, Mate KE, Rodger JC. Sperm-ovidnet epithelial cells monolayer co-culture: on in vitro model of sperm-female tract interactions in a marsnpial, the tamer wallaby (*macropns engenii*) *J Reprod*. 1998; 114: 55-61.
 20. Ellington JE, Jones AE, Davitt CM, et al. Human sperm function in co-culture with human macaque or bovine oviduct epithelial cells modeyers. *Hum Reprod*. 1998; 13: 2797-2804.
 21. Tomas PG, Ignotz GG, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP, Curre B. Isolation, Culture and characterization of equine oviduct epithelial cells in vito. *Mol Reprod Dev*. 1995; 41: 468-478.
 22. Thoua GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophoectoderm cells of mouse and bovine blastocysts *Reprod BIO Med online*, 2001/149 on web 17 June 2001.
 23. Hardy K, Handyside AH, Winston RM. The human blastocyst cell number, death and allocation during late preimplantation *development* in vitro. *Development* 1989; 107: 597-604.
 24. Ouhibi N, Hamidi J, Guillad J, Menezo Y. Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell support *Hum Reprod*. 1990; 5: 737-743.
 25. Frasor J, Sherbhn R, Soltes B, Molo MW, et al. Animal experimentation: optimizing tubal epithelial cells growth promotes mouse embryo hatching in co-culture. *J Assist Reprod Gen*. 1996; 13: 423-430.
 26. Freeman MR, Bastias MC, Hill GA, Osteen KG. Co-culture of mouse embryo with cells isolated from the human follicle oriduct and uterine endometrium. *Fertil steril*. 1993; 59: 138-142.
 27. Bongso A, Ng SN, Fong CY, Ratnam S. Co-culture:A new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil steril*, 1991; 56: 179-191.
 28. Myers MW, Broussard JR, Menezo Y, Prough SG, Blachwell J, Godke RA. Established cell lines and their conditioned

- media support bovine embryo development during in vitro Culture. *Hum. Reprod.* 1994; 9: 1927-1931.
29. Legge M, Sellens MH. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block on mouse embryo Culture. *Hum. Reprod* 1991; 6: 867-871.
30. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi Kishi J. Involvement of superoxide radicals in the mouse two cell block. *Mol. Reprod. Dev.* 1991; 28: 356-360.
31. Woldesenbet S, Newton GR. Comparison of proteins synthesized by polarized caprine oviductal epithelial cells and oviductal explants in vitro, *Theriogenology* 2003, 60: 533-543.