پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره شانزدهم شماره 51 فروردین و اردیبهشت سال 1385 (17-6)

تاثیر تک لایه‌های قطبی و غیر قطبی سلول های پوششی لوله رحم انسان بر تکوین جنین های دو سلولی موش

محمدرضا باغبان اسلامی نژاد(Ph.D.)* **مجتبی رضا زاده**(Ph.D.)**+

سعید کاظمی(Ph.D.)*** **پوپک افتخاری یزدانی**(Ph.D.)****

چکیده

سابقه و هدف : بهبود رشد وتکوین جنین پستانداران در محیط ازمایشگاهی 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) تأئید شد.آنگاه جنین‌های دو سلولی موش NMRI به روش Flushing تهیه شد و سیستم‌های هم‌کشتی آن با سلول‌های کشت یافته بر روی پلاستیک(غیرقطبی) و ژل ECM (قطبی) ایجاد گردید. رشد و تکوین جنین ها به‌طور روزانه و به مدت 96 ساعت در فرم‌های ویژه ای ثبت گردید ونتایج 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 گردیدو نتایج آن با استفاده از آزمون One-way ANOVA مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها : نتایج ایمنی-بافتی- شیمیایی نشانگرماهیت پوششی سلول‌های‌کشت یافته بود. مقاطع میکروسکوپ الکترونی قطبی بودن کامل سلول‌های کشت یافته بر روی ژل ECM را تأئید کرد. این سلول‌ها استوانه‌ای شکل بوده و بر روی غشاء پایه قرار داشتند و کمپلس اتصالی (به ویژه اتصال محکم) تشکیل شده بود؛ در حالی‌که سلول‌های کشت یافته بر روی پلاستیک (غیرقطبی) دوکی شکل بودند و اتصال شبه دسموزوم بین آن‌ها بر قرار بود. نتایج رشدو 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 غیرقطبی نشان دادکه سیستم قطبی از لحاظ درصد تشکیل بلاستوسیست تفاوت معنی‌داری با غیرقطبی ندارد. نکته حائز اهمیت پر سلول بودن بلاستوسیست‌های سیستم قطبی نسبت به غیرقطبی بود و ازاین لحاظ دو سیستم تفاوت معنی‌داری داشتند.

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

واژه‌های کلیدی : لوله رحم، سلول‌های پوششی

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

مقدمه

همواره سیستم‌های‌هم‌کشتی برای محققین درارتباط با درمان نازایی اهمیت فراوانی داشته و مطالعات متعدد، کارایی این سیستم‌ها را دربهبودجنبه‌های مختلف تکوین جنین به اثبات‌رسانده است.تا به‌حال سیستم‌های‌هم‌کشتی متنوعی طراحی شده و دراین میان، سیستم‌های هم‌کشتی با سلول‌های پوششی لوله رحم مورد توجه خاصی بوده است(7-1).هدف این سیستم‌ها، فراهم‌کردن محیط مشابه با لوله رحم درمحیط کشت بوده، به‌طوری‌که 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. معمولا 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(11-7) 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 (16-12). جوشی[1] 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 دیگرسلول‌های پوششی لوله رحم سایر حیوانات و نیز انسان را بر روی ژل ماده خارج سلولی یا ژل ECM(Extra cellular matrix) کشت دادند(23-17). در مورد تأثیر سلول‌های قطبی شده پوششی لوله رحم در سیستم‌های هم کشتی با جنین، گزارش‌ها بسیار اندک بوده و دراین رابطه می‌توان به مطالعه اوهیبی[2] وهمکاران (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 چنین سلول‌هایی تاثیری 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 هم‌کشتی با جنین‌موش ایجاد گردیده نتایج حاضر حاکی از تاثیرات مثبت سلول‌های پوششی قطبی شده لوله‌رحم در بهبود کیفیت بلاستوسیست‌های حاصل از تکوین جنین‌های موش بر روی آنها بود.

مواد و روش‌ها

-کشت سلول:

نمونه های 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 وکشت سلول پوششی انجام شد. بدین ترتیب که یک برش طولی در امتداد لوله رحم ایجادگردید ومخاط آن از لایه عضلانی جدا شد و به قطعات ریز تقسیم گردید. برای جدا سازی سلول از مخاط از روش آنزیمی استفاده گردید برای این منظور قطعات مخاطی به مدت یک ساعت و در دمای

1. Joshi

2. Ouhibi

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

اتاق درمعرض تریپسین نوع I0/5درصد(Sigma U.S.A) قرارگرفت. حاصل این‌هضم تحت1200دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب به‌دست آمده در داخل‌محیط (Dulbecp's modified eagls medium/ HAM's-F12,Sigma,USA) DMEM/ HAM's, F12 محتوی 10 درصد سرم (Fetal Calf serum, FCS) Gibco, Denmark) IU/ml 100 پنی‌سیلین و IU/ml 100 استرپتومایسین (Sigma U.S.A) معلق گردید. سپس سلول‌ها با غلظت 6×10^5 سلول در میلی‌لیتر بر سطح پلاستیک ظرف کشت شش خانه‌ای 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 Plate Insert (Sigma U.S.A) گسترانیده شد. Insert 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)وترانسفرین(Sigma;USA) هرکدام 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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

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 (Bar=1/6µm). (c) تصویر مقطع ظریف مقطع ظریف سلول کشت یافته بر روی پلاستیک(Bar=1/6µm). (d) تصویر مقطع ظریف سلول‌های کشت یافته بر حسب ژل ECM/ (Bar=200nm) مژک :C گرانول ترشحی :S (e) رنگ‌آمیزی افتراقی بلاستوسیست (توده سلولی داخلی: آبی رنگ، تروفواکتودرم: قرمز رنگ).

برای ارزیابی قطبیت سلول‌ها در زمان کشت برروی ژلECM 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 (1ساعت) به ترتیب فیکس اولیه و ثانویه شدند و آنگاه با درجات صعودی اتانول آبگیری گردیدند و مراحل آغشتگی را با استفاده از مخلوط 1:3، 1:1 ، 3:1 رزین و استون و رزین خالص طی کردند. درپایان 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 وایجاد سیستم هم کشتی:

سلول‌های‌پوششی به‌حالت‌قطبی وغیرقطبی به روشی که در بخش پیشین توضیح داده شد کشت گردیدند. یک هفته پس از آغاز کشت سلول‌ها سطح پلاستیک و ژل ECM را پرکردند. دراین زمان محیط سلول‌ها با DMEM/HAM'S-F12 حاوی 5 میلی‌گرم در میلی‌لیترBSA(Bonne serum albumin, sigma,USA) جایگزین شد. پس از 24 ساعت جنین‌های دو سلولی روی آن‌ها کشت گردید.

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

درمطالعه حاضرگروه‌های قطبی وغیرقطبی به‌ترتیب گروه مطالعه I و IIگروه محیط DMEM/HAM'S-F12 گروه شاهد در نظر گرفته شد. هر آزمایش هم کشتی 5 بار تکرار گردید. و در طی هم‌کشتی 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 بلاستوسیست‌آن‌هایی که فروریخته(Collapse) بودندبه‌عنوان دژنره در نظر گرفته شدند در انتهای دوره هم کشتی نتایج حاصل با روش آماری X^2 آنالیز شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

4- رنگ آمیزی تفکیکی بلاستوسیست ها :

درمطالعه‌حاضر،از هر گروه ، تعدادی بلاستوسیست به طور اتفاقی برای رنگ آمیزی تفکیکی دو بخش ICM (Inner cell mass) و TE (Trophoectoderm) انتخاب گردیدند. برای این منظور از روش رنگ آمیزی Thouas و همکاران استفاده گردید(23). برای رنگ‌آمیزی از محلول شماره یک شامل محیط MTF (Murine tubal bluid) 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 بنزمید 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 برروی آن قرار گرفت. بلاستوسیست‌های رنگ‌شده، توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به لامپ‌ماورا بنفش مورد مشاهده قرارگرفتند. با این روش توده سلول داخلی آبی رنگ و تروفواکتوُرم 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

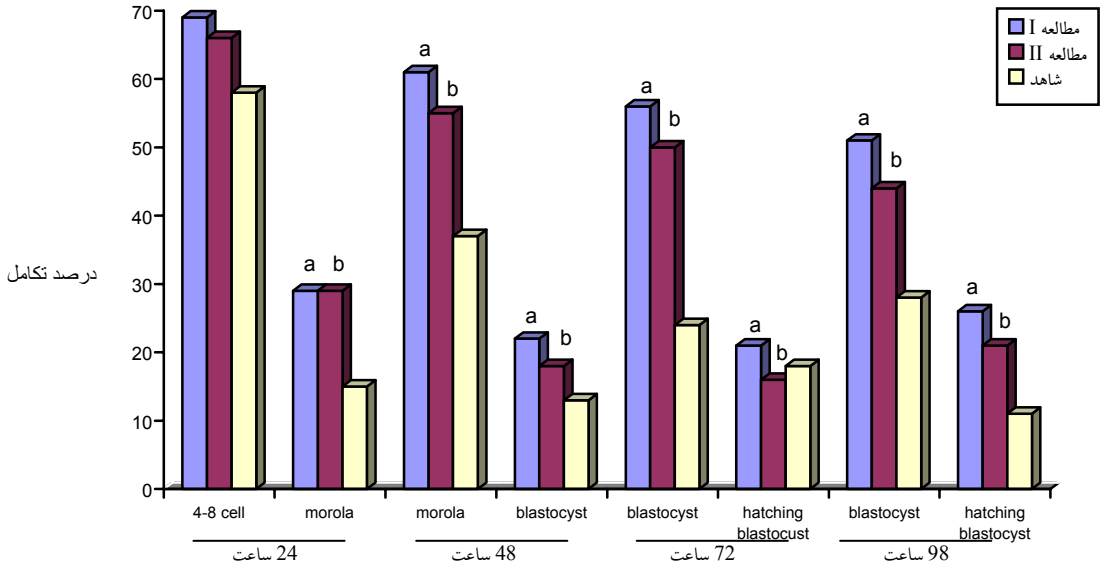
1- فراساختار

سلول‌های کشت یافته بر روی ژل ECM درمقاطع میکروسکوپی استوانه‌ای شکل ظاهرشدند. این سلول‌ها بر روی لایه نازکی از غشاء پایه قرار داشتند و در سطح آزاد آن‌ها میکرویلی فراوان بود ولی مژک به ندرت مشاهده شد. دو سلول مجاور با کمپلس اتصالی به‌هم متصل بودند. هسته تقریبا 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 ومخازن 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 وکشیده ظاهر شدند. هسته در ضخیم ترین بخش سلول واقع بوده، قسمت اعظم آن را اشغال می‌کرد و در دو طرف آن سلول به شکل نوار باریکی به طرفین امتداد می یافت و بین دو سلول مجاور اتصال محکم بر قرار نبود(شکل 1 ، c).

2- هم کشتی:

در مجموع 363 جنین دو سلولی موش‌نژاد NMRI با پنج با ر 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 1و2 آمده است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

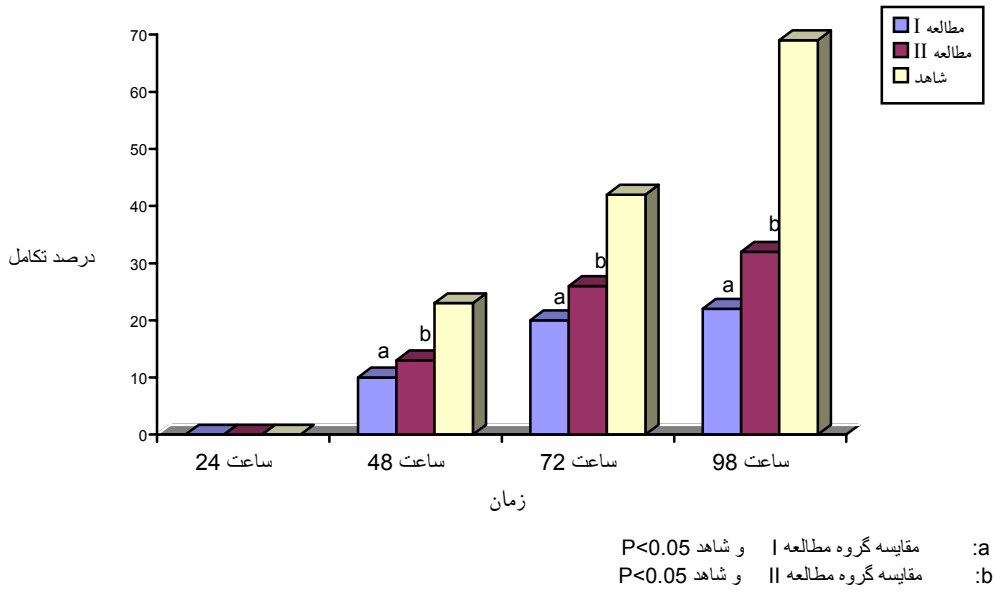


a: مقایسه گروه مطالعه I و شاهد $P<0.05$

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

نمودار شماره 1 : مقایسه تکوین جنین‌های دو سلولی موش در گروه‌های هم‌کشتی لوله رحم و گروه شاهد

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]



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

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

ب) ساعت 48 هم کشتی: برخی ازجنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند و نیز درصد مورلا 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 درگروه مطالعه II حدود 19/41درصد جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند که در مقایسه با درصد بلاستوسیست گروه شاهد تفاوت معنی دار نبود. از نظر دژنراسیون جنین‌ها، گروه مطالعه I با 11درصد کم‌ترین دژنراسیون را داشت از این نظر با گروه مطالعه II تفاوت معنی دار نبود ولی در مقایسه با شاهد این تفاوت معنی‌دار بود(P<0.05). همچنین درصد دژنراسیون جنین در گروه مطالعه II کمتر از شاهد بود (P<0.05).

ج) ساعت 72 هم کشتی: 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 معنی‌دار نبود ولی تفاوت آن با گروه شاهد معنی‌دار بود (به ترتیب P≤0.001 وP<0.05) گروه مطالعه II به نوبه خود در مقایسه با شاهد درصد بیشتری از جنین‌ها را به مرحله تکاملی بلاستوسیست وبلاستوسیست در حال خروج از زونا رسانده بود (بدون تفاوت آماری). از نظر درصد دژنراسیون، بیش‌ترین میزان در گروه شاهد (43/12

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

درصد) و کم‌ترین در گروه مطالعهI (22درصد) اتفاق افتاده بود و تفاوت معنی‌دار 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 ازگروه مطالعهII بود با این وجود تفاوت معنی‌دار 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 ($P\leq0.001$) و بلاستوسیست در حال خروج از زونا ($P<0.05$) رسانده بودند. کم‌ترین دژنراسیون در گروه مطالعهIاتفاق افتاده بود که از این نظر با گروه مطالعه II تفاوت معنی‌دار نبود ولی با گروه شاهد تفاوت آن چشمگیر بود.

3- میانگین های سلولی بلاستوسیست:

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 مطالعهII، 101/86±26/35 سلول تفاوت معنی‌دار 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 درصدICM و TE،بین گروه ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

جدول شماره 1:میانگین سلولی بلاستوسیست های حاصل از تکوین جنین های دو سلولی موش در گروه های لوله رحم و شاهد

گروه	تعداد جنین	میانگین کل	ICM میانگین درصد	TE میانگین درصد
قطبی لوله رحم	14	35/ 59 ±121/14[ac]	3/04 ±19/26	5/60 ±80/74
غیرقطبی لوله رحم	15	26/35 ±101/86[b]	3/58 ±19/45	3/58 ±80/55
کنترل	15	18/36 ±73/46	4/73 ±21/49	4/73 ±78/51

a :مقایسه قطبی با شاهد($p<0.005$) ، b :مقایسه غیر قطبی با شاهد($p<0.005$)
c :مقایسه قطبی با غیر قطبی($p<0.05$)

بحث

پولارد[1] 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 34/4درصد اسپرم ها به مدت 48 ساعت توان حرکتی خود را حفظ کردند؛ در حالی که در گروه غیر قطبی، این میزان 0/8درصد 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 سال1990 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 حالی‌که بر اساس نتایج تحقیق حاضربه نظرمی‌رسد حفظ قطبیت سلول‌های پوششی در سیستم هم‌کشتی برای بهبود رشد و تکوین جنین ضروری باشد. اگر دو پارامتر درصد تشکیل بلاستوسیست و تعداد سلول بلاستوسیست‌های حاصل را به عنوان دو شاخص مهم ارزیابی نتایج سیستم هم کشتی در نظر بگیریم براساس نتایج مطالعه حاضر، سلول‌های قطبی شده هر دو شاخص را بهبود می‌دهند. ولی مطالعات آماری نشان داد که

1. Pollard

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

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 حالی‌که 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 Zonalysin ، لانه گزینی بهتری دارند.

اوهیبی[1] و همکاران درسال1990 سلول‌های پوششی لوله رحم گاو را بر روی Transwell با استفاده از محیط B_2 قطبی کردند و جنین های 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 هم کشتی رشد جنین‌ها وابسته به قطبیت نیست.باتوجه به‌نتایج مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد که قطبیت سلول‌های Feeder درسیستم هم‌کشتی بر روند رشد و تکوین جنین تاثیرات مثبت اعمال می کند که این با نتایج اوهیبی و همکاران (1990) تناقض دارد. نکته‌ای که می‌بایست در اینجا به آن اشاره شود این است که با وجود این‌که 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 ننمودند و با کشت سلول پوششی برروی Transwell و با تشکیل تک لایه سلولی و بدون ارزیابی قطبیت، از تک لایه فوق برای هم کشتی استفاده کردند. در حالی‌که در کار حاضر سلول‌های پوششی برروی 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 درمقابل OP1)، نوع سلول‌های قطبی (سلول‌های پوششی لوله رحم انسان درمقابل گاو)، نوع محیط‌کشت (DMEM/HAM'S F12 در مقابل B_2) و مرحله تکاملی جنین مورد استفاده در سیستم هم کشتی (جنین دو سلولی در مقابل جنین تک سلولی) وجود داشت که هر کدام از این عوامل بر روی رشد و تکوین جنین موش درسیستم هم‌کشتی تاثیرگذار است.

یکی از یافته‌های جالب مطالعه حاضر درصدهای مشابه تعداد سلول ICM وTE در گروه‌های مختلف مورد مطا لعه بود. در گروه مطالعه I از تعداد 121 سلول بلاستوسیست 81 درصد مربوط به TE و 19درصد ICM بود؛ در حالی‌که در گروه شاهد با وجودی‌که تعداد سلول بلاستوسیست به طور معنی داری کمتر از گروه مطالعه I بود(تقریبا 73سلول) درصدهای TE (79درصد) و ICM (21درصد) تفاوت معنی‌داری با درصدهای مشابه از گروه مطالعهI نداشتند. به نظر می‌رسد مکانیسم‌های تخصیص سلول به بخش‌های ICM وTE بلاستوسیست صرف نظر از میزان کل سلول تعداد سلول معینی برای بخش‌های مختلف جنین اختصاص می‌دهند. فریسور[2] 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 هم کشتی(DMEM/HAM'S F12) باشد. این محیط علی‌رغم این‌که محیط مناسبی برای کشت

1.Ouhibi

2. frasor

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

سلول‌های سوماتیک محسوب می‌شود، به‌دلیل فقدان فاکتورهای مورد نیاز، محیط مناسبی برای کشت جنین تلقی نمی‌شود. 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 MEMα (محیط سلول‌های سوماتیک) را در سیستم‌های هم‌کشتی مورد مقایسه قرار دادند و دریافتند که گروه MEMα، 26درصد بیش از گروه HTF جنین‌ها را به مرحله خروج از زونا می‌رساند(25). لذا این تفکر مطرح شد که در سیستم‌های هم‌کشتی، تامین نیازهای سلول‌های سوماتیک خودبه‌خود سب رشد و تکوین جنین خواهد شد. در مطالعه حاضر نیز با در نظر گرفتن این فرضیه و آزمون چندین محیط کشت (از جمله MEMα , T6 HTF) محیط DMEM/HAM'S F12 به عنوان محیط هم‌کشتی انتخاب گردید در واقع این تنها محیطی بود که توانست سلول‌های 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 مکانیسم‌های امبریو تروفیک سیستم‌های هم‌کشتی، تاثیرات مثبت سلول های قطبی شده را توضیح داد.در ارتباط با مکانیسم اثر سلول‌های Feeder در هم کشتی با جنین نظرات مختلفی ارائه شده است.یک نظر یه این است که در سیستم هم کشتی سلول feeder با تماس مستقیم با جنین تاثیرات مثبت خود را اعمال می‌کند؛ به‌طوری‌که قرار دادن یک فیلتر میان آن دو و قطع تماس، سبب کاهش اثرات هم‌کشتی خواهد شد(27).با توجه به این قضیه و با در نظر گرفتن این‌که در کشت بر روی ژل ECM سلول ها به‌صورت متراکم رشد می‌نمایند، در زمان هم کشتی هر جنین با تعداد زیادی سلول Feeder تماس پیدا کرده و احتمالاً تاثیرات بیش‌تری دریافت می‌نماید. در کشت قطبی سلول‌ها در مقایسه با غیر قطبی متراکم تر بوده و در نتیجه در زمان هم کشتی، هر جنین با تعداد بیش‌تری از سلول‌های سوماتیک تماس مستقیم برقرار می‌کند و احتمالاً تاثیرات بیش‌تری دریافت می‌نماید. نظریه دیگر احتمال ترشح گلیکوپروتئین توسط سلول‌های Feeder و نقش امبریوتروفیک آنها را مطرح می‌کند این نظریه از آن‌جا ناشی شده است که محیط جمع آوری شده از کشت سلول‌های Feeder، به اندازه سلول، رشد و تکوین جنین را بهبود بخشیده است. به عبارتی سلول‌های Feeder با رهاسازی مواد امبریوتروفیک به داخل محیط کشت و برداشت مواد سمی از آن به رشد و تکوین جنین کمک می‌نمایند(30، 29، 28).با توجه به فرا ساختار سلول‌های قطبی شده (رشد و توسعه ارگانل‌هایی نظیر دستگاه گلژی، شبکه اندوپلاسمی خشن و میتوکندری) به نظر می‌رسد این سلول ها پتانسیل ترشحی بیش‌تر و احتمالاً متفاوتی را در مقایسه با سلول‌های غیر قطبی دارند. البته در تحقیق حاضر ترشحات سلول‌ها مورد مطالعه قرار نگرفت ولی مطالعه محققین پیشین متفاوت بودن ترشحات سلول‌های قطبی شده را به اثبات رسانده است(21،31).

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

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, Johnoson 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 Fertil*** 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, Deker 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 Fertil***. 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 cnltnre system. ***Endocrinology*** 1987; 120: 1097-1103.
15. Kleinman HK, Mc Garvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, et al. Basement lnem brane complexes mith

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

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-ovidnct 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 macaqne 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 techniqne 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]

media support bovine embryo development during in vitro Culture. ***Hum. Reprod***. 1994; 9: 1927-1931.

29. Legge M, Sellens MH. Free radical scarengers ameliorate the 2-cell block on mouse embryo Culture. ***Hum. Reprod*** 1991; 6: 867-871.
30. Noda Y, Matsumto H, Umaoka Y, Tatsumik 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 protein s synthesized by polarized caprine oviductal epithial cells and oviduntal explants in vitro,***Theriogenology*** 2003, 60: 533-543.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-07]