

تأثیر سلولهای قطبی شده رحم بر تکوین جنینهای موش و میزان سلول بلاستوسیستهای حاصل از هم کشتی

محمد رضا باغبان اسلامی نژاد Ph.D.*، مجتبی رضازاده Ph.D.*، سعید کاظمی آشتیانی Ph.D.*
پوپک افتخاری یزدی Ph.D.*

* پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

پست الکترونیک: [Email:info@royaninstitute.org](mailto:info@royaninstitute.org)

چکیده

دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۱۱/۱۸، پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۲/۱۰

*** هدف:** بررسی رشد و تکوین جنینهای دوسلولی موش بر روی تک لایه‌های قطبی شده سلولهای پوششی رحم انسان
*** مواد و روشها:** برای این تحقیق بافت اندومترיום انسانی از بیماران هیستریکتومی شده تهیه گردید و سلولهای پوششی آن با استفاده از کلاناز ۰/۲۵ درصد (نوع I) جدا و بر روی ژل (ECM: Extracellular Matrix) به حالت قطبی و سطح پلاستیک به حالت غیرقطبی کشت شد. پس از تایید ماهیت پوششی سلولهای کشت شده روی پلاستیک با استفاده از ایمنووهیستوشیمی و قطبی بودن سلولهای کشت شده روی ژل ECM با روش میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission) جنینهای دوسلولی موش بر روی تک لایه‌های قطبی و غیرقطبی کشت گردید و میزان تکوین به طور روزانه ثبت و باروشهای آماری تجزیه و تحلیل شد. در پایان کشت، تعدادی بلاستوسیست به صورت کاملاً اتفاقی انتخاب و با روش افتراقی رنگ آمیزی و میانگینهای سلولی با روشهای آماری مقایسه گردید.
*** یافته‌ها:** مشاهده مقاطع میکروسکوپ الکترونی نشان داد که سلولهای کشت شده روی ژل ECM استوانه‌ای شکل و کاملاً قطبی هستند، در حالی که سلولهای کشت شده روی پلاستیک، پهن و دوکی شکل می‌باشند. نتایج هم کشتی حاکی از آن بود که جنینهای دوسلولی کشت شده روی تک لایه‌های قطبی در مقایسه با غیرقطبی در تمام مدت ۹۶ ساعت کشت، تکوین بیشتری دارند به طوری که در پایان روز چهارم در گروه قطبی تشکیل بلاستوسیست ۸/۵ درصد بیش از گروه غیرقطبی بود با این وجود تفاوتها از لحاظ آماری معنی دار نبود. نکته حائز اهمیت تعداد سلول بلاستوسیستهای حاصل از تکوین جنینهای دو سلولی بر روی تک لایه‌های قطبی بود. این جنینها به طور معنی داری تعداد بلاستومر بیشتری در مقایسه با جنینهای کشت شده بر روی تک لایه‌های غیرقطبی داشتند.
*** نتیجه گیری:** روی هم رفته به نظر می‌رسد که سلولهای قطبی از لحاظ افزایش تعداد سلول و احتمالاً بهبود کیفیت بلاستوسیست به رشد و تکوین جنین کمک می‌نمایند.

کل واژگان: سلولهای قطبی شده، اپی تلیوم آندومترיום، تکوین جنین موش

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

مقدمه

آزمایشگاهی محسوب می‌شوند در چنین سیستمهایی جنین به خوبی رشد کرده و به مرحله بلاستوسیست و بلاستوسیست در حال خروج از زونا می‌رسد (۱۱). با وجود اثبات تاثیرات مثبت سیستمهای هم کشتی، هنوز هم مکانیسم عملکرد آنها تا حدود زیادی ناشناخته باقی مانده است. در این ارتباط برخی از محققین معتقدند که سلولهای هم کشتی با ترشح مواد امبریوتروفیک (۱۲) و برداشت مواد امبریوتوکسیک (۱۳) به تکوین جنین کمک می‌کنند. Bongso و همکاران معتقدند که تماس بین سلول هم کشتی و جنین برای برقراری ارتباط سلولی به منظور انتقال فاکتورهای امبریوتروفیک نیز ضرورت دارد (۱۴).

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

جنین در بدن مادر توسط سلولها و مایع لوله رحمی و رحم تغذیه می‌شود (۱، ۲). کشت آن در محیط آزمایشگاهی، در واقع به مفهوم محرومیت از محیط مادری و مایعات مغذی آن است (۳، ۴). با وجود این، کشت جنین پستانداران در محیط آزمایشگاهی امکان پذیر بوده ولی تکوین آن در چنین شرایطی از لحاظ میزان تکوین (۵، ۶، ۷)، تعداد سلول (۶) پارامترهای بیوشیمیایی گوناگون (۸) و میزان توان زیستی پس از انتقال از سطح پایین تری نسبت به محیط بدن برخوردار است. تلاشهای زیادی در جهت بهبود شرایط انجام گرفته است که از جمله می‌توان به دست کاری محیطهای کشت از لحاظ الکترولیتی و منابع انرژی اشاره کرد ولی این تلاشها موفقیت کمتری در پی داشته است (۹، ۱۰). راه دیگر برای بهبود شرایط، هم کشتی است که دراصل نوعی شبیه سازی محیط امبریوتروفیک دستگاه تناسلی مادر در محیط

میلی لیتر استرپتوما سین، ۱۰۰ واحد بین المللی در هر میلی لیتر پنی سیلین (Sigma USA)، ۵ درصد (FCS: Fetal Calf Serum, Gibco)، ۱۰ نانوگرم در هر میلی لیتر (EGF: Epidermal Growth Factor; Sigma USA) ۱۰ میکرو لیتر بر میلی گرم رتینوییک اسید به حالت معلق در آورده شد و سپس داخل Millicell CM Insert (Sigma) پوشیده شده با ژل ECM کشت شد. به هر Insert، بخش اپی تلیال به اندازه ای اضافه شد که ۳۰ درصد سطح آن را بپوشاند. همچنین سوسپانسیون محتوی غدد اندومتریومی در داخل دیشهای ۲۴ چاهکی از جنس پلیاستیک polystyrene کشت گردید. محیط سلولها هر ۳ روز یک بار عوض شد.

آماده سازی برای مطالعه میکروسکوپ الکترونی گذاره

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

ایمونوهیستوشیمی

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

به منظور رنگ آمیزی ابتدا پراکسید داخلی سلولها با استفاده از peroxidase block به مدت ۵ دقیقه مهار گردید. سپس سلولها با آنتی بادی اولیه (سائتوکراتین ۷)، رقیق شده به نسبت یک به پانزده با فرفر ۰/۰۵ مولار Tris-Hcl به مدت ۳۰ دقیقه رنگ شدند. آن گاه پلی مر نشان دار شده با پراکسیداز حاوی آنتی بادی ثانویه اثر داده شد (۳۰ دقیقه) و در پایان DAB substrate chromogen به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه استفاده شد که در اثر آن رسوب قهوه ای رنگ در سیتوپلاسم ظاهر گردید. هسته سلولها با هماتوکسیلین به مدت ۲ دقیقه رنگ شد (شکل ۱ا).

جنین و همکشتی

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

از دست رفتن قطبیت ساختاری و عملکرد متمایز سلول می گردد (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸). در چنین شرایطی سلول کشت یافته، شکل مکعبی خود را از دست داده و پهن می شود و اتصالات محکم از دست می رود. از سوی دیگر، محققین نشان داده اند که چنانچه شرایط کشت بر اساس دو ویژگی محیط *in vivo* سلولهای پوششی طراحی شود، سلول پوششی قطبیت و عملکرد خود را حفظ می نماید. این دو ویژگی عبارتند از: تغذیه از راه سطح قاعده ای - جانبی و تماس با ماده خارج سلولی (۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲). با به کارگیری این شرایط، Classen-Linke و همکاران در سال ۱۹۹۷، سلولهای پوششی رحم انسان را به حالت قطبی کشت دادند. مطالعه این محققین نشان داد که تحت چنین شرایطی فیزیولوژی سلولهای کشت یافته مشابه با حالت *in vivo* حفظ می گردد (۲۳).

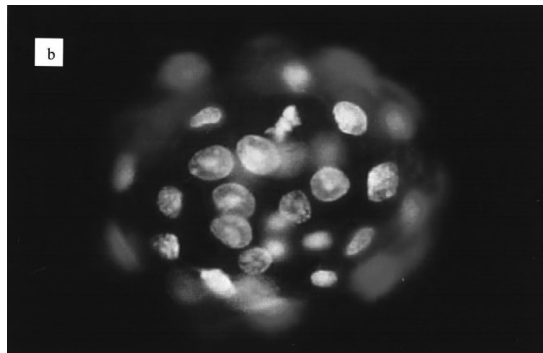
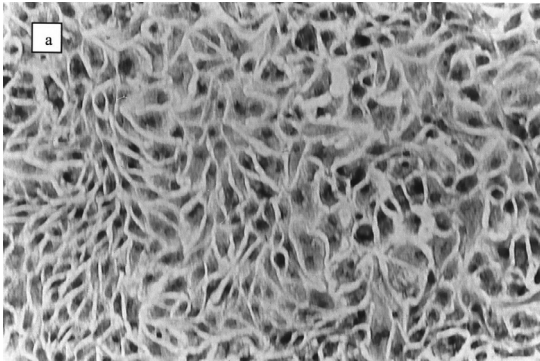
تا به حال چندین گزارش نشان داده است که حفظ قطبیت سلولهای پوششی در طی هم کشتی با اسپرم سبب بهبود حرکت و ظرفیت لقاحی اسپرم می گردد (۲۴، ۲۵، ۲۶). ولی اطلاعات در ارتباط با تاثیر هم کشتی این سلولها بر جنین بسیار اندک است و به همین دلیل، ما تصمیم گرفتیم با قطبی کردن سلولهای پوششی رحم انسان بر روی ژل ECM، تاثیر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

مواد و روشها

کشت سلول

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

برای جداسازی سلولهای پوششی اندومتریوم، قطعات بافتی درون آنزیم کلاژناز نوع I (۲۵/۰ درصد) قرار گرفت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه شد. در اثر عمل آنزیم، غدد اندومتریوم از بافتهای اطراف جدا گردیده، داخل محلول آنزیمی شناور شدند. برای جداسازی بخش اپی تلیال از بافت هضم نشده، تکنیک *unit gravity sedimentation* استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا محلول فوق به لوله های ۱۵ سی سی منتقل شد و سپس محتویات لوله هم زده شد و به صورت عمودی قرار گرفت. پس از ۴۰ ثانیه، ۲/۳ بالایی محلول (حاوی بخش اپی تلیال) به لوله نو انتقال یافت و ۱/۳ پایینی آن (حاوی بافت هضم نشده) دور ریخته شد. محلول حاوی بخش اپی تلیالی سانتریفوژ شد و رسوب سلولی حاصل در داخل محیط DMEM/HUMAN'S F12 محتوی ۱۰۰ واحد بین المللی در هر



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

یافته‌ها

کشت سلول

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

فراساختار

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

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

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

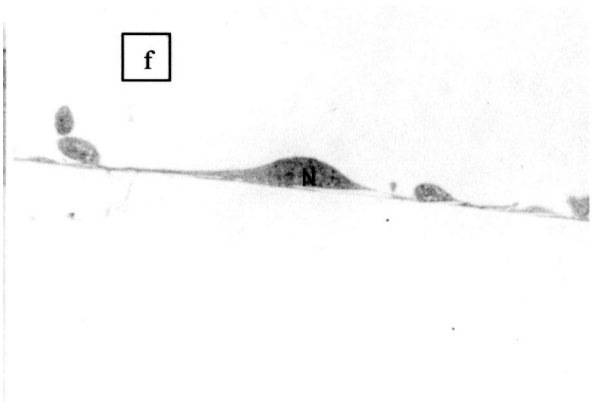
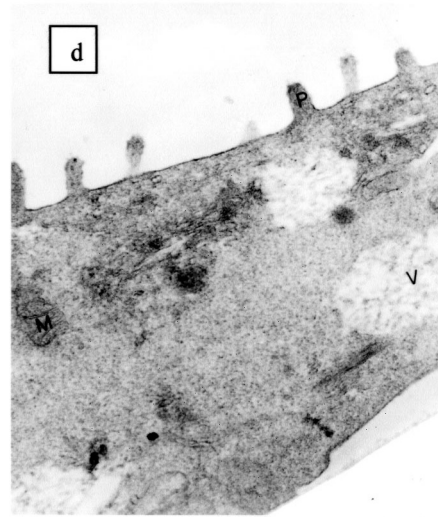
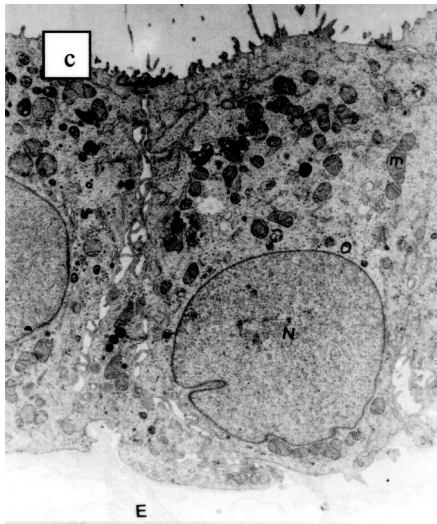
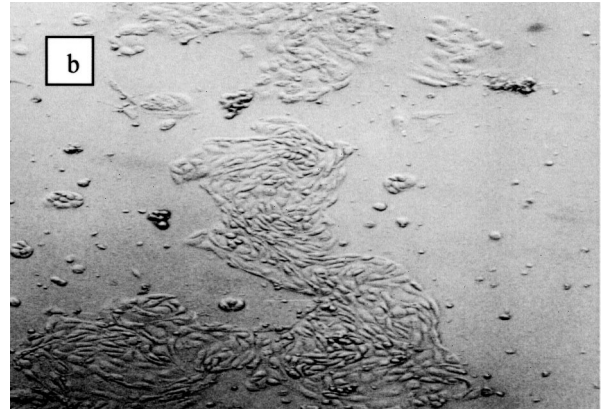
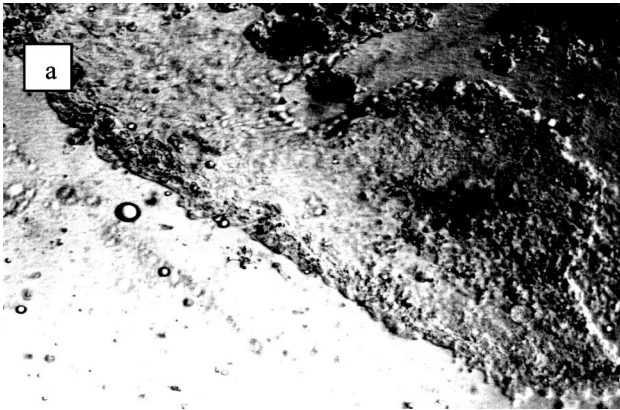
در تحقیق حاضر، هر آزمایش هم کشتی ۵ بار تکرار شد. در طی هم کشتی، میزان تکوین تا مراحل بالاتر، هر ۲۴ ساعت به مدت ۹۶ ساعت مورد مشاهده قرار گرفته و در فرمهای ویژه‌ای ثبت شد.

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

رنگ آمیزی افتراقی بلاستوسیستها

در پایان دوره کشت تعدادی بلاستوسیست به طور اتفاقی انتخاب شدند و با روش Thouas و همکاران به صورت افتراقی رنگ آمیزی گردیدند (۲۸). بدین ترتیب که ابتدا بلاستوسیست در داخل ۵۰۰ میکرولیتر محلول شماره یک «محیط MTF: Murine Tubal Fluid» حاوی ۱ درصد triton x-100 و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پروپیدویوم یسید» به مدت ۱۰ ثانیه قرار گرفت و سپس به داخل ۵۰۰ میکرولیتر محلول شماره دو (محلول فیکساتیو اتانول خالص محتوی ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر بیس بنز آمید یا هوخست ۳۳۲۵۸) منتقل شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت باقی ماند و آنگاه داخل یک قطره گلیسرول قرار گرفته و بر روی یک لام چسبانده شد و توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به لامپ ماوراء بنفش و فیلترهای excitation (۴۶۰ نانومتر برای آبی و قرمز و ۵۰۰ نانومتر برای قرمز) مشاهده شد و سلولهای آن شمارش گردید. با این روش توده سلولی داخلی آبی رنگ و تروفوکتودرم قرمز رنگ شد (شکل ۱b).

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



شکل ۲: (a) فتومیکروگراف سلولهای کشت یافته بر روی ژل ECM و (b) پلاستیک پلی استیرن. میکروسکوپ فازکنتراست، بزرگنمایی ۱۰۰ (c) الکترون میکروگراف سلولهای کشت یافته بر روی ژل ECM بزرگنمایی $\times 3000$ و (d) پلاستیک پلی استیرن، بزرگنمایی $\times 20000$ (e) فتومیکروگراف سلولهای کشت یافته بر روی ژل ECM و (f) پلاستیک پلی استیرن، رنگ آمیزی تولوئیدین بلو، بزرگنمایی $\times 1000$

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

گروه	تعداد جنین	۲۴ ساعت			۴۸ ساعت			۷۲ ساعت			۹۶ ساعت		
		تاریخه	مورولا	پلاستوسیت	تاریخه	مورولا	پلاستوسیت	تاریخه	مورولا	پلاستوسیت	تاریخه	مورولا	پلاستوسیت
کنترل	۱۲۴	۰ (۰)	۲۱ (۱۶/۹۳)	۷۲ (۵۸/۰۶)	۲۷ (۲۱/۷۷)	۱۸ (۱۴/۵۱)	۴۲ (۳۴/۶۷)	۲۳ (۲۶/۶)	۸ (۶/۴۵)	۵۶ (۴۵/۱۶)	۲۰ (۱۶/۱۲)	۱۵ (۱۲/۰۹)	۸۹ (۷۱/۷۷)
آزمون I	۱۰۶	۰ (۰)	۲۵ ^a (۳۳/۰۱)	۷۱ (۶۶/۹۸)	۱۳ (۱۲/۲۶)	۲۳ (۲۱/۶۹)	۵۵ ^a (۵۱/۸۸)	۵۶ ^b (۵۲/۸۳)	۱۹ ^a (۱۷/۹۲)	۲۴ ^b (۲۲/۶۴)	۴۴ ^b (۴۱/۵۰)	۳۲ ^b (۳۰/۱۸)	۳۰ ^b (۲۸/۳۰)
آزمون II	۱۰۹	۰ (۰)	۳۲ ^c (۲۹/۳۵)	۶۸ (۶۲/۳۸)	۱۶ (۱۴/۶۷)	۲۲ (۲۰/۱۸)	۵۴ ^c (۴۹/۵۴)	۵۲ ^d (۴۷/۷۰)	۱۷ ^c (۱۵/۵۹)	۳۱ ^c (۲۸/۴۴)	۳۹ ^d (۳۵/۷۷)	۳۰ ^c (۲۷/۵۲)	۴۰ ^d (۳۶/۶۹)

ارقام داخل پیرانتز به درصد بیان شده است.

آزمون I: قطبی رحم، آزمون II: غیرقطبی رحم، کنترل: DMEM/Hams F12
 a: آزمون I و کنترل (P<۰/۰۵)، b: مقایسه آزمون I و کنترل (P<۰/۰۰۱)، c: مقایسه آزمون II و کنترل (P<۰/۰۵)، d: مقایسه آزمون II و کنترل (P<۰/۰۰۱)

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

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

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

قطبی بیش از گروه غیرقطبی بود ولی تفاوت معنی‌دار نبود (جدول ۱). نتایج شمارش سلولی نشان داد که بلاستوسیت تکوین یافته در گروه قطبی و غیرقطبی بیش از گروه کنترل سلول دارد این تفاوت معنی‌دار بود (به ترتیب P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۰۵) همچنین از این لحاظ، گروه قطبی در مقایسه با گروه غیرقطبی بهتر عمل کرد و تعداد سلول بلاستوسیت‌های حاصل از گروه قطبی به طور معنی‌داری بیش از غیرقطبی بود (P<۰/۰۵). میانگین درصد تروفواکتودرم در گروه قطبی بیش از دو گروه دیگر بود ولی تفاوتها معنی‌دار نبود (جدول ۲).

بحث

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

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

سلولهای کشت یافته بر روی پلاستیک (سلولهای غیرقطبی) در مقاطع تهیه شده، دوکی شکل ظاهر شدند (شکل ۲f). این سلولها تنها چند زایده راسی کوتاه داشتند (شکل ۲d). امتداد دو سلول مجاور روی هم قرار گرفته و در بعضی موارد اتصالات شبیه دسموزوم برقرار بود. اتصال محکم بین دو سلول مشاهده نشد. هسته سلولها نسبتا بزرگ بود و بخش عمده سلول را اشغال می‌کرد. سیتوپلاسم سلولهای غیرقطبی اندک بوده و ارگانل زیادی در آن مشاهده نشد و تنها چند میتوکندری و rER و واکونولهای نسبتا درشت وجود داشت (شکل ۲d).

هم‌کشتی

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

فاصله دو سلول مجاور، استقرار قاعده‌ای هسته و تشکیل میکروویلی در سطح راسی سلولهاست. با در نظر گرفتن این معیارها، تصاویر مقاطع ظریف ما نشانگر قطبی بودن سلولهای کشت شده بر روی ژل ECM بود.

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

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

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

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

ارزیابی قطبیت سلول با استفاده از میکروسکوپ الکترونی Transmission توسط سایر محققین نیز انجام گرفته است (۱۷، ۳۵). یکی از نشانه‌های قطبیت در سطح فراساختاری، وجود اتصال محکم در مرز میان غشا راسی و جانبی سلول است. Vega Salas و همکاران اعتقاد دارند که تعامل میان ماده خارج سلولی و سلول پوششی سبب توزیع متفاوت پروتئینها در سطوح تماسی (contacting) و غیرتماسی Non contacting سلول می‌شوند (۳۶). همچنین این تعاملها محور قطبیت قاعده‌ای راسی (apical-basal axis of polarity) را تعریف می‌کند که از نشانه‌های آن محل قرارگیری اتصال محکم در مرز میان غشاهای جانبی و راسی است. اعتقاد بر این است که این اتصال از اختلاط پروتئینهای ویژه domainهای مختلف غشایی ممانعت به عمل می‌آورد. از دیگر نشانه‌های قطبیت سلول در سطح فراساختاری، کاهش

ترشحات سلولهای قطبی شده لوله رحم در مقایسه با غیرقطبی آن متفاوت است (۴۳). همچنین Woldesenbet و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داده‌اند که سلولهای قطبی شده لوله رحم بز، ترشحات مشابهی با قطعات بافتی کشت شده دارند (۴۴). نکته دیگر در ارتباط با مکانیسم تاثیر سلولهای قطبی شده، نقش تاثیرات مثبت تماس مستقیم سلولهای هم‌کشتی با جنین است. قطع این تماس تاثیرات مثبت هم‌کشتی را کاهش می‌دهد. درکشت قطبی به دلیل اینکه سلولها در مقایسه با غیرقطبی مترکم‌تر هستند، هر جنین با تعداد بیشتری از سلولها در تماس است و شاید تاثیرات بیشتری دریافت می‌کند. به هر حال تعیین دقیق نوع، میزان ترشحات سلولهای قطبی شده و نیز ارتباط بین میزان سطح تماس جنین و سلول قطبی با افزایش سلولاریتی بلاستوسیست به مطالعه بیشتری نیاز دارد.

تقدیر و تشکر

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



References

1. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM: Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985;44: 493-498
2. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA: Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 1972; 30: 493-497
3. Neider GL, Macon GR: Uterine and oviductal protein secretion during early pregnancy in the mouse. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 287-29.
4. Leese, HJ: The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil* 1988; 82: 283-856
5. Bowman P, McLaven A: Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. *J Embryol Exp Morphol* 1970; 24: 203-207
6. Harlow GM, Qinn P: Development of preimplantation mouse embryo in vivo and invitro. *Aust J Biol Sci* 1982; 35: 187-193
7. Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD: Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod* 1994; 50:1027-1033
8. Jung T, Fisher B: Correlation between diameter and DNA or protein synthetic activity in rabbit blastocyst. *Biol Reprod* 1988; 39: 1111-1116
9. Carney EW, Foote RH: Effects of super ovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 543-551
10. Fitzgerald L, Di Mattina M: Improved medium for

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

به نظر می‌رسد که تاثیرات مثبت سلولهای قطبی بر تکوین جنین موش که به شکل افزایش میانگین سلولی بروز پیدا می‌کند، با مورفولوژی خاص این سلولها مرتبط است. با توجه به اینکه سلولهای feeder تاثیرات خود را با ترشحات امبریوتروفیک اعمال می‌کنند، شاید سلولهای قطبی شده ترشحات متفاوتی دارند. به هر حال این فرضیه، مطالعات بیشتری می‌طلبد. گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد پروتئینهای

- long-term culture of human embryos overcomes the in vitro developmental block and increase blastocyst formation. *Fertil Steril* 1992; 57: 641-647
11. Barmat LI, Worriolow KC, Payton BV: Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver co-culture cells. *Fertil Steril* 1997; 67: 775-779
12. Thibodeaux J, Godke R: In vitro enhancement of early stage embryos with co-culture. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 364-372
13. Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR: Factors affecting the in vitro development of blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod Fertil* 1991; 92: 125-131
14. Bongos A, Soon-Chye NG, Chui-Yee Fong, Shan Ratnam: Co-cultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991; 56: 179-191
15. Glasser ER, Julian J, Decker GL, Tang JP, Carsen DD: Development of morphological and functional polarity in primary cultures of immature rat uterine epithelial cells. *J Cell Biol* 1988; 107: 2409-2423
16. Jacobs AL, Decker GL, Glasser SR, Carsen DD: Vectorial secretion of prostaglandins by polarized rodent uterine epithelial cells. *Endocrinology* 1990; 126: 2125-2136
17. Schatz F, Gordon RE, Lanfer N, Gurpide E: Culture of human endometrial cells under polarizing conditions. *Differentiation* 1990; 42: 184-190
18. Mani SK, Decker GL, Glasser SR: Hormonal Responsiveness by immature rabbit uterine epithelial

- cells polarized in vitro. *Endocrinology* 1991; 128: 1563-1573
19. Ailenberg M, Fritz IB: Control at levels of plasminogen activator activity secreted by sertoli cells maintained in a two-chamber. *Endocrinology* 1988; 12: 2613-2618
20. Carsen DD, Tang J-P, Julian J, Glasser SR: Vectorial secretion of proteoglycans by polarized rat uterine epithelial cells. *J Cell Biol* 1988; 197: 2425-2434.
21. Chembarad M, Verrire B, Gabrion J, Mauchamp J: Polarization of thyroid cells in culture: evidence for basolateral localization of the iodide pump and at the thyroid stimulating hormone receptor-adenylyl cyclase complex. *J Cell Biol* 1983; 96: 1172-1177
22. Hardley MA, Byers SW, Snarez Quarez-Quian CA, Kleinman HA, Dym M: Extracellular matrix regulates sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. *J Cell Biol* 1985; 101: 1511-1522
23. Classen-Linke I, Kusche M, Knauth R, Beier HM: Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells. *Cell Tissue Res* 1997; 284: 171-185
24. Pollard JW, Plante C, King WT, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS: Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 102-107
25. Sidhu KS, Mat KE, Rodger JC: Sperm-oviduct epithelial cell monolayer co-culture: an in vitro model of sperm female tract interactions in a marsupial, the tamar wallaby (*Macropus eugenii*). *J Reprod Fertil* 1988; 114: 55-61
26. Ellington JE, Jones AE, Davitt CM, Schneider CS, Brishois RS, et al: Human sperm function in co-culture with human, macaque or bovine oviduct epithelial cells monolayers. *Hum Reprod* 1998; 13: 2797-2804
27. Freeman MR, Bastias MC, Hill GA, Osteen KG: Co-culture of mouse embryos with cells isolated from the human ovarian follicle, oviduct and uterine endometrium. *Fertil Steril* 1993; 1: 138-142
28. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO: Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophoblast cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod, Biol, Med, Online* 2001/149 on web 17 June 2001
29. Bentin-Ley U, Horn T, Siogren A, Sorensen S, Falck Larsen J, et al: Ultra structure of human blastocyst-endometrial interactions in vitro. *J Reprod Fertil* 2000; 120: 337-350
30. Bentin-Ley U, Siogren, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T: Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation. *In vitro hum Reprod* 1999; 14: 515-520
31. Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M and Lessey BA: Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture modal. *Hum Reprod* 2001; 5: 836-845
32. Park DW, Choi DS, Ryn HS, Know HC, Joe H, Min CK: A well-defined in vitro three-dimensional culture of human endometrium and its applicability to endometrial cancer invasion. *Lett* 2003; 195: 185-192
33. Pollard JW, Xu KP, Porie R, King WA, Betteridge KJ: Influence of various oviductal epithelial cell culture systems on the development of early cleavage stage bovine embryos in vitro. *Theriogenology* 1989; 31: 239
34. Ouhibi N, Hamidi J, Guillad J, Menezo Y: Co-culture of one cell mouse embryo on different cell support. *Hum Reprod* 1990; 5: 737-743
35. Bentin-Ley U, Pederson B, Linderberg S, Larsen JB, Hamberger L, Horn T: Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. *J Reprod Fertil* 1994; 161: 327-335
36. Vega Salas DE, Salas PJ, Gunderson D, Rodriguez-Boulan E: Formation of the apical pole of epithelial (Madin-Darby Canine Kidney) cells: Polarity of an apical protein is independent of tight junctions while segregation of a basolateral marker requires cell-cell interactions. *J Cell Biol* 1987; 104: 905-916
37. Frasier J, Sherbehn R, Soltes B, Molo MW, Binor Z, Radwanska E, Rawlins R: Animal experimentation: optimizing tubal epithelial cell growth promotes mouse embryo hatching in co-culture. *J Assit Reprod Gen* 1996; 5: 423-430
38. Boatman DE: In vitro growth of non-human primate pre- and peri-implantation embryos. In Bavister B. D. (ed.). *Mammalian preimplantation Embryo*. Plenum Press, 1987: 273-308
39. Schiewe MC, Hazeleger NI, Scilimenti C, Balmaceda JP: Physiological characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse anti-hatching modal. *Fertil Steril* 1995; 63: 288-294
40. Handyside AH, Hunter S: Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. *Roux, Arch Dev Biol* 1986; 195: 519-526
41. 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
42. Sherban R, Frasier J, Radwanska, Binor Z, Molo MW, Hibner M, Mack S and Rawlins RG: Comparison of mouse embryo development in open and micro drop co-culture systems. *Hum Reprod* 1996; 10: 2223-2229
43. Thomas PG, Igotz GG, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP, Currie B: Isolation, culture and characterization of equine oviduct epithelial cells in vitro. *Mol Reprod Dev* 1995; 41: 468-478
44. Woldesenbet S, Newton GR: Comparison of proteins synthesized by polarized caprine oviductal epithelial cells and oviductal explants in vitro. *Theriogenology* 2003; 60: 533-543

