پتانسیل تکوین در جنینهای فراگمنته انسان

پوپک افتخاری .Ph.D☆★، مجتبی رضازاده .Ph.D☆★§، سعید کاظمی .Ph.D☆، تقی‌الطریحی .Ph.D ★

☆ پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

§ آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی:۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

پست الکترونیک: Email: info@royaninstitute.org

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۴/۲۰، پذیرش مقاله: ۸۳/۸/۱۰

* **هدف:** ارزیابی پتانسیل تکوین جنینهای فراگمنت شدهٔ انسانی (Fragmented Human Embryos) تا مرحلهٔ بلاستوسیست و ارزیابی کیفیت بلاستوسیستهای ایجاد شده از لحاظ اندازهٔ، تعداد سلول، نوع تودهٔ سلولی داخلی و تروفواکتودرم و تعداد سلولهای مرده

* **مواد و روشها:** جنینهای دو تا هشت سلولی انسان که فراگمنت شده و برای انجماد نیز مناسب نبودند از آزمایشگاه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان دریافت شد. درجهٔ فراگمنتاسیون جنینها با استفاده از میکروسکوپ معکوس مشخص و بر اساس نحوهٔ توزیع فراگمنتها، در چهار گروه قرار گرفتند (گروه I دارای کمترین میزان فراگمنت، گروه II دارای فراگمنتهای کوچک و پراکنده شده در لا به لای بلاستومرها، گروه III دارای فراگمنتهای بزرگتر تقریبا به اندازهٔ یک بلاستومر و گروه IV فراگمنتها به شکل نکروتیک) و هر گروه به قطرهٔ جداگانه‌ای از محیط کشت rS2 منتقل و روند رشد و تکامل آنها تا روز ششم مورد ارزیابی قرار گرفت (لازم به ذکر است محیط کشت جنینها تا روز سوم محیط rS1 بود). تعداد، اندازه و کیفیت بلاستوسیستهای تشکیل شده، تعداد سلولهای تودهٔ سلولی داخلی و تروفواکتودرم با استفاده از رنگ‌آمیزی افتراقی و تعداد سلولهای مردهٔ هر جنین (آپوپتوتیک و نکروتیک) با استفاده از تکنیک TUNEL در هر جنین شمارش گردید و نتایج با آزمونهای آماری مجذور کای و آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

* **یافته ها:** نتایج حاصله حاکی از آن است که درصد بالایی از جنینهای گروه IV در مرحلهٔ دو تا چهار سلولی توقف تقسیم داشتند و نیز در هر چهار گروه میزان بالایی در مرحلهٔ هشت سلولی تا مورولا توقف نمودند. میزان تشکیل بلاستوسیست در گروه I و II بیش از گروههای III و IV بود. همچنین یافته‌ها نشان داد که اندازهٔ بلاستوسیستها در گروه IV به طور معنی‌داری از گروههای I و II کمتر بوده است. کیفیت بلاستوسیستها به خصوص از نظر تودهٔ سلولی داخلی در گروه I و II بهتر بوده و با گروه III و IV تفاوت داشت. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی افتراقی نیز نشان دهندهٔ این امر است که نسبت سلولهای تودهٔ سلولی داخلی به کل سلولهای هر جنین در چهار گروه تفاوت معنی‌داری ندارد ولی متوسط کل سلولها، متوسط سلولهای ناحیه تودهٔ سلولی داخلی و متوسط تروفواکتودرم در هر جنین در گروههای I و II بیش از گروههای III و IV است و نیز نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی TUNEL مؤید این مطلب است که هر چه تعداد فراگمنتها در جنین چهار سلولی بیشتر و اندازهٔ آنها بزرگتر باشد، در مرحلهٔ بلاستوسیست تعداد سلولهای آپوپتوتیک و نکروتیک بیشتر است.

* **نتیجه گیری:** هر چه میزان فراگمنتها در جنین انسان افزایش یابد، پتانسیل تکامل جنینها، اندازهٔ بلاستوسیستها، کیفیت بلاستوسیستها، کیفیت و موقعیت تودهٔ سلول داخلی و تروفواکتودرم و تعداد کل سلولهای جنینی کاهش یافته، در عوض تعداد سلولهای مرده در بلاستوسیست افزایش می‌یابد.

کل واژگان: فراگمنت شدن، جنین انسان، مرحله بلاستوسیست، تکنیک TUNEL

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، پاییز ۸۳، شماره ۲۳، صفحات ۱۷۸-۱۶۸

مقدمه

فراگمنتاسیون (قطعه قطعه شدن سلولهای یک جنین) پدیدهٔ شایعی است که در بیش از ۵۰درصد جنینهای انسانی که در محیط in vitro رشد می کنند دیده می‌شود (۱). حاصل این پدیده تشکیل جنینهایی با بلاستومرهای غیر یکسان (از لحاظ اندازه و ظاهر سیتوپلاسم) است و بلاستومرهای درگیر بر خلاف بلاستومرهای سالم ،منظم و گرد نبوده و در مشاهده زاویه دار به نظر می‌رسند (۲).

عوامل گوناگونی می‌توانند در ایجاد پدیدهٔ فراگمنتاسیون دخیل باشند. شرایط نامساعد محیط کشت از قبیل افزایش H_2O_2 و رادیکالهای آزاد و میزان بالای O_2 و کمبود فاکتورهای رشد و عوامل بقای سلولها در محیط کشت (۳)، کیفیت گامتها مانند بلوغ شیمیایی غیر طبیعی و زود هنگام تخمکها در اثر تحریک تخمک‌گذاری (۴)، نقص در DNA اسپرم (۵) و ناهنجاریهای کروموزومی و هسته‌ای در

سلولهای جنین (۶، ۷) از جمله عواملی است که باعث ایجاد فراگمنت در جنین می‌شود.

حضور این پدیده در جنین باعث آسیب به روند تکامل شده و اغلب منجر به توقف تقسیم و دژنره شدن جنین می‌گردد. چرا که وجود این قطعات در لابه‌لای بلاستومرها از ایجاد اتصالات بین سلولی طبیعی ممانعت نموده تکامل و رشد بعدی جنین را در مرحلهٔ compaction مختل می نماید (۸، ۹). به علاوه ادامهٔ حضور این قطعات سلولی در جنینهای در حال رشد قبل از لانه گزینی که فاگوسیتوز نیز نمی شوند (به علت اینکه هنوز بلاستومرهای سالم قابلیت فاگوسیتوز را کسب نکرده‌اند) آنها را به سمت نکروز ثانویه پیش می برد و تأثیرات منفی روی سایر بلاستومرهای سالم می‌گذارد (۱۰).

در مورد مکانیسمهای ایجاد فراگمنتهای سلولی نظرات مختلفی وجود دارد. اکثر محققانی که در این زمینه مطالعه می‌کنند معتقدند که این فرآیند حاصل پدیدهٔ مرگ برنامه ریزی شده programmed cell death (PCD) و آپوپتوزیس است (۴). Jurisicova و همکارانش بر این عقیده اند که شواهد آپوپتوزیس از جمله تغییرات غشاء، حضور واکئولهای سیتوپلاسمی، متراکم شدن کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA، هسته و سیتوپلاسم در بلاستومرهای جنین قابل مشاهده است (۱۰).

در سالهای اخیر تحقیقات متعددی در جنبه های مختلف پدیدهٔ فراگمنتاسیون انجام گرفته است.که یکی از آنها چگونگی رشد و تکامل این جنینها است. Hardy نشان داد که جنینهای فراگمنت شده نسبت به جنینهای طبیعی و سالم در روز ۵ و ۶ پس از لقاح تعداد سلول کمتری دارند و تعداد سلولهای مرده در آنها نیز بیشتر از گروه کنترل است (۱۱). Alikani جنینهای فراگمنت شده را بر اساس درجه و الگوی فراگمنتاسیون تقسیم‌بندی کرد و پس از برداشت فراگمنتها به وسیلهٔ میکروسرجری، آنها را به مادر منتقل نموده و میزان حاملگی و لانه گزینی جنینها را گزارش کرد .وی نتیجه گرفت که؛ با اینکه با برداشت فراگمنتها در میزان لانه گزینی و حاملگی بهبودی صورت می‌گیرد، لیکن هنوز هم در جنینهای با میزان بالای فراگمنت ،حاملگی و لانه گزینی پایین است و این کاهش وقتی که جنینها بصورت هموژنوس و یکسان انتقال یابند بیشتر خواهد بود (۸). مطالعات دیگری در جهت تأثیر فراگمنتاسیون بر روی حاملگی و نوزادان حاصل از جنینهای فراگمنت صورت گرفته است و در تمام آنها بر این نکته تأکید شده است که هرچه میزان فراگمنت در یک جنین بیشتر باشد احتمال عدم لانه گزینی، سقط و بدنیا آمدن نوزادانی با ناهنجاریهای ژنی و کروموزومی افزایش می‌یابد (۱۲، ۱۳). به هر حال، در بیشتر مطالعاتی که در زمینهٔ رشد و نمو جنینهای فراگمنت شده صورت گرفته است، جنینها پس از روز سوم به مادر منتقل شده و نتایج تکوین آنها پس از انتقال بررسی شده است و کمتر مطالعه ای در زمینهٔ رشد جنینها در محیط کشت تا مرحلهٔ بلاستوسیست، بررسی کیفیت بلاستوسیستهای ایجاد شده و تعداد سلولهای مرده و نوع مرگ آنها در بلاستوسیست مشاهده می‌شود و مطالعات موجود نیز تاثیر نوع، درجه و پراکندگی فراگمنتها را بر سرنوشت جنینها به وضوح مشخص نکرده اند. از این رو این سؤال مطرح است که نحوهٔ رشد و تکوین جنینهای فراگمنته با درجات مختلف فراگمنتاسیون در محیط کشت و تا مرحلهٔ بلاستوسیست چگونه خواهد بود؟آیا همهٔ جنینهایی که دچار فراگمنتاسیون‌می‌شوند سرانجامی جز مرگ و از بین رفتن ندارند؟ به عبارت دیگر میزان و الگوی فراگمنتها در جنینهای مختلف چه تأثیری بر رشد و تکوین آنها خواهد داشت؟آیا حذف چند سلول از مجموعهٔ بلاستومرهای یک جنین می‌تواند بر رشد و تکوین آن جنین و در نهایت بر کیفیت بلاستوسیست ایجاد شده تأثیری داشته باشد؟ و اینکه آیا پس از رسیدن یک جنین به مرحلهٔ بلاستوسیست باز هم سلول مرده ای در جنین یافت خواهد شد؟

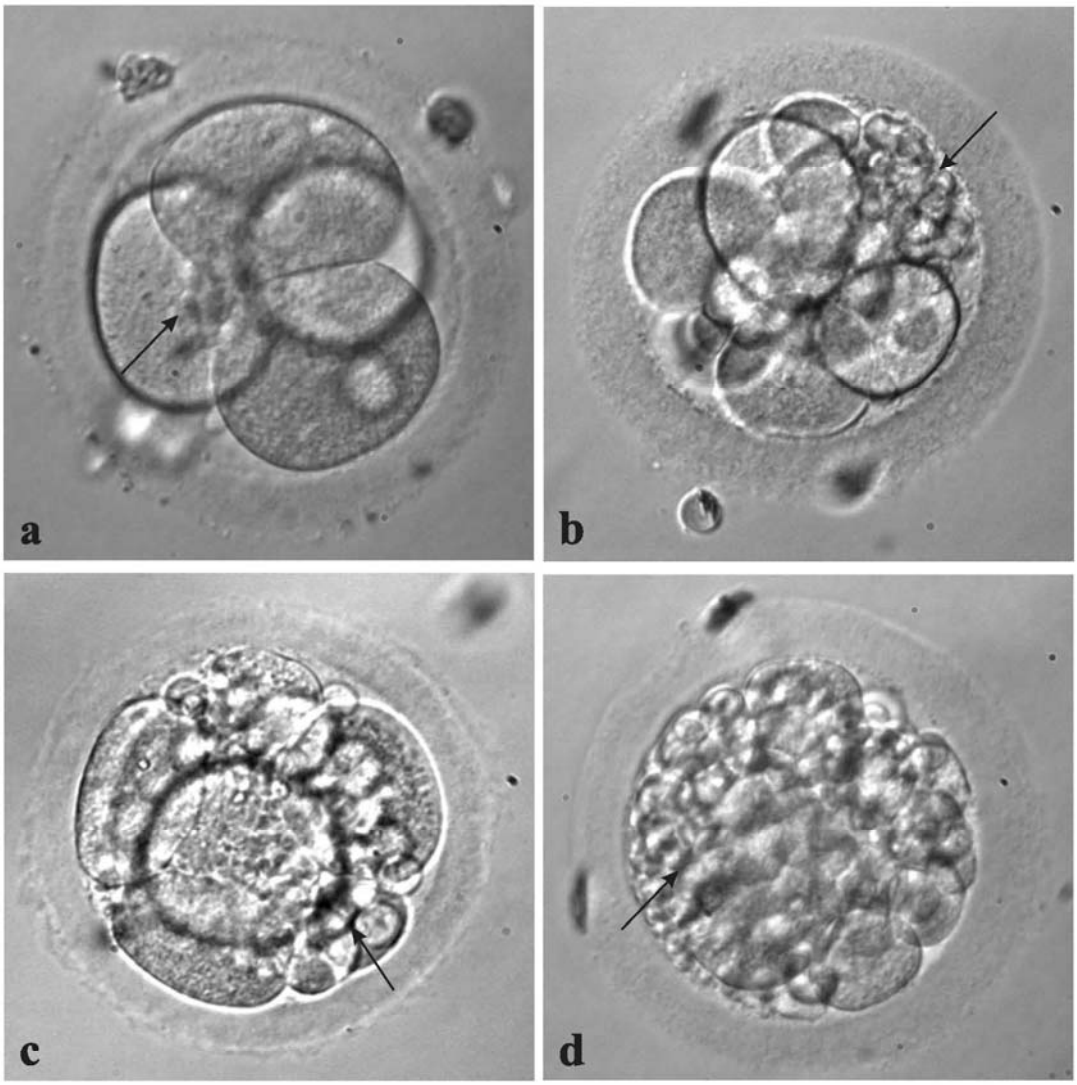
هدف از این مطالعه، بررسی پتانسیل رشد و تکوین جنین با درجات مختلف فراگمنت و کیفیت بلاستوسیستهای حاصل در محیط کشت است .به این منظور به جنینهای اضافی انسانی که درجات مختلف فراگمنت در آنها وجود داشت اجازهٔ رشد تا مرحلهٔ بلاستوسیست داده شد. سپس کیفیت و اندازهٔ سطح هر بلاستوسیست بررسی و با استفاده از رنگ آمیزی افتراقی تعداد سلولها در بلاستوسیستهای هر گروه مشخص و نیز در برخی بلاستوسیستها با استفاده از تکنیک TUNEL تعداد سلولهای مرده شمارش گردید.

مواد و روشها

تهیه و کشت جنینها

«تحقیق حاضر طبق اجازهٔ رسمی کمیتهٔ اخلاق پزشکی پژوهشکدهٔ رویان انجام گرفته است». تعداد ۳۱۵ جنین انسانی اضافی که فراگمنت شده بودند، در ابتدای روز سوم پس از لقاح در مرحلهٔ دو تا هشت سلولی از آزمایشگاه جنین شناسی پژوهشکده رویان دریافت شدند. تحریک تخمدانی به صورت long protocol و با استفاده از آنالوگ GnRH (Buserelin;Hoechst,Frankfort,Germany) و hMG (Organon,Holland) انجام شد. ۳۶ ساعت پس از تزریق hCG (Organon,Holland) و تخمک گیری، تخمکها به طریقهٔ IVF یا ICSI در محیط rS1 (Vitrolife, Sweden) بارور و کشت شدند.۴۳ تا ۴۵ ساعت پس از ترکیب اسپرم با تخمک، جنینهای مناسب انتقال، انتخاب و به بیماران انتقال داده شدند و جنینهای اضافی فراگمنت شده که قابل انجماد نبودند و یا جنینهایی که تعداد آنها کمتر از سه عدد بوده و برای انجماد مورد استفاده قرار نمی گرفتند جهت مطالعه به آزمایشگاه تحقیقات انتقال یافتند. سپس جنینها با استفاده از میکروسکوپ معکوس(Nikon TE 300, Japan) دارای سیستم هافمن (Huffman, Germany) و عدسی شیئی ۴۰ × ارزیابی شده و بر اساس نحوهٔ توزیع و اندازهٔ فراگمنتها درجه‌بندی شدند. بر این اساس چهار الگو برای جنینهای فراگمنت شده در نظر گرفته شد (طبق تقسیم بندی Alikani و Cohen (۸) با کمی تغییر) الگوی تقسیم بندی جنینها در تصویر ۱ نشان داده شده است.

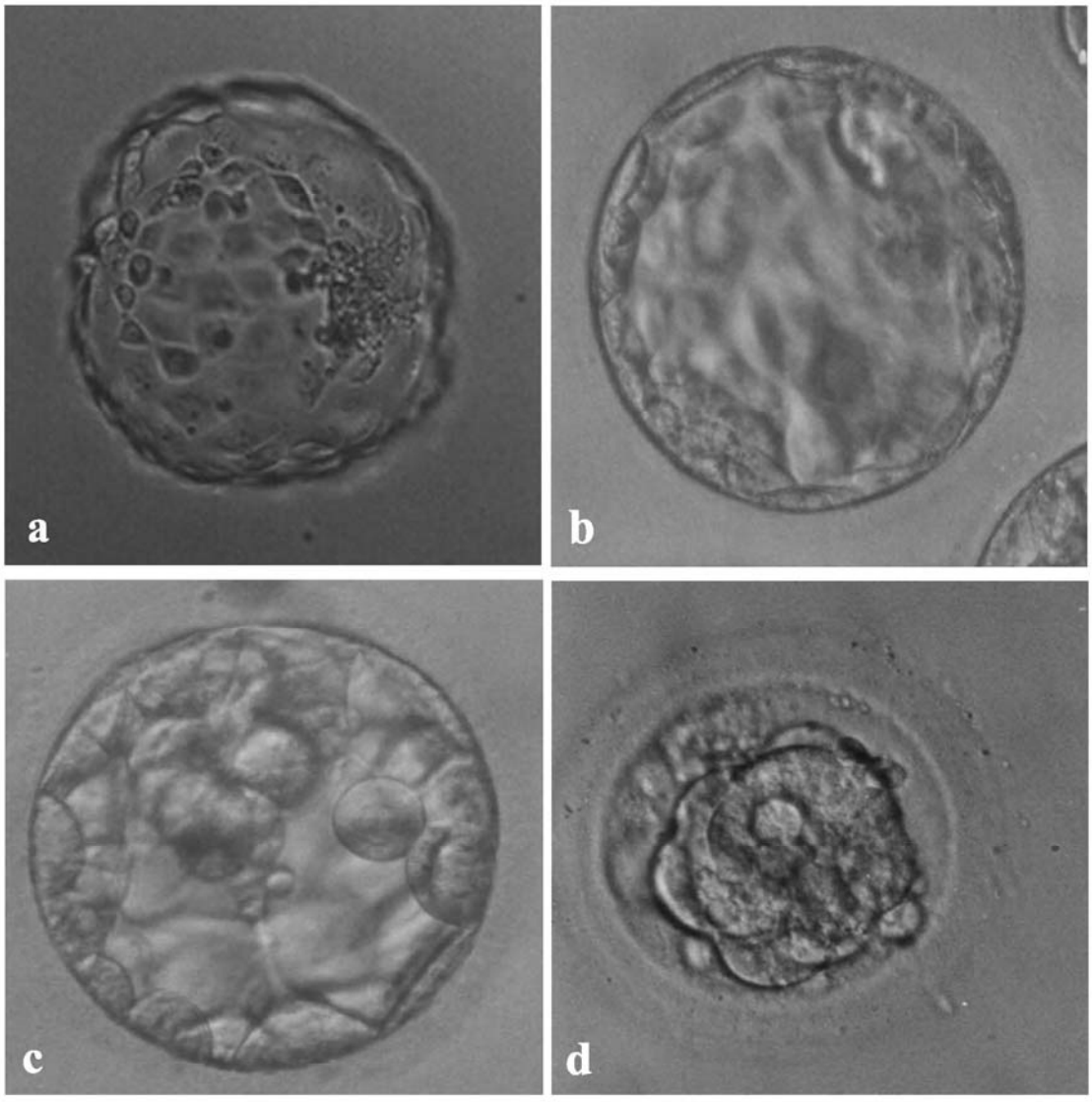
جنین نوع I دارای کمترین میزان فراگمنت (کمتر از ۵ درصد) است که به صورت متمرکز در زیر زونا پلوسیدا و در فضای perivitelline قرار گرفته اند. به بیان دیگر یک یا دو بلاستومر از کل جنین دچار فرآیند فراگمنتاسیون گردیده است (تصویر a-۱) حال اگر فراگمنتهای کوچک و پراکنده ای(حدود ۲۰درصد کل جنین) بین بلاستومرها مشاهده شود، چنین جنینی در گروه II جای می گیرد. این قطعات یا لا به لای بلاستومرها در فضای کلیواژی قرار دارند و یا به صورت محیطی قرار گرفته اند (تصویر b-۱). در الگوی III فراگمنتهای بزرگی که گاهی تقریباً به اندازهٔ یک بلاستومر کامل هستند و حدود ۳۵ تا ۵۰ درصد فضای جنین را اشغال کرده اند، دیده می شود. این فراگمنتها به صورت تصادفی پراکنده شده و تقریباً متعلق به کل بلاستومرها هستند (تصویر c-۱). در الگوی IV فراگمنتها به شکل گرانوله و نکروتیک بود و تقریباً کل فضای جنین را پوشانده است (تصویر d-۱).



شکل ۱: توصیف جنین های انسان بر اساس الگوی فراگمنتاسیون در روز دوم. a: گروه I دارای کمترین میزان فراگمنت و به صورت مجتمع در زیر زوناپلوسیدا. b: گروه II دارای فراگمنت‌های کوچک و پراکنده در لابه‌لای بلاستومرها. c: گروه III با فراگمنتهای بزرگتر و تقریبا به اندازهٔ یک بلاستومر. d: گروه IV فراگمنتها به شکل نکروتیک (فلش، فراگمنتها را نشان می‌دهد).

پس از تعیین نوع، جنینهای هر گروه به یک قطرهٔ مجزا از محیط rS2 (Vitrolife, Sweden) منتقل و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و میزان CO_2 ۵ درصد نگهداری شدند و تا روز ششم روند رشد و تکاملشان مورد بررسی قرار گرفت.

هر کدام از جنینها که تبدیل به بلاستوسیست شدند، از لحاظ اندازه و نیز کیفیت مورد ارزیابی قرار گرفتند. اندازهٔ سطح بلاستوسیستها توسط عدسی چشمی میکروسکوپ معکوس که دارای یک صفحهٔ شطرنجی بود، بر اساس میکرومتر مربع اندازه گیری شد. کیفیت بلاستوسیستها نیز با سه فاکتور تودهٔ سلولی داخلی، (ICM) تروفواکتودرم (TE) و میزان اتساع به طریق زیر بررسی شد.



شکل ۲: توصیف بلاستوسیستهای انسان بر اساس ۳ فاکتور تودهٔ سلولی داخلی، تروفواکتودرم و میزان متسع شدن هر بلاستوسیست. بلاستوسیست دارای تودهٔ سلولی مشخص و مجزا با شاخص A (a)، سلولهای پراکنده با شاخص B (c) و بدون تودهٔ سلولی داخلی با شاخص C (b)؛ هر بلاستوسیست با سلولهای تروفواکتودرم کشیده، متعدد و محکم به همه چسبیده با شاخص A (b) با سلولهای بزرگ برآمده با شاخص B (c) و بدون سازماندهی با شاخص A (a, b)، با اتساع کم و حفرهٔ دارای سلول با شاخص B و (c) و کلاپس شده با شاخص C (d) امتیاز داده شدند.

از لحاظ تودهٔ سلولی داخلی هر بلاستوسیست که دارای تودهٔ سلولی داخلی مشخص و مجزا و به صورت یک تودهٔ متراکم با سلولهای متعدد و سازمان یافته بود با شاخص A، و هر بلاستوسیست که دارای تودهٔ سلولی داخلی کوچک و با سلولهای پراکنده بود، با شاخص B و هر بلاستوسیست که فاقد تودهٔ سلولی داخلی بود با شاخص C مشخص شد. از لحاظ تروفواکتودرم نیز هر جنین که دارای سلولهای تروفواکتودرمی کاملا کشیده، متعدد و محکم به هم چسبیده بود با شاخص A، و هر جنینی که دارای سلولهای بزرگ برآمده بود با شاخص B و هر جنینی که تروفواکتودرم بدون سازماندهی مشخص داشت با شاخص C مشخص گردید و نیز بلاستوسیستهایی که کاملاً متسع شده بودند و یک حفرهٔ داخلی بزرگ در آن دیده می شد شاخص A و بلاستوسیستهایی که اتساع در آنها کم بوده و در داخل حفره بلاستوسل سلول یا فراگمنت مشاهده شد، شاخص B و آنهایی که در حال کلاپس شدن بودند شاخص C دریافت کردند (تصویر۲). به طور مثال اگر جنینی فاقد تودهٔ سلولی داخلی با تروفواکتودرمی که سلولهای آن کاملاً کشیده و کاملاً متسع شده باشد به آن از چپ به راست امتیاز C-A-A داده می شود.

رنگ آمیزی افتراقی بلاستوسیستها

جهت رنگ آمیزی تودهٔ سلولی داخلی و تروفواکتودرم، بلاستوسیستهای متسع و یا در حال هچینگ ابتدا در ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رنگ آمیزی I به مدت ۳۰ ثانیه انکوبه شدند. محلول رنگ آمیزی I متشکل از محیط HTF با بافر(Sigma,USA) HEPES و حاوی ۱درصد تریتون X-100 (Sigma,USA) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پروپیدیوم یدید (Sigma,USA) بوده که باعث می‌شود که سلولهای تروفواکتودرم قرمز رنگ شوند .پس از طی مدت زمان ذکر شده جهت ثبوت و رنگ‌آمیزی تودهٔ سلولی داخلی، بلاستوسیستها به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول II منتقل شدند. این محلول حاوی اتانل ۱۰۰درصد به همراه ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بیس بنزآمید (Hoechst 33258 ;Calbiochem) بوده که باعث می گردد که سلولهای تودهٔ داخلی آبی رنگ شوند.پس از گذشت ۱۲ ساعت بلاستوسیستها روی یک لام شیشه ای که یک قطره گلیسرول روی آن قرار داده شده بود انتقال یافته و به آرامی روی آنها یک لامل قرار داده شد. سپس توسط میکروسکوپ فلوروسنس (Nikon E 800, Japan)و با طول موج ۳۸۰ تا ۴۲۰ نانومتر هستهٔ سلولهای ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی و تروفواکتودرم شمارش گردید. هر هسته به منزلهٔ یک سلول تلقی و هسته هایی که ظاهر فراگمنت شده و قطعه قطعه داشتند از شمارش حذف و هسته هایی که کروموزوم‌های آنها در مرحلهٔ آنافاز قرار گرفته بود نیز بعنوان یک سلول شمارش شدند.

رنگ آمیزیTUNEL

برخی از جنینها که به مرحلهٔ بلاستوسیست رسیده بودند با رنگ TUNEL (In Situ Cell Death Detection System;Roche,Germany) رنگ‌آمیزی شدند. این تکنیک مخصوص نشان دادن سلولهای آپوپتوزی است. در این تکنیک می‌توان برای تشخیص آپوپتوزیس از نکروزیس، از رنگ پروپیدیوم یدید استفاده نمود. ابتدا جنینها در محلول پروپیدیوم یدید به میزان ۲۰ میکروگرم در یک میلی‌لیتر محیط HTF به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از سه بار شستشو در بافرفسفات (PBS) عمل فیکس در محلول فرم آلدهید ۴درصد (Sigma,USA) در بافرفسفات به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد و بعد جنینها در بافر فسفات حاوی ۰/۳درصد پلی‌وینیل پایرولیدون (PVP,Sigma) شش بار شستشو شده و به مدت دو دقیقه در محلول تریتون ۰/۱درصد روی یخ قرار گرفتند. پس از سه بار شستشو در PBS/PVP جنینها به مدت یک ساعت در محلولTUNEL قرار گرفتند. برای شمارش کل بلاستومرهای جنین می توان از رنگ بیس بنز آمید (Hoechst 33258) استفاده نمود. پس از رنگ آمیزی فقط جنینهایی که TUNEL مثبت و پروپیدیوم یدید منفی بودند بعنوان سلولهای آپوپتوتیک شمارش شدند.

آنالیز آماری

داده های به دست آمده از شمارش جنینها در طی رشد و تکامل آنها و نیز از شمارش بلاستومرها توسط آزمونهای آماری آنالیز گردید. مقایسهٔ درصد رشد و نمو جنینها و کیفیت بلاستوسیستها در گروههای مختلف با استفاده از آزمون مجذور کای (χ^2) و مقایسهٔ اختلاف بین تعداد بلاستومرها، تعداد سلولهای آپوپتوتیک و نکروتیک و اختلاف بین اندازه بلاستوسیستها در گروههای مختلف توسط آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) صورت گرفت.

یافته‌ها

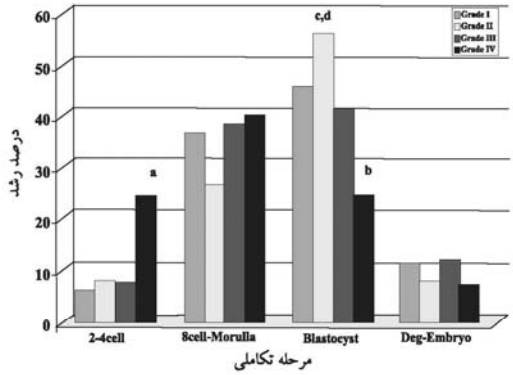
تکوین وتشکیل بلاستوسیست

نتایج میزان تکوین جنینها طی شمارش آنها در مدت کشت در نمودار ۱ آورده شده است. از بین ۳۱۵ جنین مورد بررسی در گروه اول ۴۶ جنین، گروه دوم ۱۱۹ جنین، گروه سوم ۹۸ جنین و گروه چهارم ۵۲ جنین مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان طور که در نمودار مشخص شده است، ۲۵درصد از جنینهای گروه IV در مرحلهٔ دو تا چهار سلولی ایست تکوینی داشته‌اند که با گروههای I ، II و III اختلاف معنی دار دارند (P<۰/۰۵ و ٪۸/۲=III و ٪۸/۶=II و ٪۶/۵=I).

نتایج نشان دهندهٔ این امر است که در هر چهار گروه میزان بالایی از جنینها در مرحلهٔ هشت سلولی تا مورولا توقف داشته اند، گروه اول ۳۷درصد، گروه دوم ۲۶/۹ درصد، گروه سوم ۳۸/۸ درصد و گروه چهارم ۴۰/۴ درصد که تفاوتی مابین گروهها دیده نشد.

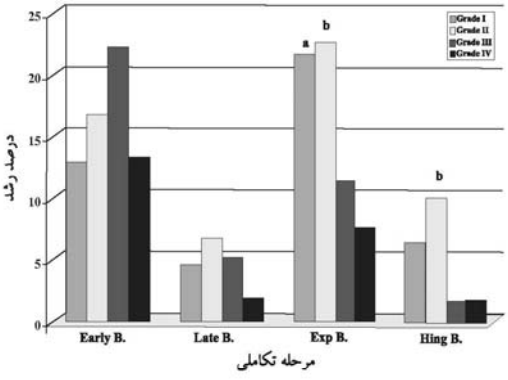
همچنین میزان تشکیل بلاستوسیست در چهار گروه در نمودار یک آورده شده است. بالاترین میزان تشکیل بلاستوسیست در گروه II با ۵۶/۳درصد دیده می شود که در مقایسه با گروههای III ۴۰/۸درصد (P<۰/۰۵) و IV ۲۵درصد (P<۰/۰۰۱) اختلاف معنی دار است. میزان

تشکیل بلاستوسیست در گروه اول نیز ۴۵/۷درصد است که با گروه IV تفاوت معنی دار دارد (P<۰/۰۵). بین گروه III و IV نیز با (P<۰/۰۵) اختلاف دیده می شود.



نمودار ۱: مقایسه میزان تکوین جنین‌های انسانی حاصل از چهار گرید فراگمنتاسیون ۱۳۴ ساعت پس از کشت
Deg. Embryo= جنین‌های دژنره شده
a: اختلاف میان گرید I، II و III با IV معنی‌دار است. P<0.05
b: اختلاف میان گرید I و III با IV معنی‌دار است. P<0.05
c: اختلاف میان گرید II با III معنی‌دار است. P<0.05
d: اختلاف میان گرید II با IV معنی‌دار است. P<0.05

نمودار ۲ به تفکیک مراحل مختلف بلاستوسیست را نشان می دهد. همان طور که نشان داده شده است میزان تشکیل بلاستوسیست اتساع یافته در گروههای I و II بیش از گروههای III و IV است که گروه I با گروه IV و گروه II با گروههای III و IV اختلاف دارند (P<۰/۰۵).



نمودار ۲: مقایسه میزان تکوین جنین‌های انسانی حاصل از چهار مرحله مختلف تشکیل بلاستوسیست، ۱۳۴ ساعت پس از کشت
Early B.- بلاستوسیست اولیه، Late B.- بلاستوسیست نهایی، Exp. B.- بلاستوسیست اتساع یافته، Hing B.- هچینگ بلاستوسیست
a: اختلاف میان گرید I با IV معنی‌دار است. P<0.05
b: اختلاف میان گرید II با III و IV معنی‌دار است. P<0.05

درصد بلاستوسیستهایی که به مرحله هچینگ رسیده اند در گروه IIبیش از گروههای III و IV است و اختلاف معنی دار وجود دارد (P<۰/۰۵). همچنین نمودار ۲ گویای این مطلب است که بر خلاف میزان کم تشکیل بلاستوسیست اتساع یافته در گروههای III و IV میزان تشکیل بلاستوسیست اولیه در این گروهها تقریباً بالا بوده (IV=٪۱۳/۵ و III=۲۲/۴) و این امر به این معنی است که در این دو گروه جنینهایی که تا مرحلهٔ بلاستوسیست اولیه رسیده‌اند قادر به ادامهٔ روند تکامل تا مراحل بالاتر نیستند.

همچنین نتایج حاکی از آن است که درصد جنینهای دژنره شده در چهار گروه اختلاف آماری ندارد (IV=٪۷/۷ و III=٪۱۲/۲ و II=٪۸/۴ و I=٪۱۰/۹).

اندازه و کیفیت بلاستوسیست

جدول ۱ نمایشگر اندازهٔ بلاستوسیستها در چهار گروه مختلف است. همان طور که از نتایج برمی‌آید سطح بلاستوسیستها به تدریج از گروه I به گروه IV کاهش می یابد که این کاهش در گروه IV با دو گروه I و II تفاوت معنی دار دارد (به ترتیب P<۰/۰۱ و P<۰/۰۵).

کیفیت بلاستوسیستها نیز در جدول ۲ نمایش داده شده است. همان طور که از داده ها برمی‌آید تقریباً ۷۷/۸درصد بلاستوسیستها در گروه I و ۵۴/۵درصد بلاستوسیستها در گروه II دارای تودهٔ سلولی داخلی مشخص و مجزا به صورت یک تودهٔ متراکم با سلولهای متعدد و سازمان یافته می باشند که اختلاف این دو گروه با گروه IV (۰درصد) معنی‌دار است. همچنین از همین لحاظ گروه I با گروه III با P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارد. از لحاظ کیفیت ترفواکتودرم در بلاستوسیستها نیز در گروه IV ۲۸/۶درصد از بلاستوسیستها بدون سازماندهی مشخص و منظم بودند (شاخص C ترفواکتودرم) که با گروه II (۰درصد) تفاوت معنی‌دار دیده شد.

همچنین جدول ۲ نشان دهندهٔ این مطلب است که تقریبا ۹۰درصد بلاستوسیستها در گروه I کاملاً اتساع یافته هستند و در مقایسه با گروههای دیگر اختلاف چشم‌گیری دارند. این اختلاف با گروههای II و III معنی دار است (P<۰/۰۵). اما با گروه IV با وجود کم بودن میزان اتساع (۵۷/۱درصد) اختلاف معنی دار نیست.

در بین گروهها فقط درگروه سوم است که تعداد کمی از بلاستوسیستها کاملاً اتساع یافته اند (۴۰درصد) و اگر با نمودار ۲ مقایسه شود دیده می شود که فقط ۱/۲درصد از کل جنینهای این گروه به مرحلهٔ بلاستوسیست اتساع یافته رسیده اند که نسبت به دو گروه اول و دوم میزان کمتری است و این مسئله نشان دهندهٔ این مطلب است که نه تنها تعداد کمتری از جنینهای گروهIII به مرحلهٔ بلاستوسیست اتساع یافته می رسند، بلکه به هنگام بلاستوسیست نیز کاملاً متسع نبوده و داخل حفره شان، سلول یا قطعات سلولی قابل مشاهده است.

جدول ۱: مقایسه میانگین تعداد سلولها و سطح (میکرومتر مربع) بلاستوسیستهای انسانی حاصل از چهار گرید فراگمنتاسیون

گروه	تعداد	تعداد کل سلولها a, b, c	تعداد ICM d, e	تعداد TE a, b	درصد ICM	اندازهٔ بلاستوسیست b, f
I	۸	۱۲۸/۱۲±۲۱/۴۳	۲۷/۵±۷/۲۳	۱۰۰/۶۲±۱۷/۲۲	٪۲۱±۳/۰۴	۲۲۲۱۶±۶۷۰۰/۱۳
II	۷	۱۰۶/۵۷±۴۵/۳۱	۲۰/۰۰±۲/۶۴	۸۶/۵۷±۴۳/۹۸	٪۲۱±۷/۱۵	۲۰۳۷۳/۳±۵۹۲۰/۷
III	۸	۷۴/۵±۳۸/۸۹	۱۲/۵±۸/۱۷	۶۲/۰۰±۳۳/۴۳	٪۲۰±۰/۱۱	۱۹۱۴۹/۳±۲۷۴۹/۱
IV	۸	۶۳/۷۵±۱۹/۷۹	۹/۸۷±۴/۸۵	۵۳/۸۷±۱۶/۹۸	٪۱۵/۰۰±۵۵/۸۴	۱۵۶۸/۱±۲۰۰۵/۷

- کلیه اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. ICM - توده سلولی داخلی، TE - تروفواکتودرم
- a: اختلاف میان گروه I با III و IV معنی‌دار است. P<0.01 - b: اختلاف میان گروه II با IV معنی‌دار است. P<0.05
- c: اختلاف میان گروه ابا II معنی‌دار است. P<0.05 - d: اختلاف میان گروه I با III و IV معنی‌دار است. P<0.001
- e: اختلاف میان گروهII با III و IV معنی‌دار است. P<0.05 - f: اختلاف میان گروه I با IV معنی‌دار است. P<0.01

جدول ۲: مقایسه کیفیت جنینها ی انسانی حاصل از گریدهای چهار گانه فراگمنتاسیون از لحاظ سه فاکتور توده سلولی داخلی (ICM)، تروفواکتودرم (TE) و میزان اتساع (Exp)

گروه	تعداد	ICM=A a, b, c	ICM=B	ICM=C	TE=A	TE=B	TE=C	Exp=A d	Exp=B	Exp=B
I	۹	۷(۷۸/۸)	۲(۲۲/۲)	۰(۰)	۳(۴۴/۴)	۵(۵۵/۶)	۰(۰)	۸(۸۸/۹)	۱(۱۱/۱)	۰(۰)
II	۲۱	۱۲(۵۴/۵)	۸(۳۶/۴)	۲(۹/۱)	۱۰(۴۵/۵)	۱۲(۵۴/۵)	۰(۰)	۱۰(۴۵/۵)	۱۲(۵۵/۵)	۰(۰)
III	۱۰	۳(۳۰)	۷(۷۰)	۰(۰)	۴(۴۰)	۵(۵۰)	۱(۱۰)	۴(۴۰)	۶(۶۰)	۰(۰)
IV	۷	۰(۰)	۷(۱۰۰)	۰(۰)	۲(۲۸/۶)	۳(۴۲/۹)	۲(۲۸/۶)	۴(۵۷/۱)	۳(۴۲/۹)	۰(۰)

- اعداد داخل پرانتز به صورت درصد هستند.
- a: اختلاف میان گروه I با III معنی‌دار است. P<0.05 - b: اختلاف میان گروه I با IV معنی‌دار است. P<0.01
- c: اختلاف میان گروه IIبا IV معنی‌دار است. P<0.05 - d: اختلاف میان گروه I با II و III معنی‌دار است. P<0.001

جدول ۳: مقایسه متوسط مرگ سلولی در بلاستوسیستهای انسانی حاصل از گریدهای چهارگانه فراگمنتاسیون

گروه	تعداد	تعداد کل سلولها a, b	میانگین آپوپتوزیس c	میانگین نکروزیس c	درصد نکروزیس c	درصد آپوپتوزیس d, e
I	۵	۱۲۹/۴۰±۹/۴۳	۴/۶۰±۴/۳۴	۱/۲۰±۱/۳۰	٪۰/۰۰۹۶±۰/۰۱	٪۰/۰۳۷±۰/۰۳۷
II	۱۰	۱۰۴/۴۰±۳۴/۱۷	۶/۳۰±۳/۸۰	۱/۶۰±۲/۵۳	٪۰/۰۱۶±۰/۰۳۱	٪۰/۰۶۵±۰/۰۴۵
III	۵	۷۳/۰±۹/۸۲	۹/۸۰±۴/۸۱	۳/۶۰±۱/۱۴	٪۰/۰۵۱±۰/۰۲۱	٪۰/۱۴±۰/۰۷۷
IV	۵	۶۳/۸۰±۱۲/۴۶	۲۱/۶۰±۶/۱۰	۱۳/۸۰±۲/۱۶	٪۰/۲۳±۰/۰۹۴	٪۰/۳۳±۰/۰۷۷

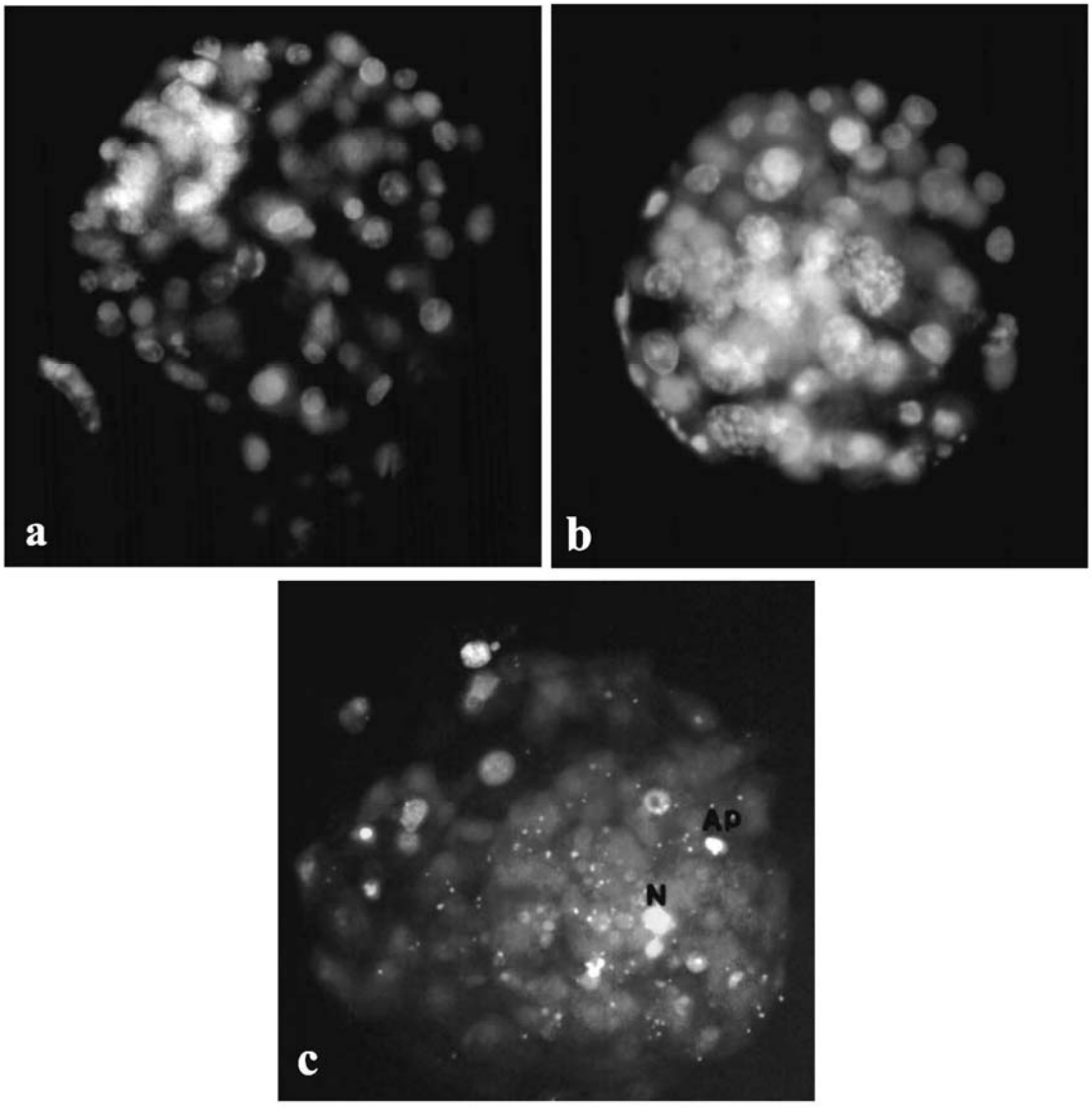
- کلیه اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند.
- a : اختلاف میان گروه I با III و IV معنی‌دار است. P≤ 0.001 - b: اختلاف میان گروه II با III و IV معنی‌دار است. P<0.05
- c: اختلاف میان گروه I و II با III و IV معنی‌دار است. P<0.001 - d: اختلاف میان گروه I و II با III معنی‌دار است. P<0.05
- e: اختلاف میان گروه I و II با III و IV معنی‌دار است. P<0.01

میزان سلولهای تودهٔ سلولی داخلی و تروفواکتودرم

جهت شمارش سلولهای تودهٔ سلولی داخلی و تروفواکتودرم به صورت مجزا، از رنگ آمیزی افتراقی استفاده شد. این روش رنگ آمیزی قبلاً فقط در مورد جنینهای گاو و موش انجام شده بود مزیت این نوع رنگ آمیزی عدم استفاده از آنتی‌بادی و کوتاه بودن زمان رنگ آمیزی است. مکانیسم این نوع رنگ‌آمیزی افتراقی فاکتور زمان است سلولهای تروفواکتودرم در زمان کم (۳۰ ثانیه) و با استفاده از نفوذپذیر شدن غشاء سلولهای این ناحیه توسط تریتون X-100 موجود در محلول رنگ اول (محلول پروپیدیوم یدید) رنگ ارغوانی را به خود گرفته و سپس به مدت طولانی(overnight) در مجاورت محلول رنگ دوم (بیس بنزآمید) قرار گرفته و این رنگ به داخل کل سلولهای جنین نفوذ می‌کند. از ترکیب این دو رنگ در سلولهای ناحیه تروفواکتودرم رنگ قرمز حاصل می‌شود. سلولهای ناحیهٔ توده سلولی داخلی فقط رنگ دوم یعنی رنگ آبی را به خود جذب نموده و در نتیجه بلاستوسیست به طور افتراقی رنگ می‌گیرد. پس از رنگ آمیزی، هستهٔ بلاستومرها در ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی به رنگ آبی و در بخش تروفواکتودرم به رنگ صورتی در می‌آید (تصویر شماره a-۳). نتایج شمارش سلولها در جدول ۱ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می شود، میانگین تعداد کل سلولهادر گروههای I و II بیش از گروههای III و IV است و نیز میانگین تعداد سلولهادر ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی و تروفواکتودرم در گروههای I و II بیش از گروه III و IV است. این اختلاف از نظر آماری معنی دار است. در گروه چهار تعداد زیادی از فراگمنتها به صورت قطعات کوچکی که رنگ را به خود می گیرند، در ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی و تروفواکتودرم دیده شده که دانسیتهٔ رنگ در آنها بسیار بالا بوده و به میزان زیادی رنگ را به خود جذب کرده بودند و از آنجا که این قطعات کوچک به عنوان فراگمنت شناسایی شدند در شمارش لحاظ نگردیدند. نکتهٔ قابل توجه این است که نسبت سلولهای تودهٔ سلولی داخلی به کل سلولهای یک

جنین (درصد سلولهای تودهٔ سلولی داخلی) در هر یک از گروهها یک نسبت تقریباً ثابت می‌باشد و در گروههای چهار گانهٔ این مطالعه تفاوت چندانی بین آنها وجود ندارد و تقریباً ۲۰درصد سلولهای یک جنین را سلولهای ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی تشکیل می دهد. به جز گروهIV که این میزان ۱۵درصد است. سلولهای ناحیهٔ تروفواکتودرم نیز در گروههای I و II به طور معنی‌داری بیش از گروههای III و IV است.

علاوه بر اختلاف مشاهده شده از لحاظ تعداد که در گروه III و IV کمتر از بقیه است، تصویر b-۳ نشان دهندهٔ این امر است که سلولهای ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی در گروههای III و IV آرایش منظم و سازمان یافته نداشته و برخلاف گروههای I و II به صورت پراکنده در حفرهٔ بلاستوسیست مشاهده می شوند در حالی که در گروههایI و II سلولهای ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی کاملاً سازمان یافته و به صورت متمرکز و یک تودهٔ کاملاً مجزا در یک قطب بلاستوسیست قرار گرفته اند.



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ فلورسنس از رنگ‌آمیزی افتراقی (a، b) و تکنیک TUNEL بلاستوسیستهای انسان (c). رنگ آبی نشان دهندهٔ تودهٔ سلولی داخلی (ICM) و رنگ صورتی (قرمز) نشان دهندهٔ سلولهای تروفواکتودرم (TE) است. در تصویر a سلولهای ICM به صورت متراکم و مجزا قرار گرفته‌اند در حالی که در تصویر b سلولهای ICM در لابه‌لای سلولهای TE پراکنده شده‌اند و سازماندهی مشخصی ندارند. c: نقاط آبی براق نشان دهندهٔ سلولهای آپوپتوتیک (Ap) و نقاط قرمز براق نشان دهندهٔ سلولهای نکروتیک (N) است.

فراوانی آپوپتوزیس و نکروزیس در بلاستوسیست

در این مطالعه برای تعیین تعداد سلولهای آپوپتوزی در گروههای مختلف جنینهای فراگمنته از رنگ آمیزی TUNEL استفاده گردید. ویژگی این رنگ آمیزی قابلیت افتراق سلولهای آپوپتوتیک از نکروتیک و نیز قابلیت شمارش کل سلولهای یک جنین است. در این تکنیک سلولهای آپوپتوتیک نکروتیک به ترتیب به رنگ زرد و قرمز در می آیند (تصویر c-۳).

نتایج حاصل از این رنگ آمیزی در جدول ۳ آمده است. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان سلولهای آپوپتوتیک و نکروتیک در بلاستوسیستهای گروه IV است که با گروههای دیگر تفاوت معنی دار دارد. همچنین بیشترین میزان متوسط درصد سلولهای نکروتیک ($\frac{\text{تعداد هسته های نکروتیک}}{\text{تعداد کل هسته}} \times ۱۰۰$) در گروهIV است که با گروههای دیگر تفاوت معنی دار دارد. از لحاظ متوسط درصد سلولهای آپوپتوتیک ($\frac{\text{تعداد هسته های آپوپتیک}}{\text{تعداد کل هسته}} \times ۱۰۰$) نیز گروههای III وIV درصد بالایی از این سلولها را در لابه لای سایر سلولهای یک بلاستوسیست به خود اختصاص داده و با گروههای I و II تفاوت معنی دار دارند.

بحث

این مطالعه به ارتباط بین مورفولوژی اولیه جنین قبل از لانه گزینی انسان و میزان تشکیل و کیفیت بلاستوسیست در محیط in vitro و احتمال وقوع پدیدهٔ مرگ سلولی در میان سلولهای بلاستوسیستی که حاصل از جنین با مورفولوژی غیر طبیعی است، می‌پردازد. در تحقیق حاضر بر اهمیت یکی از جنبه های مورفولوژی جنین یعنی فراگمنتاسیون تأکید شده است. آنچه که از شواهد ثبت شده بر می‌آید این است که جنینهای فراگمنت از لحاظ تکوین در محیط in vitro محدودیت دارند.

دلایل متعددی برای شروع پدیدهٔ PCD در جنینها ذکر می‌شود.یکی از این دلایل نامناسب بودن شرایط کشت جنینها است (۴). سیستم کشت استفاده شده در این مطالعه به صورت محیطهای کشت متوالی است که جنینها ابتدا در محیط rS1 کشت داده شده و در روز سوم وارد محیط rS2 شدند تا بدین ترتیب شرایط کشت به صورت مطلوب تری در اختیار جنینها قرار گیرد.

همان طور که در این مطالعه نشان داده شده است هرچه میزان قطعات سلولی (fragments) در جنین و لا به لای بلاستومرها بیشتر باشد درصد تشکیل بلاستوسیست کمتر شده و جنینها از کیفیت کمتری برخوردار هستند.

تقریباً ۲۵درصد از جنینهای گروه چهارم در مرحلهٔ دو تا چهار سلولی متوقف شده اند و این نشان دهندهٔ این مطلب است که فراگمنتاسیون می تواند باعث ایجاد ایست تکوینی در چنین جنینهایی باشد. از آنجا که برخی محققین عقیده دارند که بلاستومرهایی که دچار مرگ سلولی می‌شوند ممکن است از لحاظ هسته ای و کروموزومی دچار اشکال باشند (۱۴)، می‌توان نتیجه گرفت که در جنینهایی که در صد بالایی از سلولهای آنها فراگمنت شده اند، به علت اشکالات کروموزومی، ژنوم جنینها فعال نشده و باعث ایست تکوینی جنینها در مرحلهٔ دو تا چهار سلولی می شود.

این توقف رشد در مراحل هشت سلولی و مورولا نیز در گروههای III و IV دیده می شود.به عبارتی به ترتیب ۳۸/۸درصد و ۴۰/۴درصد از جنینهای این دو گروه در مراحل ذکر شده توقف کردند. حضور قطعات سلولی حاصل از فراگمنتاسیون در لا به لای سلولهای یک جنین می تواند باعث انحراف صفحات تقسیم و ممانعت در ارتباط بین سلولها شود (۸). عدم تعامل بین بلاستومرها، عدم compaction را به همراه خواهد داشت و این می تواند دلیل توقف درصد بالایی از جنینهای گروه III و IV در مراحل هشت سلولی و مورولا باشد.

این روند کاهش در میزان تشکیل بلاستوسیست در گروه IV نیز به خوبی قابل مشاهده است. چرا که فقط ۲۵درصد از جنینهای این گروه به مرحلهٔ بلاستوسیست رسیده اند و اگر به نمودار ۲ دقت شود دیده می شود که تعداد قابل توجهی از جنینهای گروه III و IV در مرحلهٔ بلاستوسیست اولیه باقی مانده و قادر به ادامهٔ روند رشد نیستند.

این مطلب نشان دهندهٔ این امر است که هرچه وقوع پدیدهٔ فراگمنتاسیون در جنین بیشتر باشد احتمال اینکه آن جنین بتواند مراحل تکوین خود را طی کند کاهش می یابد. همچنین این پدیده بر اندازهٔ بلاستوسیستها نیز تأثیر گذار بوده به طوری که با افزایش میزان فراگمنتها در جنین اندازهٔ جنینها از لحاظ سطح کاهش یافته است.به عبارت دیگر هر چه تعداد سلولهای بیشتری در این پدیده درگیر شوند یا فراگمنت شوند، تعداد سلولهای موجود در جنین در زمان بلاستوسیست کاهش یافته و نیز اندازهٔ بلاستوسیست کوچکتر می شود.پدیدهٔ فراگمنتاسیون بر کیفیت بلاستوسیستها به خصوص سلولهای ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی تأثیر داشته به طوری که آرایش و چگونگی قرارگیری آنها را به هم می زند .همان طوری که تصویر ۳ نشان می دهد سلولهای ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی در جنینهای گروهIII و IV بدون هیچ آرایش و همبستگی در سرتاسر جنین پراکنده شده اند. با اینکه نتایج این تحقیق نشان داد که نسبت سلولهای تودهٔ سلولی داخلی به کل سلولهای یک جنین تقریباً در همهٔ گروهها یکسان است و با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارد (این به آن معنی است که جنین در هر حال با مکانیسم هایی نسبت تودهٔ سلولی داخلی و تروفواکتودرم را ثابت نگاه می‌دارد) ولی با توجه به جدول ۱ ملاحظه می شود که تعداد کل سلولها، تعداد سلولهای ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی و تروفواکتودرم در گروههای III و IV کاهش یافته است و تحقیقات نشان می دهد که هرچه سلولاریتی در جنین بیشتر باشد، شانس کاشته شدن در رحم و ادامهٔ حاملگی افزایش خواهد یافت (۱۴). بنابراین احتمالاً کاهش میزان implantation و حاملگی در جنینهای گروههای III و IV که در گزارشات آمده است، به دلیل کاهش سلولها در ناحیهٔ تروفواکتودرم (منجر به کاهش implantation) و ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی (منجر به کاهش میزان

حاملگی) می باشد.

کیفیت سلولها در ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی در گروه IV با دو گروه اول بطور معنی داری تفاوت دارد. به طوری که هیچ یک از بلاستوسیستهای گروه IV دارای تودهٔ سلولی داخلی با کیفیت عالی نمی باشد و فقط ۳۰درصد بلاستوسیستهای گروه III دارای تودهٔ سلولی داخلی با کیفیت خوب هستند و ۷۰درصد آنها از نوع پراکنده می باشد.همین امر برای سلولهای ناحیهٔ تروفواکتودرم هم صدق می کند. به این مفهوم که علاوه بر اینکه تعداد سلولها در ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی و تروفواکتودرم کاهش یافته است ،کیفیت آنها نیز مطلوب نمی باشد.

کیفیت نامطلوب بلاستوسیستهای حاصل از جنینهای با میزان فراگمنت بالا و نیز غیر طبیعی بودن آرایش سلولها در ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی و یا نامناسب بودن کیفیت سلولهای تروفواکتودرم همگی عواملی است که باعث می شود این جنینها پس از انتقال به مادر با عدم موفقیت در کاشته شدن و حاملگی روبرو باشند .در مطالعه ای که توسط Ebner و همکارانش انجام یافت، نشان داده شده است که هرچه میزان فراگمنتها در جنین بیشتر باشد، به عبارتی هرچه جنین کیفیت نامطلوب تری داشته باشد پس از انتقال در روز دوم لقاح، میزان حاملگی کاهش می یابد و در عوض میزان ناهنجاریهای کروموزومی که نوزادان به دنیا آمده به آن مبتلا بوده اند از قبیل تریزومی ۱۸ و ۲۱ هیدروسفالی، بسته بودن کانال آنال، هیدروسل، لب شکری، نقص دیوارهٔ بطنی و دهلیزی و غیره افزایش می یابد (۱۲). همچنین در بررسی دیگری توسط Hardison و همکارانش، مشاهده شده است که ۴۸درصد جنینهای فراگمنت از نظر ۷ کروموزوم بررسی شده (X و Y، ۱۳، ۱۶، ۱۸، ۲۱، ۲۲) دچار اشکال هستند (۱۳). که همین شواهد استفاده از این جنینها را در بالین محدود می نماید و به جنین شناسان اجازهٔ ریسک انتقال آنها را نمی دهد.

مطالعات قبلی توسط Jurisicova نشان داده است که ظاهر فراگمنتها در جنینهای اولیه نشاندهندهٔ مرگ سلولی از نوع برنامه ریزی شده (PCD) است (۱۰). این پدیده نوعی مرگ فیزیولوژیک سلول است که با فعال شدن ژنهای ویژه ای آغاز شده و حاصل آن تغییرات مورفولوژیک ویژه ای موسوم به آپوپتوزیس است (۱۶). در آپوپتوزیس کروماتین هسته متراکم شده و به قطعات اولیگونوکلئوزومی شکسته، سیتوپلاسم جوانه زده (budding) و قطعه قطعه جدا می گردد، این قطعات در ناحیه پراکنده شده و پس از مدتی سلولهای فاگوسیتی آنها را می بلعند. نکته ای که در ارتباط با جنین وجود دارد این است که در زمان فراگمنتاسیون جنین ،بلاستومرها هنوز قابلیت و توانایی فاگوسیتوز را کسب نکرده اندو لذا قادر نیستند قطعات سلولی را فاگوسیت نمایند (۱۰).

با وجود اینکه هدف این مطالعه بررسی مکانیسم فراگمنتاسیون نبوده است،ولی از نتایج تکنیک TUNEL چنین برمی آید که، هر چه تعداد فراگمنتها در لابلای بلاستومرهای جنین چهار سلولی بیشتر باشد، تعداد سلولهایی که در مرحلهٔ بلاستوسیست بصورت آپوپتوتیک و نکروتیک هستند، بیشتر خواهد بود.در یک جنین مرحلهٔ بلاستوسیست از گروه IV ۲۳ و ۳۳ درصد سلولها به ترتیب به صورت آپوپتوتیک ونکروتیک هستند. بر اساس یکی از تئوری های موجود در زمینهٔ مکانیسم و اثرات فراگمنتها، حضور فراگمنتها در لابلای سلولهای یک جنین و تبدیل آنها به سلولهای نکروتیک (نکروز ثانویه) شاید علت ایجاد پدیدهٔ آپوپتوزیس در سایر سلولها باشد (۱۷). بنابراین میتوان نتیجه گرفت که هر چه میزان فراگمنتها بیشتر و اندازهٔ آنها بزرگتر باشد، روی بقیهٔ بلاستومرهای سالم تأثیر منفی بیشتری دارد .از اینرو طبیعی است که در گروه IV که بیشترین میزان فراگمنت را در مراحل اولیه تقسیم دارد، در مرحلهٔ بلاستوسیست نیز بیشترین میزان سلولهای مرده (آپوپتوتیک و نکروتیک) را داشته باشد. وجود تعداد اندکی سلول آپوپتوتیک در گروههای I و II طبیعی است چراکه سلولهای ناحیهٔ تودهٔ سلولی داخلی در بلاستوسیستهای اولیه قادر به تولید سلولهای تروفواکتودرم هستند. Handyside و Hunter وقوع پدیدهٔ مرگ سلولی را مکانیسمی برای حذف چنین سلولهایی با قابلیت تبدیل به تروفواکتودرم در بلاستوسیستهای نهایی دانستند (۱۸). Pierce و همکارانش نیز مرگ سلولی را مقابله با ایجاد تروفواکتودرم نا به جا (اکتوپیک) تفسیر کردند (۱۹).

از آنجاکه تعداد جنینهایی که فراگمنت می شوند، بیش از ۵۰درصد گزارش شده است و حذف آنها از پروسهٔ درمان افراد نازا باعث کاهش در موفقیت می‌شود (چرا که در برخی بیماران کل یا تعداد زیادی از جنینهای آنها دچار این پدیده می‌شود) باید تمهیداتی اندیشید تا بتوان از این جنینها استفاده کرد. در تحقیق Pierce و همکارانش دیده شده است که ۴۲درصد جنینهای فراگمنت شده حداقل از نظر هفت کروموزوم بررسی شده نرمال هستند (۱۹). این مطلب و نتایج مطالعهٔ حاضر که تقریبا ۵۰درصد جنینهای گروه I و ۶۰درصد جنینهای گروه II قادرند تا مرحلهٔ بلاستوسیست برسند این نوید را می دهد که کشت این جنینها بصورت طولانی مدت همراه با بررسی کروموزومی آنها در مراحل ابتدایی(چهار تا هشت سلولی) برای اطمینان از نواقص کروموزومی احتمالی، میتواند راهکاری برای دست یابی به موفقیت بیشتر در امر ART باشد.حسن دیگر این روش انتقال جنینها به مادر در مرحلهٔ بلاستوسیست است، یعنی زمانی که رحم آمادگی کامل برای کاشته شدن جنین در خود را دارد و این امر میزان موفقیت بارداری را افزایش داده باعث کاهش چند قلوزایی در مادران می‌شود.

References

1. Trounson A, Sathananthan AH: The application of electron microscopy in the evaluation of two- to four-cell human embryos cultured in vitro for embryo transfer. J In Vitro Fert Embryo Transf 1984; 1: 153-165

2. Warner CM, Exley GE: Genetic regulation of preimplantation mouse embryo survival.J Exp Zoo 1998; 282: 272-279
3. Hardy K: Apoptosis in the human embryo. Rev Reprod 1999; 4: 125-134
4. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF: Involvment of programmed cel death in preimplantation embryo demise. Hum Reprod Update 1995; 1(6): 558-566
5. Munne S, Estop AM: Chromosom analysis of human spermatozoa stored in vitro. Hum Reprod 1993; 8: 581-586
6. Hardy K, Winston RML, Handyside AH: Binucleate blastomers in normally fertilized preimplantation human embryos in vitro:failure of cytokinesis during early cleavage. J Reprod Fertil 1993; 98: 549-558
7. Jamieson ME, Coutts JRT, Conner JM: The chromosom constituation of human preimplantation development.Hum Reprod 1994; 4 : 125-134
8. Alikani M, Cohen J, Tomkin G: Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. Ferti Steril 1999; 71(5): 836-842
9. Ziome CA, Johnson MH: Cell surface induces polarization of mouse 8-cell blastomers at compaction.cell 1980 ; 21 : 935-942
10. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF: Programmed cell death and human embryo fragmentation. Hum Reprod 1996; 2(2) : 93-98
11. Hardy K, Handyside AH, Winston RML: The human blastocyst:cell number,death and alocation during late preimplantation development in vitro. Develop 1989; 107: 597-604
12. Ebner T, Yaman C, Moser M: Embryo framentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcom. Fertil Steril 2001; 76(2): 281-285
13. Hardson T, Caisander G, Sjogren A: A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocyst. Hum Reprod 2003; 18(2): 399-407
14. Vlad M, Walker D, Kennedy RC: Nuclei number in human embryos co-cultured with human ampullary cells.Hum Reprod 1996; 11: 1678-1680
15. Zenzes MT, Casper RF: Cytogenetics of human oocyte,zygotes and embryos after in vitro fetilization. Hum Genet 1992; 88: 367-375
16. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR : Apoptosis: A basic histological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-257
17. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S: A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriat human embryos. Hum Reprod 2001; 16(4) :719-729
18. Handyside AH, Hunter S: Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation.Rouxs Arch Dev Biol 1986 ; 195 : 519-526
19. Pierce CB, Lewellyn AL, Parchment RE: Mechanism of programmed cell death in the blastocyct. Proc National Acad Science USA 1989; 86: 3654-3658