

بررسی اثرات محیط‌های کشت مختلف بر تکامل جنین و سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم انسان

معرفت غفاری (M.D., Ph.D.)^۱، محمد مهدی آخوندی (Ph.D.)^۱، مهناز حیدری (M.S.)^۲.

۱-استادیار، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.

۲-مربی، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.

چکیده

استفاده از کشت همزمان سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم با جنین، یکی از راه‌های تسهیل بررسی تکامل جنین در محیط آزمایشگاه می‌باشد؛ ولی فقدان محیطی مناسب برای تکامل جنین و سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم از مشکلات این روش است. در این مطالعه اثرات محیط‌های مختلف کشت بر روی سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم و تکامل جنین بررسی شده است. سلول‌های لوله رحم از ۱۹ زن زیر ۴۰ سال با سابقه باروری و بدون داشتن ضایعه پاتولوژیک لوله رحم به طریق هیستریکتومی کامل شکمی تهیه گردید. سلول‌های غنی از اپی‌تلیال لوله رحم به صورت آنزیمی و مکانیکی تهیه و در سه محیط کشت RPMI-1640، DMEM/F12 و Ham's F10 کشت داده شدند. پس از ۴ بار پاساژ سلولی، سلول‌ها به مدت ۷ روز بر روی پلاستیک و ماتری ژل به منظور تهیه سلول‌های پولاریزه کشت داده شدند. قابلیت حیات و مرگ سلول‌ها در طی پاساژهای سلولی و بعد از آن به وسیله رنگ‌آمیزی حیاتی نوترال رد و تریپان بلو بررسی گردید. بعلاوه ۱۱۷، ۴۵، ۴۸ جنین اضافی ۸-۴ سلولی انسان به ترتیب در محیط‌های Ham's F10، RPMI-1640، DMEM/F12 به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شد و مورفولوژی آنها هر ۲۴ ساعت بررسی گردید. قابلیت حیات سلول‌ها در طی کشت اولیه و پاساژ سلولی در محیط DMEM/F12 ۱۰۰٪ بود که در مقایسه با RPMI-1640 (۹۵٪) و Ham F10 (۹۳٪) معنی‌دار بود ($P < 0/05$)؛ ولی پس از پاساژ سلولی تفاوت معنی‌داری بین محیط‌های مختلف دیده نشد. درصد جنین‌هایی که در محیط Ham's F10 به مرحله مورولا رسیده بودند ۷۹/۴٪ بود که در مقایسه با RPMI-1640 (۶۸/۸٪) و DMEM/F12 (۶۲/۵٪) بطور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0/05$). از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که محیط DMEM/F12 در طی پاساژ و تکثیر سلول‌های لوله رحمی نسبت به محیط‌های Ham's F10 و RPMI-1640 ارجحیت دارد؛ ولی بعد از پاساژ سلولی و در مرحله کشت همزمان، سلول‌های لوله رحمی با جنین، محیط Ham's F10 نسبت به محیط‌های دیگر مناسب‌تر می‌باشد.

کل واژگان: لوله رحم، هم‌کشتی، تکامل جنین، انسان و محیط‌های کشت.

آدرس مکاتبه: دکتر معرفت غفاری، گروه غدد تولیدمثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده ابن‌سینا، صندوق پستی ۱۷۷-۱۹۸۳۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک: mgaffarin@yahoo.com

مقدمه

تکنیک‌های کمک باروری آزمایشگاهی (ART) بطور قابل ملاحظه‌ای مشکلات زوجهای نابارور را حل نموده است؛ ولی علیرغم گذشت بیش از دو دهه از تولد اولین نوزاد آزمایشگاهی، هنوز میزان تولد نوزاد سالم از طریق ART نسبتاً پایین و در حدود ۲۰٪ باقی‌مانده است. یکی از مهمترین علل کاهش این موفقیت، کیفیت نامطلوب شرایط محیط آزمایشگاهی برای رشد و نمو جنین قبل از لانه‌گزینی می‌باشد. مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های مختلف پستانداران دلالت بر آن دارد که میزان تکامل (۱)، تعداد سلول (۲)، فعالیت بیوشیمیایی (۳)، قدرت حیات (۴) جنین در محیط آزمایشگاه پایین‌تر از محیط داخل بدن می‌باشد. تکامل اکثر جنین‌ها در مرحله ۸-۴ سلولی (زمان فعال‌شدن ژنوم جنین) به دنبال کشت در آزمایشگاه متوقف می‌شود (۵، ۶). توقف تکاملی سبب می‌گردد که در عمل جنین‌ها در مراحل اولیه تقسیم (۸-۴ سلولی) به داخل رحم منتقل شوند و انتقال زودرس جنین‌ها، سبب ناهماهنگی کامل بین رشد و تکامل جنین و اندومتر می‌گردد که به همراه کیفیت بد مورفولوژیک و متابولیکی جنین باعث کاهش میزان لانه‌گزینی و حاملگی می‌شود.

تلاشهای متعدد برای بهبود شرایط محیط کشت به وسیله تعدیل الکترولیت‌ها و منابع انرژی با محدودیت‌هایی در موفقیت روبرو شده است (۷، ۸). ابداع سیستم کشت همزمان جنین با استفاده از انواع مختلف سلول‌های حمایت‌کننده وسیله مؤثرتری برای نگهداری و رشد و تکامل جنین در محیط آزمایشگاه فراهم نموده است و به ما اجازه می‌دهد تا میزان تکامل جنین را بهبود بخشیم و در نهایت میزان حاملگی را افزایش دهیم (۹). متداولترین رده‌های سلولی مورد استفاده برای تکامل جنین انسان سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم گوساله^۲ (۱۰)، سلول‌های کلیه میمون سبزی

آفریقایی^۳ (۱۱)، سلول‌های گرانولوزا (۱۲) و سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم انسان می‌باشند (۱۳). میزان موفقیت سیستم کشت همزمان بستگی به رده‌های مختلف سلولی و محیط‌های کشت مورد استفاده برای نگهداری سلول‌ها دارد. با توجه به نقش بالقوه سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم در تکامل جنین قبل از لانه‌گزینی در داخل بدن، به نظر می‌رسد این سلول‌ها بهترین سلول حمایت‌کننده در سیستم کشت همزمان برای تکامل جنین در محیط آزمایشگاه^۴ می‌باشند (۱۴).

تاکنون محیط‌های مختلفی از جمله RPMI-1640, Ham's F10, DMEM/F12 در کشت سلول به کار برده شده است؛ ولی تاکنون در هیچ کدام از این مطالعات مقایسه‌ای بین اثرات این محیط‌ها با یکدیگر و بر روی تکامل جنین و سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم به طور جداگانه در محیط آزمایشگاهی به عمل نیامده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات این محیط‌ها بر روی سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم انسان (کشت داده شده به روش منولایر و پولاریزه) در مراحل کشت اولیه و پاساژ سلولی و تکامل جنین در محیط آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روشها

۱- تهیه بافت لوله رحم انسان

بافت لوله رحم از بین مراجعین بخش جراحی زنان بیمارستان میرزا کوچک‌خان، پس از هیستریکتومی کامل شکمی از ۱۹ زن بین سنین ۳۱-۴۵ سال، با سابقه حداقل یک حاملگی موفق و سیکل قاعدگی منظم ۲۵ تا ۳۵ روز، به دلیل فیبروئید رحمی یا دلایل دیگر بدون وجود اشکال پاتولوژیک در لوله رحم تهیه شد. تمام بافت‌ها با اطلاع و رضایت کامل بیماران و مجوز کمیته اخلاقی پژوهشکده ابن‌سینا جمع‌آوری شدند. سپس لوله‌های رحمی در شرایط استریل داخل محلول

3-Vero
4-In vitro

1-Assisted Reproductive Technology
2-Bovine

اثرات محیط‌های مختلف کشت بر روی سلول‌های لوله رحم و جنین

HBSS ۱۰٪ (Sigma, USA) که حاوی پنی‌سیلین ۱۰۰ IU/ml و استرپتومایسین ۱۰۰ µg/ml (Sigma, USA) بود، قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شد.

۲- کشت اولیه سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم به صورت منولاین:

ابتدا لوله رحم در ظرف کشت^۲ قرار داده و با HBSS استریل شستشو شد و سپس لوله توسط پنس و قیچی به صورت طولی از ناحیه شیپور تا انتها برش داده شد تا قسمت داخلی مشخص گردد. پس از آن تکه‌های کوچک بافت پوششی (به ابعاد ۱mm^۳) از قسمت آمپول لوله رحم توسط قیچی بریده شد و سپس توسط تیغ اسکالپل به تکه‌های کوچکتری تقسیم گردید و به داخل لوله سانتریفوژ حاوی ۵ml از محلول کلاژناز^۳ ۰/۲۵٪ درجه نوع ۴ (Sigma, USA) که در HBSS ۱۰٪ (Sigma, USA) تهیه شده بود منتقل و در درجه حرارت ۳۷^۰C به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. در این مدت لوله با ورتکس هر ۱۵ دقیقه تکان داده می‌شد. پس از ۱ ساعت سلول‌های جدا شده از هم، ته‌نشین شدند. قسمت روئی (حاوی کلاژناژ) برداشته شد و سپس بافت ته‌نشین شده با ۵ml HBSS ۱۰٪ بصورت سوسپانسیون سلولی درآمد. پس از آن محلول روئی برداشته و بطور مساوی در سه لوله سانتریفوژ ریخته شد و با دور ۱۰۰۰g برای مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس قسمت روئی دور ریخته و رسوب‌ها با ۵ml محیط‌های کشت DMEM/Ham's F12 و RPMI و Ham's F10 حاوی پنی‌سیلین ۱۰۰ IU/ml و استریتومایسین ۱۰۰ mg/ul (Sigma, USA)، ۲/۵٪ سرم جنین گوساله (GIBCO, Germany) و ۲/۵٪ NU سرم (GIBCO, Germany) به حالت تعلیق درآمدند. لازم به ذکر است محیط Ham's F10 علاوه بر مواد فوق شامل کلسیم لاکتات ۲/۵٪ و بی‌کربنات سدیم بود. سپس

1-Hank's Balance Salt Solution
2-Petri dish
3-Collagenaze

دکترغفاری و ...

سلول‌ها به داخل فلاسک ۲۵ml ریخته شدند و داخل انکوباتور با دمای ۳۷^۰C، حاوی ۵٪ CO₂ به مدت ۳ روز بدون تکان دادن قرار گرفتند. فلاسک‌ها سپس در روز چهارم به وسیله میکروسکوپ نوری بررسی و همزمان با مشاهده جزایر یا تکه‌های سلولی چسبیده به فلاسک محیط‌های کشت تعویض شدند. همزمان با تشکیل پوشش تک لایه‌ای سلولی^۴ (حدود روز هفتم) سلول‌ها به داخل فلاسک دیگری پاساژ داده شدند. میزان موفقیت جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال از سایر سلول‌های لوله رحمی به وسیله میکروسکوپ با فاز کنتراست (Olympus, Japan) یا ایمنوهیستوشیمی بررسی شد.

۳- پاساژ سلولی

ابتدا محیط کشت داخل فلاسک خارج شد و سپس سلول‌های داخل فلاسک در مجاورت ۲-۳ml از محلول تریپسین ۰/۲۵٪ (Merck, Germany) قرار گرفتند و به مدت ۲ دقیقه در دمای ۳۷^۰C انکوبه شدند. بعد از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک سوسپانسیون سلولی به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰g سانتریفوژ شد. سپس سلول‌ها با HBSS دو بار شستشو شد تا آنزیم‌های تریپسین فعال حذف گردد. پس از آن روی رسوب سلولی محیط کشت اضافه شد و بعد از گذشت ۵-۴ روز، سلول‌هایی که در طی عمل آنزیم تریپسین از سطح فلاسک جدا شده بودند به تدریج اتصالات خود را به سطح پلیت ایجاد کرده و سلول‌ها شروع به رشد و تکثیر نمودند. در این مطالعه تا ۴ مرحله پاساژ سلولی انجام گرفت.

۴- کشت پولاریزه سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم

نوع HA Milli Cell Insert با پرزهای ۰/۵µm (Millipore, USA) در داخل پلیت کشت ۲۴ حفره‌ای گذاشته و حدود ۲۰۰µl از ماتریکس خارج سلولی

4-Confluence

(Uniscience Collaborative Biomedical (Matrigel) Products, Bedford, USA) داخل میلی‌سل ریخته و بعد ۵۰۰ μ l سوسپانسیون سلول‌های اپی‌تلیال روی ماتری ژل قرار داده شد و ۰/۵ml محیط کشت در اطراف میلی‌سل ریخته شد تا محیط کشت از طریق سوراخ‌های قسمت تحتانی میلی‌سل به سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم برسد. سپس پلیت در یک انکوباتور با ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ O₂ و درجه حرارت ۳۷°C گذاشته و ۷۲ ساعت بعد محیط کشت تعویض شد. سلول‌ها به مدت ۷ روز کشت داده شدند و سپس زیر میکروسکوپ نوری (Ziss-Germany) مورد مطالعه قرار گرفتند.

۵- نوع سلول کشت داده شده :

میزان موفقیت جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال از سایر سلول‌های لوله رحمی به وسیله میکروسکوپ با فاز کنتراست یا ایمونوهیستوشیمی بررسی شد.

۱-۵- روش ایمونوهیستوشیمی (۱۵):

تمام مواد شیمیایی بکار رفته در این آزمایش از Sigma تهیه شده است. سلول‌های منولایر اپی‌تلیال اولیه و پاساژ داده شده برای سایتوکراتین و ویمنتین رنگ‌آمیزی شدند تا طبیعت اپی‌تلیالی آنها تأیید گردد. نیمی از سلول‌ها برای شناسایی سایتوکراتین (تعیین مورفولوژی اپی‌تلیال) و نصف دیگر از سلول‌ها برای شناسایی ویمنتین (تعیین مورفولوژی فیبروبلاستیک) رنگ‌آمیزی ایمونوشیمی شدند. ابتدا محیط سلول‌ها تعویض شد و سپس سلول‌ها به مدت ۱/۵ دقیقه با محلول ۵۰:۵۰ استن و متانل مجاور و با بافرتریس^۱ ۰/۰۵M در سالیان ایزوتونیک ۰/۱۵M شستشو داده شد. پس از آن سلول‌ها با آنتی‌بادی اولیه سایتوکراتین با رقت ۱:۴۰۰ و آنتی ویمنتین با رقت ۱:۲۰۰ که توسط بافرتریس رقیق شده بودند را به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه و سپس با بافرتریس در رقت ۱:۲۰ از آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی

(DAKO, DK-2600 Glostrup, Denmark) تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد تا از هر گونه واکنش متقاطع جلوگیری شود. محلول آنتی‌آلکالین فسفاتاز موشی که حاوی یک محلول سوبسترا/رنگ^۲ شامل ۲mg نفتول فسفات^۳، ۰/۲ml دی‌متیل فرمامید^۴، ۱۰ml محلول لوامیزول^۵ ۱M و ۱۰mg TR Fast Red Salt بود و در ۱۰ml بافرتریس تهیه شده بود به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و سپس از محلول رقت ۱:۴۰ در بافرتریس تهیه شد و سلول‌ها بعد از شستشو به مدت ۳۰ دقیقه با آن انکوبه شدند. و سرانجام سلول‌ها با تریس شستشو داده شد و بعد با Gill's Haematoxylin^۶ به مدت ۱ دقیقه انکوبه و بعد بر روی لام قرار داده شدند و توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۶- قابلیت زیست و کیفیت سلول‌ها

۱-۶- بررسی مورفولوژیک سلول‌ها با میکروسکوپ نوری:

سلول‌ها در زیر میکروسکوپ به صورت کشت منولایر و کشت پولاریزه کاملاً شفاف می‌باشند و نور را از خود عبور می‌دهند. در صورتی که سلول‌های غیر طبیعی و در حال مرگ به صورت تیره و با گرانول‌های داخلی کاملاً مشخص دیده می‌شوند که در اینصورت مسلم است که سلول‌ها وارد فاز مرگ شده‌اند.

۲-۶- روش رنگ سنجی (۱۶):

از محلول ذخیره ۵mg/ml قرمز خنثی^۱ (۳- آمینو ۳-۷- دی‌متیل‌آمینو ۲- متیل فنازین هیدرو کلراید) (Merck-Germany) با رقت ۴۰ μ g/ml در آب مقطر تهیه و به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. سپس لوله حاوی قرمز خنثی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰g سانتریفوژ گردید تا رسوب‌های کریستالی از محیط رنگ خارج شود. از محلول روئی رنگ برای انجام آزمایشات استفاده شد. پس از آن محیط رویی

2-Substrate/ Stain

3-Naphtol AS Phosphate

4-Dimethyl formamide

5-Levamisole

6-Neutral red

1-Buffer tris

اثرات محیط‌های مختلف کشت بر روی سلول‌های لوله رحم و جنین

سلول‌ها به آرامی خارج و $200 \mu l$ از رنگ قرمز خنثی به آن اضافه و به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند (سلول‌های زنده، رنگ قرمز خنثی را توسط لیزوزم‌های غشاء سیتوپلاسمی سلول جذب می‌کند و بعد از ثابت کردن سلول‌ها با فرمالدئید و لیز سلولی با اتانل و اسید استیک میزان رنگ آزاد شده از سلول‌های زنده توسط دستگاه الایزایدر^۱ در طول موج $540 nm$ خوانده شد و آنگاه درصد سلول‌های زنده نسبت به مرده محاسبه گردید.

۳-۶- روش رنگ‌سنجی Trypan blue (۱۶):

تریپان بلو (Merck-Germany) 0.4% در PBS^۲ تهیه شد. ابتدا سلول‌ها در معرض تریپسین قرار داده شد و سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱:۱ (رقت سلول به تریپان بلو) تهیه گردید و بر روی لام نئوبار قرار داده شد. با شمارش تعداد سلول‌های مرده توسط میکروسکوپ، نسبت سلول‌های مرده به کل سلول‌های موجود و درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید.

۷- بررسی محیط‌های کشت مختلف بر روی قابلیت حیات سلول‌های لوله رحم انسان:

قابلیت زیست سلول‌های لوله رحمی در محیط‌های کشت ROMI-1640, DMEM/Ham's F12 و Ham's F10 در مرحله کشت اولیه و پاساژ بوسیله رنگ‌آمیزی حیاتی مورد مطالعه قرار داده و مقایسه شد.

۸- تهیه جنین‌های اضافه و ارزیابی آنها از نظر مورفولوژیکی:

تعداد ۲۱۰ جنین اضافه از بیماران تحت درمان با IVF^۳ یا ICSI^۴ تهیه شد. از تمام بیماران رضایت‌نامه کتبی برای استفاده از جنین‌های اضافه آنها دریافت شد. در این بیماران برای تحریک تخمک گذاری از پروتوکل طولانی (Buserelin, Hoechst) GnRHa و HMG (Pergonal, Serono) استفاده گردید. پاسخ به درمان به

- 1-ELISA Reader
- 2-Phosphat Buffer Saline
- 3-In Vitro Fertilization
- 4-Intracytoplasmic Sperm Injection

دکترغفاری و ...

وسیله سونوگرافی لگنی واژینال با دستگاه (Aloka-SD900-Japan) و اندازه‌گیری مکرر میزان استرادیول سرم پی‌گیری شد. تخمک گذاری بوسیله 10000 واحد HCG بطور عضلانی تحریک گردید. ۳۶ ساعت بعد تخمکها با هدایت سونوگرافی جمع‌آوری شد. پس از انجام IVF یا ICSI باروری اوسیت ۲۰-۱۶ ساعت بعد از تلقیح به وسیله وجود دو پرونوکلئوس تأیید شد. ۴۸ ساعت بعد، بعد از جمع‌آوری تخمک، حدود ۴ جنین ۴-۸ سلولی به داخل رحم منتقل گردید و بقیه جنین‌ها پس از ارزیابی آنها از نظر مورفولوژی و عدم درخواست زوج برای منجمد کردن جنین‌های اضافه، امکان استفاده این جنین‌ها، برای تحقیقات بعدی فراهم شد.

۹- بررسی محیط‌های کشت مختلف بر روی تکوین جنین‌های انسان:

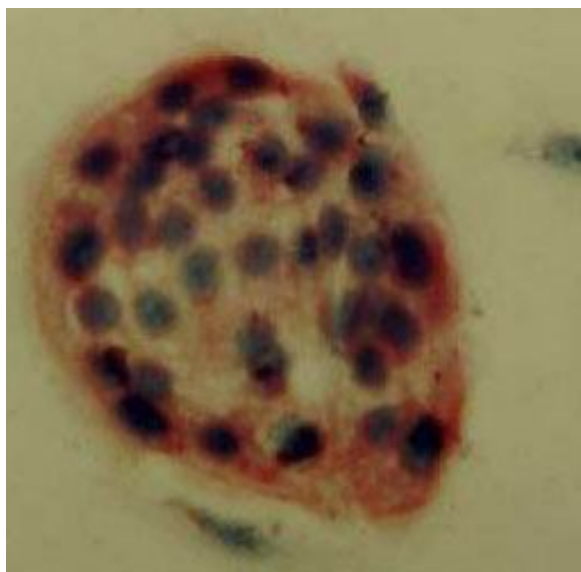
جنین‌های اضافی بدست آمده ابتدا از نظر مورفولوژی بررسی و پس از درجه‌بندی، در محیط‌های کشت DMEM/Ham's F12, RPMI-1640, Ham's F10 قرار داده شدند و مراحل رشد و تقسیم آن تا مرحله بلاستوسیست توسط میکروسکوپ اینورت لوپ در زمانهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج با استفاده از آزمون مجذور کا و با $P < 0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

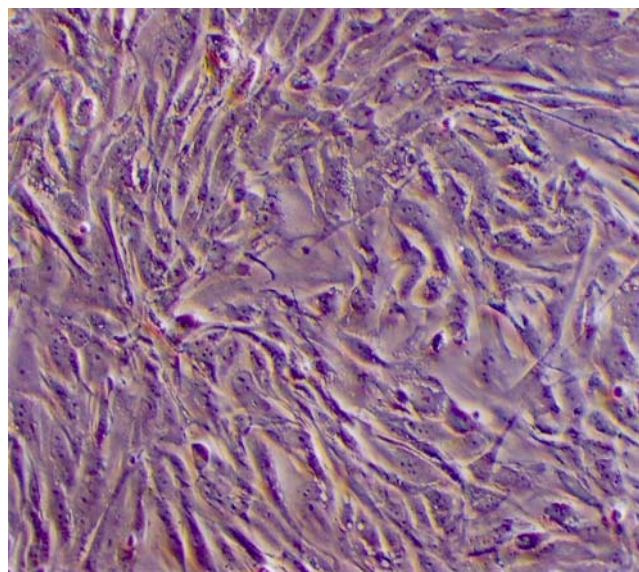
کیفیت و نوع سلول طی کشت اولیه و پاساژ سلول‌های آمپول لوله رحم:

مشاهده کشت اولیه سلول‌های آمپول لوله رحم توسط میکروسکوپ اینورت Phase-Contrast در روز ۷-۶ نشان داد که سلول‌ها بسیار متراکم هستند و الگوی اپی‌تلیوئیدی دارند و حرکت مژکها قابل رؤیت می‌باشد. همچنین چندین توده سلولی در حال تقسیم میتوز دیده

5-Freeze



شکل شماره ۲- تصویر ایمنوهیستوشیمی سلول‌های لوله رحم بعد از ۵ روز کشت منولایر-سلول‌های آنتی‌سایتوکراتین مثبت (سلول‌های اپی‌تلیال) به طور فراوان دیده می‌شود



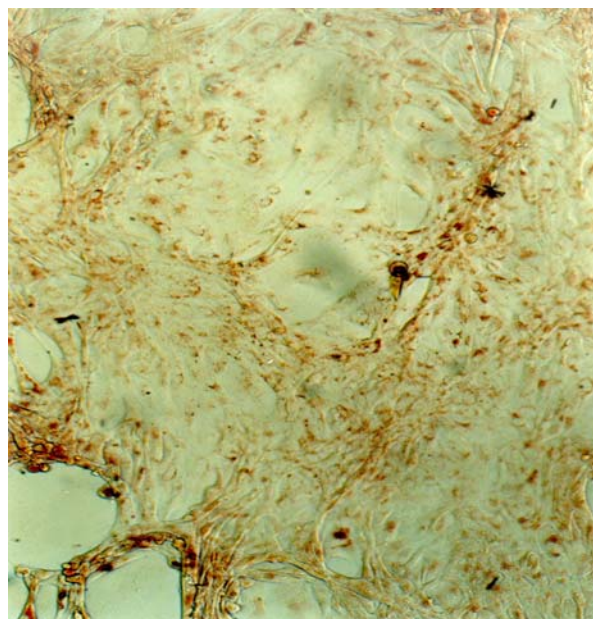
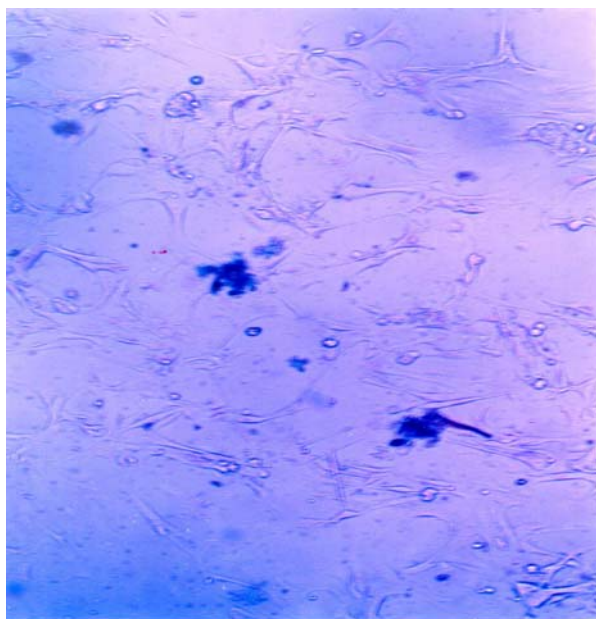
شکل شماره ۱- مورفولوژی سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم بعد از گذشت ۴-۵ روز در محیط کشت DMEM/Ham's F12 و با تشکیل پوشش سلولی تک لایه ۱۰۰٪

کشت پولاریزه سلول‌های آمپول لوله رحم انسان: سلول‌های اپی‌تلیالی در کشت منولایر از نظر ساختمانی بصورت پهن، اپی‌تلیوئیدی و سنگفرشی بودند و تا زمانیکه تمام سطح پلاستیک را اشغال کنند به رشد خود ادامه دادند و میتوز فراوان داشتند. در صورتیکه سلول‌ها در کشت پولاریزه میتوز محدود و پولاریزه داشتند و مانند حالت *in vivo* تمام سطوح فوقانی، تحتانی، جانبی سلول‌ها از همدیگر قابل تشخیص بود.

قابلیت زیست سلول‌ها در محیط‌های کشت مختلف: نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی حیاتی نشان داد که قابلیت حیات سلول‌ها در طی کشت اولیه سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم در محیط‌های کشت DMEM/F12 RPMI-1640 و Ham's F10 به ترتیب ۹۹/۸٪، ۹۵٪ و ۹۳٪ بود که بطور معنی‌داری محیط کشت DMEM/F12 نسبت به دو محیط دیگر ارجحیت داشت. ولی پس از پاساژ سلولی و کشت سلول‌ها و

شد. هیچ رابطه‌ای بین رشد و کیفیت سلول در محیط آزمایشگاه با سن بیمار و مرحله سیکل قاعدگی مشاهده نشد. سلول‌های جمع‌آوری شده در مرحله فولیکولی و ترشخی همگی ظاهر اپی‌تلیوئیدی در کشت اولیه داشتند. (شکل شماره ۱) بررسی ایمنوهیستوشیمی انجام شده در کشت اولیه نشان داد که اکثریت (۹۸٪) سلول‌های کشت داده شده از نوع اپی‌تلیالی بوده و درصد سلول‌های استروما بسیار اندک می‌باشد (شکل شماره ۲).

سلول‌ها تا چندین پاساژ (چهار پاساژ در این مطالعه) قادر به زنده ماندن بودند. در طی پاساژها زمان لازم برای تشکیل حالت پوشش سلولی تک لایه حدود ۴ روز بود. مورفولوژی سلول‌ها با ادامه پاساژ تغییر می‌کرد. بطوریکه در پاساژ اول، سلول‌ها اپی‌تلیوئیدی بودند در صورتی که در پاساژ دوم و سوم سلول‌ها شبیه سلول‌های فیروپلاست بودند که ظاهری دراز، دوکی شکل با چندین زائده سیتوپلاسمیک دراز داشتند.



شکل شماره ۳- قابلیت حیات سلولی به روش قرمز خنثی

شکل شماره ۴- قابلیت حیات سلولی به روش تریپان بلو

انجام کشت پولاریزه تفاوت معنی‌داری در قابلیت حیات بین محیط‌های کشت مختلف دیده نشد.

مقایسه میزان رشد و تکامل جنین‌های ۴-۸ سلولی در محیط‌های کشت مختلف:

میزان رشد و تکامل جنین‌های ۴-۸ سلولی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. درصد جنین‌ها ۴-۸ سلولی که پس از ۷۲ ساعت به مرحله ۸ سلولی (مورولا) رسیده‌اند بطور معنی‌داری در محیط Ham'sF10 ($P < 0.05$) نسبت به محیط DMEM/F12, RPMI-1640 (شکل شماره ۳). تنها ۶ مورولا (۵/۱٪) جنین‌ها در محیط Ham'sF10 به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند و در محیط‌های DMEM/F12 و RPMI-1640 هیچ جنین ۴-۸ سلولی به مرحله بلاستوسیست نرسیده بود. تفاوت معنی‌داری بین محیط‌های کشت RPMI-1640 و DMEM/Ham'sF12 در تکامل جنین ۴-۸ سلولی به مرحله مورولا و بلاستوسیست دیده نشد ($P > 0.05$).

بحث

در این مطالعه به منظور ایجاد شرایطی مناسب و مشابه با داخل بدن برای رشد و تکامل جنین قبل از لانه‌گزینی، سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم به دو روش منولایر و پولاریزه کشت داده شدند و قدرت حیات و کیفیت آنها بعد از کشت اولیه و چند بار پاساژ سلولی با محیط‌های مختلف کشت مقایسه شد. با توجه به اینکه لقاح و مراحل تکاملی رشد جنین تا مرحله بلاستوسیست در داخل لوله رحم رخ می‌دهد و سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم گلیکوپروتئین خاصی تولید می‌کند که مانع توقف تکاملی جنین در مرحله ۴-۸ سلولی می‌شود (۱۷) و بعلاوه تماس و میانکنش^۱ بین جنین و سلول‌های لوله رحم باعث تکامل جنین می‌شود (۱۸). اخیراً نشان داده شده که چندین فاکتور مفید برای رشد جنین مانند CSF-1، LIF، EGF،

1-Interaction

2-Colony Stimulation Factor

جدول شماره ۱- مقایسه میزان رشد و تکامل جنین‌های ۴-۸ سلولی در محیط‌های کشت مختلف

تعداد جنین در مرحله بلاستوسیست	تعداد جنین در مرحله مورولا	تعداد جنین ۴-۸ سلولی	مراحل جنینی محیط
۶ (٪۵/۱)	۹۳ (٪۷۹/۴)	۱۱۷	Ham'sF10
۰ (٪۰)	۳۱ (٪۶۸/۸)	۴۵	RPMI/1640
۰ (٪۰)	۳۰ (٪۶۲/۵)	۴۸	DMEM/F12

* با توجه به نتایج جدول فوق می‌توان نتیجه گرفت که تکوین جنین در محیط Ham'sF10 به طور معنی‌داری بیش از RPMI-1640, DMEM/F12 بوده است ($P < 0.05$).

بهترین حالت برای داشتن شرایطی مشابه با داخل بدن استفاده از کشت لوله رحم دست نخورده^۲ می‌باشد. اگر چه بافت از نظر ساختمانی در این روش تغییر نمی‌کند ولی بدلیل عدم پرفیوژن^۳ و نرسیدن محیط کشت به قسمتهای مرکزی، بافت سریعاً نکروزه شده و از بین می‌رود. لذا استفاده از این مدل در سیستم کشت همزمان مقدور نبوده است؛ زیرا نیاز دارد که سلولها حداقل ۶-۵ روز در محیط کشت زنده باقی بمانند تا جنین به مرحله بلاستوسیت برسد. لذا ما در این مطالعه از کشت سلولی منفرد (منولایر و پولاریزه) استفاده نمودیم.

این مطالعه نشان داد که در کشت اولیه بدون در نظر گرفتن زمان انجام بیوپسی (مرحله فولیکولی یا ترشخی سیکل قاعدگی) بطور موفقیت آمیزی در روز ۶-۷ پوشش تک لایه سلولی ایجاد می‌شود و سلولها قادر به زنده ماندن بمدت طولانی می‌باشند. اکثر سلولها در این کشت منشأ اپی‌تلیوئیدی داشتند که بعد از پاساژهای سوم و چهارم سلولها از حالت اپی‌تلیوئیدی بحالت فیبروبلاستی تبدیل شدند. این نتایج با یافته‌های Yeung و همکاران (۲۲)، Bongso و همکاران (۲۳) و Takeuchi

IL-2^۴ به وسیله سلولهای اپی‌تلیال لوله رحم تولید می‌شود (۱۹-۲۰). بنابراین به منظور رسیدن به حالت فیزیولوژیک و مشابه با داخل بدن، در این مطالعه از سلولهای اپی‌تلیال لوله رحم انسان استفاده شد. اگر چه مطالعات مختلف نشان داده است که کشت همزمان با استفاده از سلولهای با منشأ لوله رحمی (۱۳) و غیر لوله رحمی (۱۱-۱۲) هر دو قادر به بهبود رشد و تکامل جنین در محیط آزمایشگاهی می‌باشند؛ ولی مطالعه مقایسه‌ای بین تأثیر سلولهای با منشأ لوله رحمی و غیر لوله رحمی بر روی تکامل جنین در محیط آزمایشگاه صورت نگرفته است. بعلاوه استفاده از سلولهای لوله رحم حیوانی از نظر اخلاقی مطلوب نبود زیرا خطر انتقال بیماری‌های ناشناخته حیوانی به جنین یا مادر وجود دارد.

در این مطالعه از لوله رحمی غیرپاتولوژیک استفاده شد. زیرا محیط پاتولوژیک لوله رحم در هیدروسالپینکس میزان حاملگی را کاهش و سبب افزایش سقط جنین می‌شود که ممکن است به دلیل عملکرد و ترشحات مضر سلولهای اپی‌تلیال لوله رحم باشد (۲۱).

3-Leukemin Inhibitory Factor
4-Epidermal Growth Factor
1-Interleukin-2

2-Explant culture
3-Perfusion

رحم، سلول‌های مژک‌دار عملکرد خود را از دست داده و نقش ترش‌خی به خود می‌گیرند. همچنین با توجه به اینکه مژک‌سازی در سلول‌های اپی‌تلیال در انتهای فاز فولیکولی سیکل قاعدگی به دنبال افزایش میزان هورمون استروژن ایجاد می‌شود (۲۶). فقدان این هورمون در محیط آزمایشگاه ممکن است سبب از دست رفتن مژک این سلول‌ها شود. به نظر می‌رسد سلول‌های ترش‌خی در حضور مواد مغذی موجود در محیط کشت خیلی فعال می‌باشند و ترشحات زیادی را داخل محیط آزاد می‌کنند؛ لذا بهتر است سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم برای انجام کشت هم‌زمان را بعد از پاساژ اولیه استفاده کرد.

این مطالعه همانند مطالعه قبلی ما نشان داد که سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم در هنگام کشت بر روی پلاستیک، مورفولوژی پولاریزه خود را از دست می‌دهند. مطالعه قبلی نشان داده بود که سلول‌های اپی‌تلیال اندومتر در کشت منولایر، مورفولوژی پولاریزه خود را از دست می‌دهد (۲۷). با توجه به اینکه علت پولاریزه شدن سلول‌های اپی‌تلیالی اتصال مولکول‌های چسبنده سلولی (اینترگرین)^۱ به ماتریکس خارج سلولی (ECM)^۲ می‌باشد (۲۸) لذا در این مطالعه به منظور تولید سلول‌های پولاریزه اپی‌تلیال لوله رحم مشابه با حالت *in vivo* سلول‌های لوله رحمی پس از پاساژ سلولی بر روی ECM کشت داده شد تا سلول‌های اپی‌تلیالی پولاریزه به دست آید. با توجه به اینکه مورفولوژی سلول با عملکرد آن ارتباط دارد (۲۷)؛ احتمالاً استفاده از سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم پولاریزه نسبت به غیر پولاریزه در کشت هم‌زمان ارجحیت خواهد داشت.

یکی از مشکلات مهم در کشت هم‌زمان عدم وجود محیطی مناسب برای کشت هم‌زمان سلول‌های لوله رحم و جنین می‌باشد. برای مثال محیطی که معمولاً



شکل شماره ۵- کشت جنین در محیط کشت Ham'sF10 در وضعیت مورولا

و همکاران (۲۴) که به ترتیب از محیط‌های RPMI/1640, DMEM/F12 و Ham'sF10 برای رشد و تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم انسان استفاده نمودند مطابقت داشت. لذا با توجه به تغییر ماهیت و مورفولوژی سلول‌ها در طی پاساژهای مختلف بهتر است از پاساژهای سوم به بعد برای کشت هم‌زمان استفاده نشود.

سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحم از دو نوع مشخص مژک‌دار و ترش‌خی می‌باشند (۲۵). این مطالعه نشان داد که در مرحله کشت اولیه هر دو سلول مژک‌دار و ترش‌خی دیده می‌شود که با ادامه پاساژ سلولی، سلول‌های مژک‌دار، مژک خود را از دست می‌دهند و تبدیل به نوع ترش‌خی می‌شوند یا در آزمایشگاه می‌میرند و اجازه می‌دهند که نوع ترش‌خی در پاساژهای اول به بعد اکثریت سلول‌ها را تشکیل دهند. احتمالاً بدلیل فقدان نقش فیزیولوژیک برای انتقال تخمک و جنین در محیط آزمایشگاه و فقدان حرکات پریستالتیک لوله

1-Intergrine

2-Extra Cellular Matrix

بطوریکه ۹۳٪ جنین‌ها پس از ۷۲ ساعت به مرحله مورولا رسیده بودند که این نتایج در مقایسه با نتایج Feng و همکاران (۳۱) بهتر می‌باشد. Feng و همکاران اثر Ham's F10 بعلاوه سرم انسانی را بر روی اوسیت‌های بارور شده انسان مطالعه کرده و نشان داده‌اند که بعد از ۷۲ ساعت ۴۵٪ جنین‌ها به مرحله مورولا می‌رسند. علت این تفاوت شاید دلیل تفاوت در نوع بیماران با کیفیت تخمک و اسپرم یا محیط آزمایشگاه باشد. لذا پیشنهاد می‌شود ابتدا از محیط کشت DMEM/ F12 برای تکثیر و پاساژ سلول‌ها استفاده کرده و در هنگام قراردادن جنین، محیط کشت از DMEM/F12 به Ham's F10 تغییر داده شود.

تشکر و قدردانی

مؤلفین مقاله از معاونت تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به دلیل تأمین اعتبار طرح و از مسئولین اطاق عمل بیمارستان میرزا کوچک‌خان به دلیل تهیه بافت لوله رحم تشکر و قدردانی می‌کنند.

برای سلول‌های لوله رحمی مناسب است برای جنین نامناسب بوده و عکس آن هم معمولاً دیده می‌شود (۲۹). بدین منظور در این مطالعه استفاده از محیط‌های متداول کشت برای سلول‌های لوله رحمی و اثرات آنها را ابتدا بر روی سلول‌های لوله رحمی در مرحله کشت اولیه و پاساژ‌های سلولی در حالت منولایر و پولاریزه بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بهترین محیط کشت برای مرحله اولیه کشت و پاساژ اولیه سلول‌ها به ترتیب DMEM/ F12 (با قابلیت حیات تقریباً ۱۰۰٪)، RPMI-1640 (با قابلیت حیات ۹۵٪) و Ham's F10 (با قابلیت حیات ۹۳٪) می‌باشد؛ ولی در طی پاساژ‌های دوم، سوم و چهارم سلول‌ها در محیط کشت منولایر و پولاریزه تفاوت معنی‌داری بین محیط‌های کشت مختلف دیده نشد ($P < 0.05$). مطالعات مختلف نیز بر مناسب بودن محیط کشت DMEM/ F12 بر رشد و تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال لوله رحمی دلالت می‌کند (۲۹-۳۰). بررسی اثر همین محیط‌های کشت بر روی تکوین جنین‌های ۴-۸ سلولی نشان داد که Ham's F10 به طور معنی‌داری بهتر از RPMI- 1640, DMEM/ F12 بود.

References

- 1-Erbach G.T., Lawitts J.A., Papaioannou V.E., Biaggers J.D. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod.* 1994;50(5):1027-33.
- 2-Harlow G.M., Quinn P. Development of preimplantation mouse embryos in vivo and in vitro. *Aust J Biol Sci.* 1982;35(2):187-93.
- 3-June T., Fischer B. Correlation between diameter and DNA or protein synthetic activity in rabbit blastocysts. *Biol Reprod.* 1988;39(5): 1111-6.
- 4-Carney E.W., Foote R.H., 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(2):543-51.
- 5-Telford N.A., Watson A.J., Schultz G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev.* 1990; 26(1): 90-100. Review.
- 6-Braude P., Bolton V., Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature.* 1988;332(6163):459-61.
- 7-Quinn P., Kerin J.F., Warnes G.M. 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(4):493-8.

- 8-FitzGerald L., DiMattina M. An improved medium for long-term culture of human embryos overcomes the in vitro developmental block and increases blastocyst formation. *Fertil Steril.* 1992; 57(3):641-7.
- 9-Thibodeaux J.K., Godke R.A. In vitro enhancement of early-stage embryos with co-culture. *Arch Pathol Lab Med.* 1992 ;116(4):364-72. Review.
- 10-Wiemer K.E., Hoffman D.I., Maxson W.S., Eager S., Muhlberger B., Fiore I., Cuervo M. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. *Hum Reprod.* 1993; 8 (1):97-101.
- 11-Menezo Y.J., Guerin J.F., Czyba J.C. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod.* 1990;42(2):301-6.
- 12-Quinn P., Margalit R. Beneficial effects of co culture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet.* 1996;13(1):9-14.
- 13-Vlad M., Walker D., Kennedy R.C. Nuclei number in human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod.* 1996; 11 (8):1678-86.
- 14-Bongso A., Ng S.C., Fong C.Y., Ratnam S. Cocultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril.* 1991;56(2):179-91. Review.
- 15-Biallie H.S., Pacey A.A., Warren M.A. Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Hum Reprod.* 1997;12:1985-1992.
- 16-Babich M., Borenfreund E. Application of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology. *ATLA* 1991;18:129-144.
- 17-Wagh P.V., Lippes J. Human oviductal fluid proteins. V. Identification of human oviductin-I as alpha-fetoprotein. *Fertil Steril.* 1993;59(1): 148-56.
- 18-Joo B.S., Kim M.K., Na Y.J., Moon H.S., Lee K.S., Kim H.D. The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertil Steril.* 2001;75(1):193-9.
- 19-Barmat L.I., Worriow K.C., Paynton B.V. Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver coculture cells. *Fertil Steril.* 1997; 67(4):775-9.
- 20-Ghaffari M., et al. Leukaemia inhibitory factor in human postmenopausal endometrial and Fallopian tube cells in vivo and in vitro. 11th world congress on human reproduction, Montreal, Canada (2002)P-012.
- 21-Murray C.A., Clarke H.J., Tulandi T., Tan S.L. Inhibitory effect of human ydrosalpingeal fluid on mouse preimplantation embryonic development is significantly reduced by the addition of lactate. *Hum Reprod.* 1997;12(11):2504-7.
- 22-Yeung W.S.B., Ho P.C., Lau E.Y.L., Chan S.T.H. Improved development of human embryos in vitro by a human oviducal cell co-culture system. *Human reproduction.* 1992;7:1144-1149.
- 23-Bongso A, Ng SC, Sathanathan A.H., Ng PL, rauff M., Ratnam S.S. Establishment of human ampullary cell cultres. *Hum Reprod.* 1989;4:486-494.
- 24-Kazuhiro Takeuchi, Yukihiro Nagata, Bruce A., Sandow, Gary D, Hodgen. Primary culture of human fallopian tube epithelial cells and co-culture of early mouse per-embryos. *Molecular reproduction & development.* 1992;32:236-242.
- 25-Patek E. The epithelium of the human Fallopian tube. A surface ultrastructural and cytochemical study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1974;31(Suppl):1-28.
- 26-Donnez J., Casanas-Roux F., Caprasse J., Ferin J., Thomas K. Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. *Fertil Steril.* 1985;43(4):554-9.
- 27-Ghaffari M. Effects of artificial extracellular matrix on function of human endometrial epithelial cells in vitro. *Med J Reprod Infertility.* 2000;2:40-49.
- 28-Sugrue S.P., Hay E.D. Response of basal epithelial cell surface and Cytoskeleton to solubilized extracellular matrix molecules. *J Cell Biol.* 1981;91(1):45-54.
- 29-Gardner D.K., Lane M. Embryo culture system: In "in vitro fertilization". In Trounson A, Gardner DK (Eds). 1993;PP:85-114.
- 30-Baillie H.S., Pacey A.A., Warren M.A., Scud more I.W., Barratt C.L. Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Hum Reprod.* 1997;12(9): 1985-92.

31-Feng H.L., Wen X.H., Presser S.C. Effect of different co-culture system in early human

embryo development. Hum Reprod. 1996;11(7): 1525-8.