تأثیر ماتریژل بر روند تکاملی بلاستوسیست موش

ماریا زهیری (M.Sc.)[1]، معرفت غفاری نوین (M.D., Ph.D.)[2]، بهروز نیک نفس (Ph.D.)[3]، مهناز حیدری (M.Sc.)[4].

۱- کارشناس ارشد، گروه بافت‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز، تبریز، ایران.

۲- استادیار، گروه غدد تولید مثل و جنین شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.

۳- استادیار، آزمایشگاه بافت‌شناسی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.

٤- مربی پژوهشی، گروه غددتولید مثل و جنین شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: کشت جنین روی ماتریژل، یکی از روش‌های مناسب بررسی تکامل جنین در محیط آزمایشگاه می‌باشد. البته به‌کارگیری محیط‌های متفاوت کشت همراه با آن و همچنین تفاوت در مراحل تکاملی جنین، می‌تواند منجر به پدید آمدن نتایج متفاوتی در مطالعات شود. از آنجایی که استفاده از ماتریژل در مورد تمام گونه‌ها و در مراحل مختلف تکاملی جنین مورد بررسی قرار نگرفته است، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر ماتریژل بر روند تکاملی بلاستوسیست‌های جمع‌آوری شده موش صورت گرفت.

مواد و روشها: به موش‌های ماده نژاد NMRI هورمون‌های hMG و hCG برای تحریک تخمک‌گذاری تزریق شد. سپس موش‌های ماده با موش‌های نر از همان نژاد جفت‌گیری نمودند. بلاستوسیست‌های حاصل، به دو گروه ۱۵۰ عددی برای گروه آزمایش و گروه ۱۳٤ عددی برای گروه کنترل تقسیم شدند. بلاستوسیستها به مدت ٤۸ ساعت در محیط کشت M16 دارای BSA به میزان ٤*mg/ml* کشت داده شدند و با بلاستوسیست‌های کشت شده در ماتریژل همراه با محیط مشابه (M16 +4*mg/ml* BSA) مقایسه شدند. روند تکاملی هر ۲٤ ساعت تا ٤۸ ساعت مطالعه شد. نتایج حاصل با استفاده از آزمون χ^2 و نرم افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: بعد از گذشت ۲٤ ساعت از کشت، درصد بلاستوسیست‌های گروه آزمایش که به مرحله بلاستوسیست‌های جوانه‌زده مرحله اول رسیدند (۷٤٪)، در مقایسه با گروه کنترل (۵۲/۲٪)، به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر بود اما درصد بلاستوسیست‌های فراگمنته در گروه کنترل ۱۱/۹٪ بود که تفاوت معنی‌داری ($p<۰/۰۵$)، با گروه آزمایش (۲٪) داشت. بعد از ٤۸ ساعت از کشت ٤۱٪ از بلاستوسیست‌های کشت داده شده در گروه کنترل، به مرحلهٔ بلاستوسیست‌های جوانهٔ زده مرحلهٔ اول پیشرفت نمودند و این میزان بالاتر از درصد بلاستوسیست‌های این مرحله در گروه آزمایش بود ($p<۰/۰۵$). همچنین درصد بلاستوسیست‌های جوانه‌زده مرحله دوم، در گروه آزمایش بعد از ٤۸ ساعت (۷۸٪)، با اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$)، نسبت به گروه کنترل (۵۹٪) بالاتر بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که بلاستوسیست‌های کشت داده شده بر روی ماتریژل همراه با محیط کشت غنی شده M16 حاوی BSA (٤ *mg/ml*) در مقایسه با بلاستوسیست‌هایی که در محیط M16 حاوی BSA (٤*mg/ml*) کشت داده شدند، تکامل و رشد بیشتری دارند. بررسی فراساختمانی جنینها و یا بررسی‌های ایمونوسیتوشیمیایی در تکمیل یافته‌های این مطالعه پیشنهاد می‌شود.

کلید واژگان: بلاستوسیست، محیط کشت، ماتریژل، تکامل جنین، موش آزمایشگاهی.

مسئول مکاتبه: دکتر معرفت غفاری نوین، گروه غدد تولید مثل و جنین شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن سینا، اوین، صندوق پستی ۱۷۷-۱۹۸۳۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک: mghaffarin@yahoo.com

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

با نگاهی اجمالی بر روند حاملگی در میان زوجین نابارور مشاهده می‌شود، علی‌رغم این که تکنیک‌های کمک باروری آزمایشگاهی (ART)[1] بخش قابل ملاحظه‌ای از مشکلات آنها را حل نموده است، ولی همچنان دارای مواردی از عدم موفقیت است، به این ترتیب که میزان موفقیت لقاح داخل آزمایشگاهی (IVF)[2] در حدود ۷۰-۶۰٪ می‌باشد، در حالیکه میزان موفقیت حاملگی که به مفهوم لانه‌گزینی موفق جنین می‌باشد، در حدود ۳۰-۲۰٪ در هر انتقال گزارش شده است (۱). این تفاوت می‌تواند مربوط به وجود اختلال در مراحل حوالی لانه‌گزینی باشد. بدون شک عوامل مختلفی در بروز این اختلالات دخیل می‌باشند و رفع آنها نیازمند انجام بررسی‌های بیشتر در زمینه ارتقاء تکنیک‌های کمک باروری آزمایشگاهی می‌باشد. موفقیت در این تکنیکها به عواملی از جمله شرایط محیط کشت وابسته است. در صورت عدم وجود این شرایط، کیفیت جنینها تحت تأثیر قرار گرفته و در نتیجه باعث از دست رفتن قابلیت حیات آنها می‌شود (۲). همچنین نتایج مطالعات حاکی از آن است که شرایط و زمان انتقال جنین به داخل رحم نیز از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد؛ به طوری که انتقال جنینها در مراحل تکاملی پیشرفته‌تر (مورولا و یا بلاستوسیست)، به جهت هماهنگی بیشتر با تکامل اندومتر، منجر به افزایش شانس لانه‌گزینی می‌شود. بنابراین فراهم آوردن محیطی مناسب برای حفظ جنین‌های حاصل از IVF، به مدت طولانی‌تر مورد نیاز می‌باشد (۳).

در تحقیقات متعدد، از محیط‌های مختلف تأمین کننده تغذیه و انرژی لازم برای بهبود روند تکامل جنینها و بررسی مراحل مختلف لانه‌گزینی استفاده شده است؛ علی‌رغم وجود موفقیت‌های نسبی، این تحقیقات دارای محدودیت‌هایی هم بوده‌اند (٤). محققان براساس تئوری‌های مختلف بر آن بوده‌اند تا کشت جنینها به صورت هم‌کشتی با سلول‌های اپی‌تلیالی اندومتر (٥) و یا بافت لوله رحم (٦) و یا کشت بر روی ترکیبات ماتریکس خارج سلولی (۷) را نیز تجربه نمایند؛ چرا که در محیط داخل بدن میانکنش[3] موجود بین جنین در حال تکامل، با این ترکیبات از اهمیت فراوانی برخوردار است (۸). این امکانات به محققین اجازه می‌دهند تا با بررسی عوامل متفاوت، فاکتورهای دخیل در افزایش میزان تکامل جنین را شناسایی نموده و در نهایت با لحاظ نمودن آنها میزان موفقیت لانه‌گزینی و در نتیجه بارداری را افزایش دهند (٥). از جمله این سیستم‌های کشت می‌توان از کشت بر روی ماتریژل[4] نام برد. ماتریژل مخلوطی از اجزاء غشاء پایه می‌باشد که شامل لامینین[5]، کلاژن نوع چهار، پروتئوگلیکان، هپاران سولفات[6]، انتاکتین[7]، نیدوژن[8] و همچنین فاکتور رشد و فاکتور فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی[9] می‌باشد، که از نوعی تومور بافت همبند موش به نام ESH[10] استخراج شده است (۹).

تاکنون مطالعات مختلفی در مورد اثر ماتریژل بر تکامل جنین‌های جمع‌آوری شده از لوله فالوپ و همچنین جنین‌های حاصل از IVF انجام شده است، که نتایج متفاوتی از آنها حاصل شده است. برخی مطالعات حاکی از آن است که ماتریژل به عنوان محیط مناسبی برای پیشبرد رشد و تکامل جنینها می‌باشد (۹). مطالعات معدودی نیز بر بی‌اثر بودن و حتی بر اثر مهاری آن بر رشد و تکامل جنینها اذعان دارند (۱۰). هدف از این مطالعه بررسی اثر ماتریژل بر روی تکامل جنین‌های

1- Assisted Reproductive Technology
2- In Vitro Fertilization
3- Interaction
4- Matrigel
5- Laminin
6- Heparan Sulfate
7- Entactin
8- Nidogen
9- Tissue Plasminogen Activator Factor
10- Engelbreth-Swarm-Holm

Downloaded from http://www.jri.ir

جمع‌آوری شده موش، در محیط داخل آزمایشگاهی[1] می‌باشد.

روش بررسی

حیوانات و دریافت جنین: ابتدا موش‌های نژاد NMRI[2] با سن ٦ تا ٨ هفته از حیوانخانه مرکزی رازی خریداری و به مدت یک هفته در حیوانخانه پژوهشکده ابن‌سینا در درجه حرارت ۲۵ ^{o}C و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بدون محدودیت غذائی نگهداری شدند. سپس به هر یک از موشها ۷/۵IU hMG (Merional,IBSA,Switzerland) و پس از ٤٨ ساعت ۷/۵IU hCG (Oregon,Holand) به طریق داخل صفاقی تزریق شد. پس از آن موش‌های ماده به مدت یک شب در قفس موش‌های نر قرار داده شدند و صبح روز بعد از نظر تشکیل پلاک واژینال مورد بررسی قرار گرفتند. موش‌های پلاک مثبت، حامله تلقی شدند و در حدود ۱۱۰ ساعت بعد از تزریق hCG به روش جابجایی مهره‌های گردنی، دچار قطع نخاع شده و بعد از باز نمودن شکم آنها، بلاستوسیست‌های کامل با استفاده از محیط M16 که بر اساس پروتکل Edashing تهیه شده بود، به روش فلاش کردن از شاخ رحم، جمع‌آوری شدند. این محیط کشت حاوی کلرور سدیم، کلرور پتاسیم، فسفات پتاسیم، سولفات منیزیوم، سدیم لاکتات، گلوکز، آنتی بیوتیک و بیکربنات سدیم می‌باشد (۱۱). معیار انتخاب بلاستوسیست‌های کامل روش درجه‌بندی Schoolcraft و Gardner بود (۲). در این سیستم درجه‌بندی، بلاستوسیست کامل به بلاستوسیستی اطلاق می‌شود که بلاستوسل کاملا محوطه جنین را اشغال نماید.

بلاستوسیست‌های حاصل به دو گروه تقسیم شدند. ۱۳٤ عدد بلاستوسیست به عنوان گروه کنترل به مدت ٤٨ ساعت در محیط کشت M16 غنی شده با ٤mg/ml BSA، به عنوان محیط مناسب برای تکامل جنین در مرحله بعد از تشکیل بلاستوسیست، کشت‌داده شدند (۱۲) و ۱۵۰ عدد بلاستوسیست گروه آزمایش نیز بلافاصله بعد از فلاش نمودن، بر روی ماتریژل (Biomedical, USA) منتقل و توسط محیط کشت غنی شده مشابه گروه کنترل، حمایت شد.

آماده‌سازی محیط مورد استفاده برای گروه کنترل: روز قبل از دریافت بلاستوسیست برای غنی‌نمودن محیط، مقدار مناسبی از محیط کشت M16 را در یک فالکون ریخته و ٤mg/ml پودر BSA (Sigma, USA)، به آن افزوده شد. در یک پتری[3] استریل مورد استفاده برای IVF، قطره‌های ۵۰ میکرولیتری به تعداد ۵-٤ قطره، گذاشته شد و روی آن با روغن معدنی استریل[4] (Sigma,USA) پوشانده شد. بسته به تعداد موشها و تعداد احتمالی بلاستوسیستها، تعداد ظروف کشت پتری آماده شده متغیر بود. سپس این ظروف به انکوباتور ۳۷ ^{o}C و ۵٪ CO_2 منتقل شدند. از این ظروف برای انتقال و شستشوی بلاستوسیستها و همچنین نگهداری گروه کنترل استفاده شد.

انتقال بلاستوسیستها روی ماتریژل: آماده‌سازی بستر مناسب برای گروه مورد، براساس پروتکل‌های توصیه شده توسط شرکت BD انجام شد، که به شرح زیر می‌باشد: ماتریکس خارج سلولی یا ماتریژل که از قبل در لوله‌های با حجم ۱ml جدا شده و در فریزر ۲۰ ^{o}C- نگهداری می‌شد را از فریزر خارج نموده و فرصت داده شد در دمای اتاق از حالت منجمد خارج شود.

از طرف دیگر میلی سل نوع CM با قطر منافذ ۰/٤μm (Millipore,USA) در داخل پلیت کشت ٢٤ حفره‌ای (BD,USA) گذاشته شد و حدود ۲۰۰μl از ماتریکس خارج سلولی (ماتریژل) درون میلی سل ریخته شد.

از آنجایی که ماتریژل در دمای اتاق و همچنین در دمای ۳۷ ^{o}C به سرعت منعقد می‌شود، در صورتی که انجام

1- In vitro
2- Naval Medical Research Institute
3- Petri dish
4- Mineral oil

Downloaded from http://www.jri.ir

این مراحل به کندی انجام پذیرد، احتمال ژله‌ای شدن ماتریژل وجود دارد. همچنین در کلیه مراحل انجام کار ماتریژل بایستی به آرامی جابه‌جا شود، زیرا به علت دارابودن مقادیر بالای پروتئین به سرعت کف می‌کند و ایجاد این کف و حباب اضافی، باعث پدید آمدن مشکل در انجام مراحل بعدی می‌شود. در مرحله بعد پلیت ۲٤ حفره ای به مدت ۲ الی ۳ ساعت به انکوباتور $37^{\circ}C$ با ۵٪ CO_2 منتقل شد تا بستر مناسب برای اتصال بلاستوسیستها ایجاد شود. بعد از ۲ الی ۳ ساعت، پلیت از انکوباتور خارج گردیده و به روی صفحه گرم[1] دارای دمای متناسب با بلاستوسیستها قرار داده شد.

با پیپت دهانی تحت هدایت استریو میکروسکوپ، بلاستوسیست‌های کامل جمع‌آوری و با حداقل محیط، روی ماتریژل قرار داده شد. در ادامه کار به پلیت روی صفحه گرم حدود $200\mu l$ محیط مغذی روی ماتریژل و همچنین به میزان $1ml$ در فضای بین میلی‌سل و دیواره پلیت اضافه گردید. به طور معمول در هر میلی‌سل حدود ۱۰ عدد بلاستوسیست انتقال داده شد تا ارزیابی نهایی راحت‌تر انجام گیرد. سپس پلیت به انکوباتور $37^{\circ}C$ و ۵٪ CO_2 منتقل شد.

رشد و تکامل جنینها در گروه‌های مورد و کنترل بعد از ۲٤ و ٤۸ ساعت از کشت، زیر میکروسکوپ نوری فاز معکوس[2] (Olympus, Japan) مورد بررسی و توسط دوربین دیژیتالی متصل به آن (Olympus, Japan)، مورد عکس‌برداری قرار گرفت.

روش‌های آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. به این صورت که از آزمون χ^2 برای مقایسه نسبت روند تکامل دو گروه آزمایش و کنترل، پس از طی ۲٤و ٤۸ ساعت استفاده شد.

نتایج

بررسی مورفولوژی جنینها در دو گروه کنترل و آزمایش:
بررسی جنینها با میکروسکوپ فاز معکوس نشان داد که مورفولوژی بلاستوسیست‌های متسع[3] در گروه‌های کنترل و آزمایش مشابه هم می‌باشند. به این ترتیب که حفره بلاستوسل کاملاً متسع می‌باشد و زونا پلوسیدا[4] به صورت یک لایه نازک اطراف جنین را احاطه می‌نماید. همچنین سلول‌های تروفوبلاست به صورت دوکی شکل دیده می‌شوند (شکل ۱).

مورفولوژی بلاستوسیست‌های فراگمنته[5] در هر دو گروه به صورت بلاستومرهای هیپرپیگمانته با سایزهای نامساوی می‌باشد. در واقع جنینها به صورت توده‌های نامنظم و گاه با وجود ساختارهای واکوئلی دیده می‌شوند (شکل ۲).

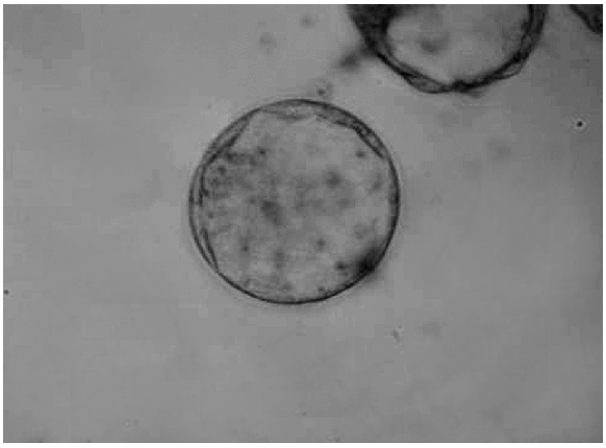
شکل ۳، نشان‌دهندهٔ بلاستوسیست در حال جوانه‌زدن[6] می‌باشد که مورفولوژی این مرحله نیز در گروه کنترل و آزمایش یکسان است. به‌طوری که پوشش زونا در حال از بین رفتن و بلاستومرها در حال خروج از آن دیده می‌شوند. قابل توجه این که جوانه‌زدن بلاستو-

جدول ۱- مقایسه تعداد و درصد بلاستوسیستها طی ۲٤ ساعت نخست، در گروه کنترل و آزمایش

مراحل جنینی / محیط	بلاستوسیست‌های متسع		بلاستوسیست‌های در حال جوانه زدن		بلاستوسیست‌های جوانه ده مرحله اول		بلاستوسیست‌های فراگمنته		p-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
گروه کنترل (n=۱۳۴)	۱۱	۸/۲	۳۷	۲۷/٦	۷۰	۵۲/۲	۱٦	۱۱/۹	p<۰/۰۵
گروه آزمایش (n=۱۵۰)	۲	۱/۳	۳٤	۲۲/۷	۱۱۱	۷٤	۳	۲	

1- Hot plate
2- Inverted microscope
3- Expanded blastocysts
4- Zona plucida
5- Fragmented blastocysts
6- Hatching blastocyst

Downloaded from http://www.jri.ir



شکل ۱- بلاستوسیست متسع در گروه کنترل و آزمایش، در ۲٤ ساعت نخست. این تصویر بلاستوسیست با حفره کاملاً متسع بلاستوسل و بلاستومرهای کشیده و دوکی شکل را نشان می‌دهد (بزرگنمائی× ٤٠).

سیست، فرایندی تدریجی است، به طوری که در زمان‌های متفاوت و در جنینها با قابلیت‌های متفاوت، مراحل بینابینی نیز دیده می‌شود که به جهت هماهنگی بیشتر در جهت توصیف مراحل، از آنها صرف نظر شده است.

همانطور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود، بلاستو-سیست‌های جوانه زده مرحله اول[1] در گروه کنترل و آزمایش، به صورت بلاستوسیست‌هایی می‌باشد که کاملاً از پوشش زونا پلوسیدای خود خارج شده‌اند و توده سلولی داخلی و خارجی و حفره بلاستوسل به خوبی قابل رؤیت می‌باشد.

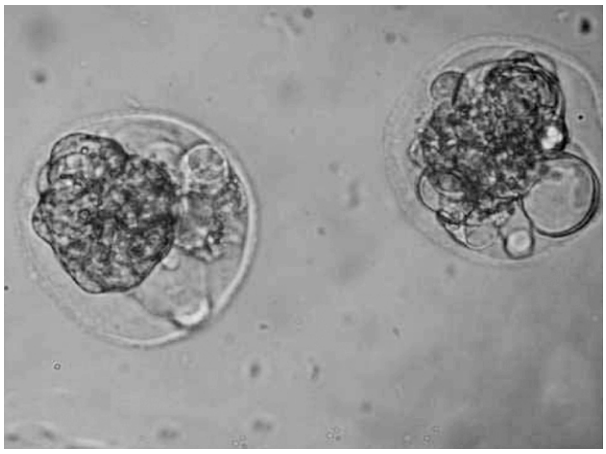
مورفولوژی بلاستوسیست‌های جوانه‌زده مرحله دوم[2] در دو گروه مورد مطالعه، متفاوت بود. به این ترتیب که در جنین‌های گروه کنترل، توده سلولی داخلی و

جدول ۲- مقایسه تعداد و درصد بلاستوسیستها در گروه کنترل و آزمایش طی ٤٨ ساعت

مراحل جنینی / محیط	بلاستوسیست‌های جوانه‌زده مرحله اول		بلاستوسیست‌های جوانه‌زده مرحله دوم	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
گروه کنترل (n=۱۱۸)	٤٨	٤١	۷۰	٥٩
گروه آزمایش (n =۱٤۷)	۳۸	۲۳	۱۰۹	۷٤

$p = ۰/۰۱۰٤$ ، $\chi^2 = ٦/٥۷$

1- Stage I hatched blastocyst
2- Stage II hatched blastocyst



شکل ۲- بلاستوسیت فراگمنته در گروه کنترل و آزمایش، طی ۲٤ ساعت نخست کشت. به دلیل عدم تکامل مناسب، بلاستومرهای جنین، به صورت تجمعاتی نابرابر هیپرپیگمانته مشخص می‌باشند.

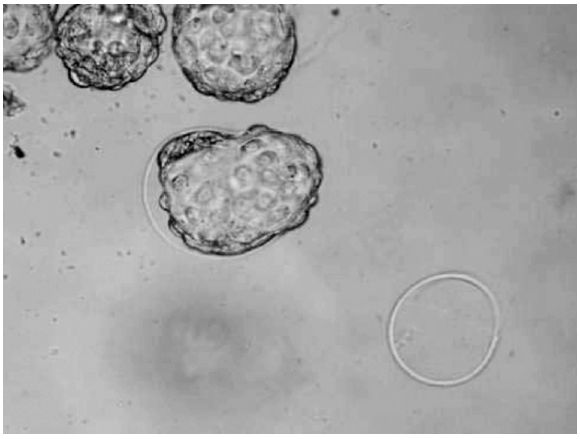
تروفواکتودرم قابل رؤیت بوده، حفره بلاستوسل کوچک و همچنین کمی پراکندگی سلولی اطراف توده جنینی شناسایی می‌شود (شکل ٥) و در گروه آزمایش، سلول‌های توده سلولی داخلی، به خوبی قابل رؤیت نبوده، ولی سلول‌های تروفواکتودرم قابل مشاهده می‌باشند (شکل ٦).

لازم به ذکر است که اطلاق لفظ بلاستوسیست‌های متسع، در حال جوانه‌زدن و همچنین بلاستوسیست‌های جوانه‌زده مرحله اول که همان بلاستوسیست‌های جوانه‌زده کامل می‌باشد براساس سیستم درجه‌بندی Gardner و Schoolcraft می‌باشد(۲).

میزان رشد و تکامل جنینها در گروه کنترل: همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در طی ۲٤ ساعت نخست، در گروه کنترل، ۸/۲٪ بلاستوسیستها در مرحله بلاستوسیست متسع، ۲۷/٦٪ در مرحله بلاستوسیست در حال جوانه‌زدن و ٥۲/۲٪ به صورت بلاستوسیست کاملاً جوانه‌زده مرحله اول بودند. همچنین ۱۱/۹٪ بلاستوسیستها، فراگمنته بودند.

طی ٤٨ ساعت بعد از کشت، در این گروه ٤١٪ آنها به صورت بلاستوسیست جوانه زدهٔ مرحلهٔ اول و ٥٩٪ به صورت بلاستوسیست جوانه زده مرحله دوم بودند.

Downloaded from http://www.jri.ir

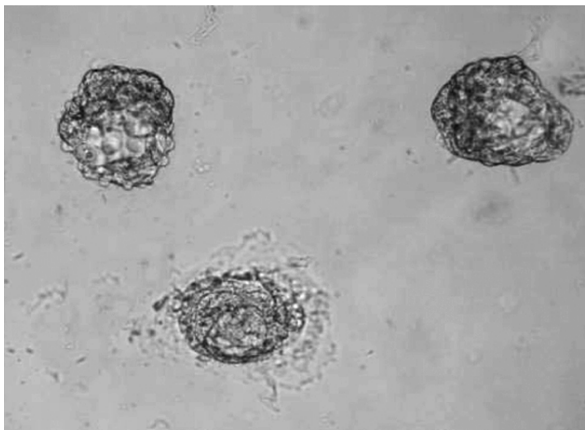


شکل ۳- بلاستوسیست در حال جوانه زدن در گروه کنترل و آزمایش، طی ۲٤ ساعت نخست. در این تصویر لایه زونا پلوسیدا به وضوح قابل رویت و بلاستوسیست در حال خروج از یک قطب زونا می‌باشد.

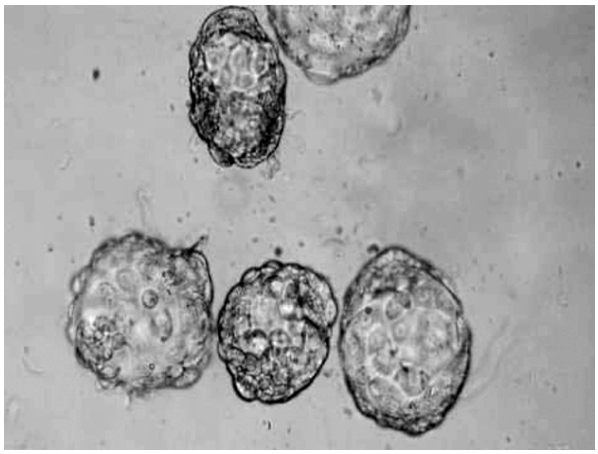
میزان رشد و تکامل جنینها در گروه آزمایش: در طی ۲٤ ساعت نخست تعداد بلاستوسیست‌های متسع ۱/۳٪، بلاستوسیست‌های در حال جوانه‌زدن ۲۲/۷٪، بلاستوسیت‌های جوانه‌زده مرحله اول ۷٤٪ و میزان بلاستوسیست‌های فراگمنته ۲٪ بود.

بعد از ٤۸ ساعت، تعداد بلاستوسیست‌های جوانه‌زده مرحله اول ۲۳٪ و تعداد بلاستوسیست‌های جوانه‌زده مرحله دوم ۷٤٪ بود.

براساس این نتایج پس از گذشت ۲٤ ساعت از کشت، درصد بلاستوسیست‌های جوانه‌زده مرحله اول، در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل، به‌طور معنی‌داری



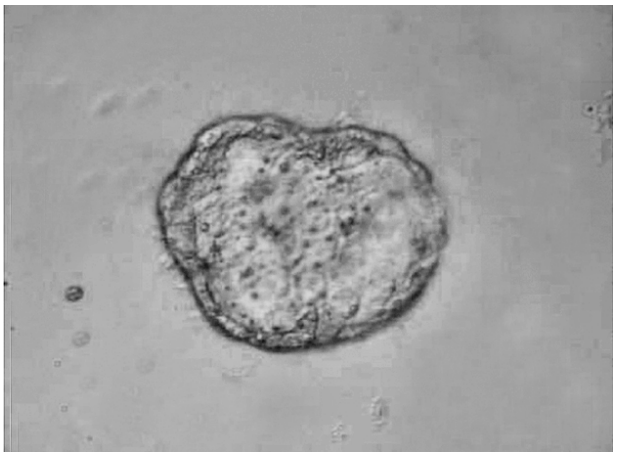
شکل ٥- بلاستوسیست‌های جوانه زده مرحله دوم در گروه کنترل پس از ٤۸ ساعت. سلول‌های توده سلولی داخلی و تروفواکتودرم قابل شناسایی بوده و سایز بلاستوسل کوچکتر شده و سلول‌های تروفواکتودرم و توده سلولی داخلی تکثیر یافته، روی آن را پوشانده‌اند.



شکل ٤- بلاستوسیست جوانه‌زده مرحله اول در گروه کنترل طی ۲٤ ساعت نخست. به سطح خارجی ناهموار و بدون زونای این بلاستوسیست توجه شود.

بالاتر بود ($p<۰/۰۵$)، از طرفی تنها ۲٪ بلاستوسیستها در گروه آزمایش فراگمنته شدند. براساس جدول ۲، پس از گذشت ٤۸ ساعت از کشت، در گروه آزمایش، بلاستوسیست‌هایی که روند تکاملی را تا مرحله بلاستوسیست جوانه‌زده مرحله دوم طی نمودند به طور معنی‌دار، نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($p<۰/۰۵$).

البته در ٤۸ ساعت پس از کشت، تعداد بلاستوسیست‌های موجود در گروه کنترل که به مرحله بلاستوسیست جوانه‌زده مرحله اول رسیدند نسبت به گروه آزمایش به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p<۰/۰۵$).



شکل ٦- نشان دهنده بلاستوسیست جوانه زده مرحله دوم، در گروه آزمایش طی ٤۸ ساعت. سلول‌های تروفواکتودرم قابل رویت می‌باشد، در حالی که توده سلولی داخلی، به وضوع قابل رویت نمی‌باشد.

Downloaded from http://www.jri.ir

بحث

در مطالعه حاضر به منظور ایجاد شرایط مناسب و مشابه با ماتریکس خارج سلولی موجود در اندومتر رحم، از ماتریژل همراه با محیط‌های کشت مغذی برای رشد و تکامل جنین حوالی زمان لانه‌گزینی استفاده شد. جهت انجام لانه‌گزینی موفق، انجام میانکنش میان بلاستوسیست و اندومتر رحم (به خصوص ترکیبات ماتریکس خارج سلولی آن) از اهمیت فراوانی برخوردار است. جهت انجام این میانکنشها هر دو جزء بلاستو-سیست و اندومتر رحم باید آمادگی لازم را کسب نمایند (۱۳) که از جمله آنها می‌توان به بیان اینتگرین‌های[1] خاص (۱٤) و یا ظهور گیرنده‌های مشخص برای فاکتورهای رشد مترشحه از بلاستوسیست و یا ماتریکس خارج سلولی (۱۵)، اشاره کرد.

در این مطالعه برای دستیابی به حالت فیزیولوژیک و مشابه با داخل بدن و همچنین به دلیل حفظ حریم قانونی در استفاده از نمونه‌های انسانی، از بلاستوسیست‌های موش که از نظر مراحل تکاملی قرابت نزدیکی با جنین انسان دارند، استفاده گردید و نشان داده شد که کشت جنین موش در بستر حاوی ماتریژل همراه با محیط مغذی موجب بهبود روند تکاملی جنین می‌شود. به این ترتیب که تعداد بیشتری از جنینها جوانه زده و مورفولوژی متکامل‌تری را ایجاد می‌نمایند.

این مطالعه نشان داد که میزان بلاستوسیست‌های در حال جوانه‌زدن و جوانه‌زده مرحله اول در گروه آزمایش به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. همچنین میزان بلاستوسیست‌های فراگمنته در گروه آزمایش به طور معنی‌دار کمتر از گروه کنترل بود. این نتایج با یافته‌های Lazzaroni و همکاران (۹) و Desai و همکاران (۱٦) به ترتیب با استفاده از ماتریژل همراه با محیط HTF[2] همراه با BSA[3] ۱/۵٪ و ماتریژل همراه با PPP[4] ۵٪ مطابقت داشت.

به نظر می‌رسد در طی ۲٤ ساعت نخست، اثر ماتریژل به طور عمده، پیشبرد روند تکامل جنینها به مرحله جوانه‌زدن می‌باشد، به طوری که فعالیت پروتئازی جنین اولیه که در جهت پاره نمودن لایه زونا پلوسیدا می‌باشد، از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و سوبسترا متأثر می‌شود (۱٦).

براساس نتایج این مطالعه پس از گذشت ٤۸ ساعت از کشت، درصد بلاستوسیست‌های جوانه‌زده مرحله دوم در گروه آزمایش، بیشتر از گروه کنترل بود. درحالیکه درصد بلاستوسیست‌های در حال جوانه‌زدن و جوانه‌زده مرحله اول، در گروه کنترل، بالاتر از گروه آزمایش بود. به نظر می‌رسد در گروه آزمایش، اکثر بلاستوسیستها، این مراحل را در ساعات قبل طی نموده باشند.

در این مطالعه با پیشرفت جنینها و تبدیل آنها به بلاستوسیست جوانه‌زده مرحله دوم مورفولوژی جنینها در دو گروه کنترل و آزمایش با هم متفاوت بود. به طوریکه در گروه آزمایش، سلول‌های توده سلولی داخلی، به خوبی قابل رؤیت نبوده، ولی سلول‌های تروفواکتودرم قابل مشاهده بودند و قطر جنین کاهش داشت. در گروه کنترل، توده سلولی داخلی و تروفواکتودرم قابل رؤیت بود و با تکثیر خود، بلاستوسل را احاطه نموده و حجم آن را کوچکتر نموده بود.

نتایج این مرحله از تکامل جنینها از نظر مورفولوژی با یافته‌های مورفولوژی حاصل از بررسی Carver و همکاران (۱۷) مطابقت دارد. آنها تغییرات بلاستو-سیست‌های جوانه‌زده انسانی را بر روی لایه‌ای از سلول‌های استرومایی اندومتر انسان همراه با محیط کشت DMEM[5] بررسی نمودند. نتایج مورفولوژی مطالعهٔ این محققان نشان داد که در محیط کشت،

1- Integrins
2- Human Tubolar Fluid
3- Bovin Serum Albomin
4- Plasma Protein Preparation
5- Dulbecco' s Modified Essential Medium

Downloaded from http://www.jri.ir

بلاستوسیستها، برای مدتی به صورت متسع باقی مانده و سپس به داخل لایه استرومایی نفوذ می‌کردند. به این ترتیب که بلاستوسیستها بعد از گذشت ۱۰ الی ۱۵ ساعت، به سرعت منقبض شده و توده سلولی داخلی در آنها قابل شناسایی نبوده و قطر بلاستوسیستها نیز کاهش دارد. همانطور که مشاهده می‌شود، در مطالعه Carver و همکاران، این تغییرات تکاملی در فاصله زمانی کوتاهتری نسبت به مطالعه حاضر ایجاد شده است که می‌تواند به دلیل تفاوت نوع کشت، نوع و مرحله تکاملی جنین‌های کشت داده شده و محیط مورد استفاده باشد.

از یافته‌های دیگر بررسی حاضر، وجود گستردگی‌های سلولی در حواشی جنینها در نمونه‌های کنترل، طی بررسی‌های انجام شده در طی ٤٨ ساعت بود. در حالیکه حواشی جنینها در نمونه‌های مورد آزمایش فاقد این گستردگیها بودند. با استناد به نتایج تحقیقات Desai و همکاران، به نظر می‌رسد این گستردگی‌های سلولی، نتیجه تکثیر سلولی جنین باشد. که در نمونه کنترل به دلیل اینکه بستر جنینها از فضای کافی برخوردار نیست، سلول‌های حاصل از تکثیر مجبور به پراکنده شدن بر روی کف دیش می‌باشند ولی در نمونه آزمایش با توجه به نبود این پراکندگی‌های سلولی می‌توان اذعان داشت که سلول‌های حاصل از تکثیر در بستر ماتریژل نفوذ یافته‌اند (١٦). در تأیید این یافته Carver و همکاران در تحقیق مربوط به هم‌کنشی جنین انسان (که در فوق به آن اشاره گردید)، با بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی از نظر وجود سیتوکراتین نشان دادند که بلاستوسیستها در این مرحله، شروع به تکثیر و نفوذ به لایه استرومایی می‌نمایند. البته در آن مطالعه، نتایج این هم‌کنشی با گروه کنترل مقایسه نشده بود (١٧).

از طرفی یافته‌های Armant و همکاران (١٨) نیز، نتایج بررسی مورفولوژیک مطالعهٔ حاضر را مورد تأیید قرار می‌دهد. آنها فعالیت تهاجمی سلول‌های تروفوبلاست موش را در طی لانه‌گزینی در محیط داخل آزمایشگاه مورد بررسی قرار دادند. آنها برای این کار بلاستوسیستها را روی ماتریکس خارج سلولی کشت دادند. منشاء ماتریکس خارج سلولی، اندومتریوم موشها با سن حاملگی ٤ روز بوده است. بلاستوسیت‌های موش که روی این ماتریکس کشت داده شدند، در طی ۳ روز به آن متصل شده و سلول‌های تروفوبلاستی شروع به مهاجرت در میان ماتریکس نمودند. در حالی که بلاستوسیت‌هایی که روی پلاستیک کشت داده شده بودند، این روند را نشان نمی‌دادند. به این ترتیب که سلول‌های تکثیری بلاستوسیست‌های کشت شده روی پلاستیک، نظم خود را از دست داده و به صورت پراکنده دیده می‌شدند، در حالیکه در گروهی که روی ماتریکس کشت داده شده بودند، ساختار کلی جنین و نظم آن حفظ شده بود.

البته علی‌رغم نتایجی که در فوق ذکر شد، برخی مطالعات، استفاده از ماتریژل را بر تکامل جنین بی‌تأثیر می‌دانند. در یک مطالعه از کشت جنین‌های موش در ماتریژل همراه با محیط HTF استفاده شد. نتایج، هیچ بهبودی را در روند تکامل جنینها در گروه آزمایش که حاوی ماتریژل بود نسبت به گروه کنترل که حاوی محیط HTF بود نشان نداد. در قسمت دیگری از همان مطالعه از محیط KSOM[1] به جای HTF استفاده شد. نتایج نشان داد که در گروه حاوی ماتریژل تکامل تخمک‌های لقاح یافته تا مرحله بلاستوسیست مهار شد (١٠).

البته دلیل وجود این تناقضات در نتایج مطالعات، می‌تواند به دنبال تفاوت در محیط کشت مورد استفاده همراه با ماتریژل (٩) و گونه حیوانی مورد استفاده (١٠) باشد.

همچنانکه از نتایج مطالعه حاضر مشهود است، روند تکامل بلاستوسیست موش در مدل ماتریژل، از

1- Potassium Simplex Optimized Medium

Downloaded from http://www.jri.ir

هماهنگی بیشتری برخوردار است و دارای درصد تکامل بالاتری نسبت به گروه کنترل می‌باشد. اثرات مثبت ماتریژل بر روی رشد جنین به خاطر ترکیب خاص آن می‌باشد. ماتریژل، ژلی حاصل از سارکومای موش به نام Engelbreth- Swarm- Holm می‌باشد که تومـوری غنی از پروتئین‌های ساختاری و فاکتورهای رشد می‌باشد که مشابه اجزاء ماتریکس اندومتریال است (۹). بر اساس بررسی‌های مختلف، نشان داده شده است هر یک از اجزاء ماتریکس خارج سلولی قادر به بهبود وضعیت تکاملی جنین می‌باشد. از جمله ترکیبات موجود در ماتریژل که اثر آن به طور مجزاء مورد بررسی قرار گرفته است می‌توان به لامینین (۱۹)، کلاژن نوع چهار، پروتئوگلیکان هپاران سولفات، انتاکتین، فیبرونکتین، نیدوژن، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (۲۰) و فاکتورهای رشد اشاره نمود (۱۷).

این اجزاء در محیط کشت، محیطی مشابه ماتریکس خارج سلولی رحم را پدید می‌آورند و احتمالا علاوه بر کمک به حفظ حیات جنین و تحریک رشد و تکامل آن، تمایز و بیان رسپتورهای غشایی و ترشح فاکتورهای رشد اختصاصی را نیز فراهم می‌نماید (۹). البته از اثرات مثبت محیط کشت مورد استفاده نیز نمی‌توان چشم‌پوشی نمود، چرا که در این مطالعه بلاستو- سیست‌های کشت داده شده در قطره محیط کشت زیر روغن نیز مشمول روند تکامل با اندکی تأخیر نسبت به گروه آزمایش بودند. بنابراین ترکیبات محیط کشت مورد استفاده در این مطالعه که حاوی لاکتات (۲۱)، گلوکز (۲۲)، مکمل‌های سرمی، فسفات، آنتی‌بیوتیکها و بیکربنات (۲۳) بودند نیز در بهبود تکامل جنین نقش دارند. در نتیجه بهبود تکامل جنینها در گروه آزمایش را می‌توان به اثر ترکیبی ماتریژل همراه با محیط مورد استفاده نسبت داد.

نتیجه‌گیری

در مجموع با توجه به نتایج حاصل از مطالعات می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری نمود که استفاده از ماتریژل به عنوان بستری معادل ماتریکس خارج سلولی اندومتر، همراه با محیط کشت غنی شده می‌تواند منجر به بهبود روند تکاملی جنین گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری جهاددانشگاهی جهت تأمین بخشی از اعتبار طرح به شماره ۲۱-۶۹۶، همچنین از همکاران محترم پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا جهت همکاری صمیمانه در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1- Ben-Rafael Z., Benadiva C.A., Ausmanas M., Barber B., Blasco L., Flickinger G.L., Masteroianni L. Dose of human menopausal gonadotropin influences the outcome of an invitro fertilization program. Fertil Steril. 1987;48:964.

2- Kathy L., Sharpe T., Randall L.Z. Oocyte and pre-embryo classification. In the handbook of Assisted Reproduction Laboratory. Keel B.A., May J.V., De Jonge C.J. (Editors). 1st Edition, CRC Press, Florida. 2000;pp:188-193.

3- de los Santos M.J., Mercader A., Galan A., Albert C., Romero J.L., Pellicer A. Implantation rates after two, three or five days of embryo culture. Placenta.2003;24: (suppl):S13-9.

4- 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.

5- Trew A.J., Lash G.E., Baker P.N. Investigation of an In Vitro model of trophoblast invasion. Biol Med.2000; 4(3):176-190.

٦- غفاری معرفت، آخوندی محمد مهدی، حیدری مهناز. بررسی اثرات محیط‌های کشت مختلف بر تکامل جنین و سلول‌های اپی‌تلیال لوله

Downloaded from http://www.jri.ir

16- Desai N., Lawson J., Scarrow M., Kinzer D., Goldfarb J. Evaluation of the effect of interlukin-6 and human extracellular matrix on embryonic development. Hum Reprod.1999;14(6):1588-1592.

17- Carver J., Martin K., Spyropoulou I., Barlow D., Sargent I., Mardon H. An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. Hum Reprod.2003;18(2):283-290.

18- Armant D.R., Kameda S. Mouse trophoblast cell invasion of extracellular matrix purified from endometrial tissue: a model for peri-implantation development. J Exp Zool.1994;269(2):146-56.

19- Karja N.W.K., Otoi T., Murakami M., Yuge M., Fahrudin M., Suzuki T. Effect of protein supplement to the hatching and hatched blastocyst stage of cat IVF embryo. Reprod Fertil Develop.1996;14(5):291-296.

20- Menino A.R., Oclaray J.L. Enhancement of hatching and trophoblastic outgrowth by mouse embryos cultured in Whittens medium containing plasmin and plasminogen. J Reprod Fertil.1986;77:159-167.

21- Sakkas D., Urner F., Menezo Y., Leppens G. Effect of glucose and fructose on fertilization, cleavage and viability of mouse embryos in vitro. Biol Reprod. 1993;49:1288-1292.

22- Loutradis D., Drankakis P., Kalliandis K., Sofikitis N., Kallipolitis G., Millingos S., Makris N., Michalas S. Biological factors in cultuer media affecting in vitro fertilization, preimplantation embryo development, and implantation. Ann NY Acad Sci.2000;900:325-35.

23- Scott L.A. Oocyte and embryo culture. In the handbook of Assisted Rep-roduction Laboratory. Keel B.L., May J.V., De Jonge C.J. (Editors). 1st Edition, CRC Press, Florida.2000;pp:197-220.

رحم انسان. فصلنامه باروری و ناباروری: سال چهارم(۱۳۸۱)، شماره۱، صفحات ۱۶-۵.

7- Campbell S., Rowe J., Jakson C.J., Gallery E.D.M. In vitro migration of cytotrophoblasts through a decidual endothelial cell monolayer. Placenta.2003;24:306-315.

8- Murphy C.R. Uterine receptivity and the plasma membrane transformation. Cell Res.2004;14(4):259-267.

9- Lazzaroni L., Fusi F.M., Doldi N., Ferrrari A. The use of Matrigel at low concentration enhances in vitro blastocyst formation and hatching in a mouse embryo model. Fertil Steril.1999;71(6):1133-1137.

10- Dawson K.M., Baltz J.M., Claman P. Culture with Matrigel inhibits development of mouse zygotes. J Assist Reprod Genet.1997;14(9):543-8.

11- Edashing K., Asano A., An T.Z., Kasai M. Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short term culture. Cryobiology. 1999;38(4):273-80.

12- Baharvand H., Valojerdi M.R. Effect of glucose and phosphate on the development of one-cell NMARI mouse embryo in M16, CZB and T6 media. Physiol Pharmacol.1999;3(1).

13- Goldman- Wohl D.G., Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. Mol Cell Endocrinol.2002;187(1-2):233-8.

14- Spenceer T.E., Johnson G.J., Bazar F.W., Burghart R. C. Implantation mechanism: insights from the sheep. Reproduction.2004;128:657-668.

15- Carson D.D., Bagchi I., Dey S.K., Enders A.C., Fazlebas A.T. Review embryo implantation. Dev Biol.2000; 223:217-237.

Downloaded from http://www.jri.ir