مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۳، شماره ۴، صفحات ۲۷۰ تا ۲۷۸ ، (۱۳۸۴)

بررسی تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیت‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو و چهار سلولی موش ICR

دکتر قاسم ساکی (استادیار)*، دکتر علیقلی سبحانی (دانشیار)، دکتر محمد اکبری (استاد)*****
* گروه آناتومی و جنین‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقاتی، دانشکده علوم پزشکی جندی‌شاپور، اهواز
** گروه علوم تشریحی، آزمایشگاه تحقیقاتی و مرکز ناباروری ولی‌عصر، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** گروه علوم تشریحی، آزمایشگاه تحقیقاتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه، بررسی میزان سلولهای توده ای داخلی بلاتوسیست های حاصل از کشت جنین های دو سلولی موش سفید آزمایشگاهی در حضور یا عدم حضور فاکتور مهار کننده ی لوسمی انسانی بود.

مواد و روشها: ابتدا به موش های ماده نژاد ICR با سن ۱۰- ۸ هفته ۷/۵ واحد بین المللی PMSG و پس از ۴۸ ساعت ۷/۵ واحد بین المللی hCG به روش داخل صفاقی تزریق شد. بلافاصله پس از تزریق hCG موش های ماده به صورت دو تایی داخل قفس نر با سن ۱۲- ۱۰ هفته از همان نژاد قرار گرفتند تا جفت گیری صورت گیرد. صبح روز بعد موش های ماده دارای پلاک واژن حامله تلقی شدند. ۵۰-۴۸ ساعت پس از تزریق hCG موش های ماده با جابجائی مهره های گردنی کشته شدند و به روش عمل فلاشینگ جنین های دو سلولی جمع آوری گردیدند. جنین های دو سلولی حاصله که از نظر ظاهری سالم به نظر می رسیدند پس از شستشوی پی در پی به طور کاملاً تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند و هر گروه در محیط های کشت KSOM+aa (گروه کنترل)، KSOM+AA+1500 IU/ml LIF, KSOM+AA+1000IU/ml LIF, KSOM+AA+500 IU/ml LIF تا ۱۲۰ ساعت در انکوباتور تحت شرایط 37ºC و 5%co2 کشت داده شدند. بلاستوسیست های حاصله با رنگ آمیزی دوگانه یا افتراقی رنگ آمیزی شده و سپس با استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهز به لامپ اشعه ی ماوراء بنفش، سلولهای توده ای داخلی که به رنگ آبی بودند شمارش شدند.

یافته‌ها: تعداد سلول های توده ای داخلی دربلاستوسیست های حاصل از کشت جنین های دو سلولی در محیط کشت بدون فاکتور مهار کننده ی لوسمی برابر با $19 \pm 2/6$ بود و در محیط های کشت با غلظتهای 1500 IU/ml LIF, 1000 IU/ml LIF, 500 IU/ml LIFبه ترتیب برابر بود با $26 \pm 2/2,24 \pm 2/1,28 \pm 2/4$. تست آماری انجام شده نشان دهنده ی اختلاف معنی دار بین دو نوع محیط کشت (با و بدون فاکتور مهارکننده ی لوسمی) بود. این نتایج بیانگر این واقعیت بود که فاکتور مهار کننده ی لوسمی بر میزان سلول های توده ای داخلی اثر مثبت داشته و باعث افزایش تعداد سلولهای توده ای داخلی شده است $(P = 0/02)$.

نتیجه گیری و توصیه ها: در مجموع به نظر می رسد که افزایش فاکتور مهار کننده ی لوسمی به محیط کشت مخصوص بلاستوسیست می تواند بلاتوسیست هایی با تعداد سلولهای توده ای داخلی بیشتر در اختیارمان قرار دهد، اگرچه اثبات این امر به مطالعات بیشتر و گسترده تری نیاز دارد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

مقدمه

از دیرباز مطالعه بر روی بلاستومرهای جدا شده (Isolated blastomeres) از جنین‌های پستانداران به منظور بررسی قدرت تکوین (Developmental capacity) آنها آغاز شده است و تا کنون قسمت اعظمی از تحقیقات علمی محققان را به خود اختصاص داده است. این مطالعات روی بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های موش صحرائی (۱)، موش سفید آزمایشگاهی (۳،۲)، خرگوش (۵،٤) و اخیراً روی بلاستومرهای جدا شده از حیوانات اهلی از جمله گوسفند (۷،٦)، گاو (۱۰–۸) و خوک (۱۲،۱۱) انجام گرفته است.

مطالعات نشان داده است که بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو سلولی موش (۳،۲)، ۸–٤ سلولی خرگوش (٤)، ٤ سلولی گاو (۹،۱۰)، ۸ سلولی خوک (۱۱،۱۲) دارای این توانایی می‌باشند که در موقع انتقال به رحم گیرنده (Recipient) به بلاستوسیست و در نهایت به تولد نوزاد سالم برسند. اما از نتایج مطالعات انجام شده چنین استنباط می شود که توان زیستی جنین‌های منتقل شده به رحم گیرنده که از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین به دست آمده‌اند بسیار ضعیف بوده است. عده‌ای از محققان علت این امر را به محیط کشت نسبت می دهند. به همین دلیل در زمینه بهبود کیفیت محیط کشت تحقیقات گسترده‌ای انجام دادند. به عنوان مثال این محققان متوجه شدند درصورتی که ظرف محیط کشت به فیبرونکتین که یک ماتریکس خارج سلولی است آغشته شود (۱۱) و یا زمانی که به محیط کشت سرم گوساله (Lamb serum) اضافه شود (۱۳) میزان بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلا ستومرهای جدا شده، بیشتر می‌شود. هم چنین مطالعات محققان نشان می دهد، درصورتی که این بلاستوسیست‌ها به رحم گیرنده انتقال داده شوند فقط تعداد کمی از آنها به نوزاد تکامل می‌یابند. در توجیه این نقصان آن‌ها احتمال می دهند که بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده دارای تعداد کمی سلول در توده داخلی می‌باشند (۱٤،۱۵). بنابراین به نظر می رسد این امر از جمله دلایل اصلی موفقیت پایین این روش باشد.

پروژه‌ی تحقیقاتی حاضر جهت بررسی میزان سلول‌های توده‌ای داخلی بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو و چهار سلولی موش ICR در محیط کشت KSOM + AA طراحی شده است. که در این راستا جهت رسیدن به یک دیگاه مناسب بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرها با بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های دو و چهار سلولی دست نخورده مقایسه گردیده است.

مواد وروش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

در این پژوهش موشهای سفید آزمایشگاهی نژاد ICR (۸ الی ۱۰ هفته‌ای) مورد استفاده قرارگرفته‌اند. موشها در شرایط ۱۲ ساعت نور ۱۲ ساعت تاریکی (روشنایی از ساعت ۵ صبح تا ۵ بعدازظهر) ودمای ۲۵ـ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می شدند. برای تحریک تخمک‌گذاری و جفت‌گیری تنها از حیواناتی استفاده شد که ظاهر سالم داشته وفعال به نظر می رسیدند.

القاء تخمک‌گذاری و جفت‌گیری

به منظور تحریک تخمک‌گذاری مقدار ۷/۵ واحد بین‌المللی هورمون گنادوتروپین سرم خون اسب حامله PMSG و ٤۸ ساعت بعد ۷/۵ واحد بین‌المللی هومون گنادوتروپین جفت انسان HCG به روش داخل صفاقی تزریق شد. بلافاصله بعد از تزریق HGC موش‌های ماده به صورت دوتایی داخل قفس نر (با سن ۱۲ـ۱۰ هفته) از همان نژاد قرار گرفتند تا جفت‌گیری صورت گیرد. برای اطمینان از وقوع حاملگی موش‌های ماده‌ای که به مدت یک شب در قفس موش‌های نر قرار گرفته بودند، صبح روز بعد معاینه واژینال به عمل آمد. موش‌های ماده‌ای که دارای پلاک واژینال بودند

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

حامله تلقی شده و تا زمان مورد نظر در قفس دیگر نگهداری شدند.

بدست آوردن جنین

برای بدست آوردن جنین‌های دو و چهار سلولی ۵۶ـ۴۸ ساعت پس از تزریق HCG موش‌های ماده باجابجایی مهره های گردنی (Cervical dislocation) کشته شده و در شرایط استریل پوست، عضلات شکم و صفاق آن ها باز شد. با کنار زدن روده‌ها شاخ‌های رحمی در معرض دید قرار گرفت و سپس با یک قیچی ظریف لوله‌های رحم جدا شدند. لوله‌های رحم جدا شده بلافاصله به یک قطره ۱۰۰ـ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت HTF حاوی ۱میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر BSA (فراکسیون Vـ فاقد اسید چرب) قرار داده شد و بلافاصله جنین‌ها از لوله رحم به روش فلاشینک (Flushing) خارج شدند. پس از خارج کردن جنین‌ها از لوله ی رحم، لوله رحم را از محیط خارج نموده و سپس تمام جنین‌های حاصله را که از نظر ظاهری سالم به نظر می‌رسیدند پس از چند بار شستشوی در چند قطره‌ی تمیز از محیط کشت فوق در یک قطره جمع‌آوری شدند.

عمل برداشتن پرده ی شفاف

در این پژوهش جنین‌های دو و چهار سلولی حاصل از عمل فلاشینگ به‌طور کاملاً تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. **گروه I:** به عنوان گروه کنترل پرده ی شفاف آنها دستکاری نشد. **گروه II:** به عنوان گروه مورد مطالعه، پرده ی شفاف آنها با استفاده از محلول اسید تیرود (PH=2.5) جدا شد. به این صورت که ابتدا با استفاده از پی‌پت جنین‌ها از قطرات محیط کشت به ۰/۵ میلی‌متر محلول اسید تیرود که قبلا در ظرف مخصوص کشت به ابعاد ۳۵ میلی‌متر قرارداده شده بود منتقل گردید و سپس با دقت و به سرعت، ظرف مخصوص کشت تکان داده شد. بعد از این عمل ظرف مخصوص کشت را به میکروسکوپ استریو منتقل و بطور مداوم جنین‌ها مشاهده می شدند. بدینوسیله از بین رفتن قشر شفاف در زیر میکروسکوپ تعقیب می‌شد تا بلافاصله بلاستومرهای موررد نظر جمع آوری شوند تا به غشاء سلولی بلاستومرها آسیبی وارد نیاید. بعد از گذشت ۲-۱ دقیقه پرده‌ی شفاف حل و جنین‌های بدون پرده شفاف به ظرف مخصوص کشت می‌چسبیدند. در این زمان جنین‌های فوق جمع‌آوری و در محیط PBS بدون کلسیم و منیزیم به مدت ۵ دقیقه نگه داری می‌شدند. بعد از این مدت، عمل پی‌پتینگ انجام می شد و بلاستومرها از همدیگر جدا (شکل ۱) و هر بلاستومر به طور جداگانه در یک قطره محیط کشت، کشت داده می شدند. لازم به ذکر است که بلاستومرهایی که در طول مراحل آماده سازی سالم بودند کشت داده شدند.

محیط کشت

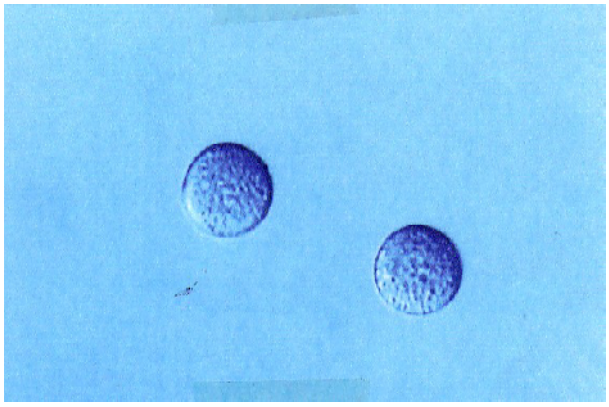
برای کشت آزمایشگاهی بلاستومرهای جدا شده تابحال محیط کشت اختصاصی که مورد پذیرش تمام مراکز و محققان باشد ساخته نشده است. به همین دلیل در هر مرکز تحقیقاتی با توجه به شرایط خود از محیط خاص استفاده می‌شود. در این پروژه از محیط کشت KSOM استفاده شد که عده‌ای معتقد هستند این محیط کشت بر تکثیر و تمایز سلول‌های جنینی اثر مثبتی دارد (۱۶،۱۷). لازم به ذکر است که به این محیط کشت آمینواسید ضروری $\frac{1ml}{100ml}$، آمینواسید غیر ضروری $\frac{0/5ml}{100ml}$ و آلبومین سرم گاوی به میزان $\frac{1mg}{ml}$ می‌باشد (۱۸،۱۹).

کشت جنین‌ها

با توجه به اینکه در این پروژه، مطالعه روی جنین‌های دو و چهار سلولی و بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو و چهار سلولی موش سفید آزمایشگاهی نژاد ICR بود، هر دیش به یک نمونه اختصاص داده شد. به اینصورت که در هر دیش قطراتی از محیط کشت KSOM به اندازه ۳۰ میکرولیتر آماده و روی آنها با روغن مایع پوشانده می شدند. برای تسهیل در مطالعات تنها یک جنین در هر قطره گذاشته می‌شد. محیط کشت روزانه تعویض شد و شرایط کشت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و گاز کربنیک ۵ درصد بود. ارزیابی نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی x۱۰۰ و یا x۲۰۰ صورت می گرفت. ارزیابی اولیه جهت مشاهده ی تقسیمات کلیواژی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

وسیر تکاملی نمونه ها (شکل ۲ و ۳) و ارزیابی بعدی جهت بررسی بلاستوسیست‌ها صورت می گرفت.



تصویر ۱- بلاستومر حاصل از کشت جنین دو سلولی در محیط کشت LIF+KSOM که توسط عمل پیپتینگ از همدیگر جدا شده‌اند

تصویر۲ – جنین‌های دو سلولی حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین دو سلولی در محیط کشت LIF+KSOM

در این مطالعه بلاستوسیست‌های اولیه (Early blastocyst) به آنهایی گفته می شد که بلاستوسل کمتر از نیمی از حجم جنین را بخود اختصاص می‌داد، بلاستوسیست (Blastocyst) به آنهایی گفته می شد که بلاستوسل بیش از نیمی از حجم جنین را اشغال نموده بود، بلاستوسیست کامل (Full blastocyst) به آنهایی گفته می شد که بلاستوسل بطور کامل جنین را اشغال نموده و نهایتا بلاستوسیست در حال اتساع (Expanded blastocyst) به آنهایی گفته می شد که فقط با کشت نمونه های دارای پرده‌ی شفاف سالم می توان به آن رسید. در این بلاستوسیست، بلاستوسل بزرگتر از حالت‌های قبل متسع شده و پرده ی شفاف نیز نازکتر شده است. به منظور یکسان سازی مطالعات، تمام مراحل بلاستوسیستی در یک گروه و تحت عنوان بلاستوسیست شناخته شده‌اند.

رنگ آمیزی افتراقی بلاستوسیست‌ها

جهت بررسی سلول‌های توده‌ای داخلی روش رنگ آمیزی افتراقی یا دوگانه (Thouas) مورد استفاده قرار گرفت (۲۰). در این روش ابتدا بلاستوسیست‌های حاصل از کشت هر نمونه به صورت جداگانه در ۵۰۰ میکرولیتر محلول S_1 (این محلول شامل محیط کشت HEPES HTF ، Triton X۱۰۰ و Propidium Iodide) به مدت ۱۰ ثانیه نگه داشته شدند. سپس بلافاصله بلاستوسیت‌ها را به ۵۰۰ میکرولیتر محلول S_2 (این محلول شامل الکل اتانل ۱۰۰٪ و Hoechst 33258) منتقل شده و در دمای ٤Ċ به مدت یک شب (Overnight) نگه داشته می‌شدند. بعد از این مرحله بلاستوسیست‌ها به یک قطره گلیسرول (واقع روی لام میکروسکوپی) انتقال یافته و توسط لامل پوشیده می شدند. سپس شمارش سلولی با استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهز به لامپ اشعه ماوراء بنفش و فیلتر خروجی (Exitation Filter) با طول موج ٤٦٠ نانومتر انجام می گرفت. با این رنگ آمیزی سلول‌های توده‌ای داخلی (ICM) به رنگ آبی و سلول‌های تروفواکتودرم به رنگ قرمز دیده می‌شوند (شکل ٤). با توجه به تعداد معدود سلول‌ها، کلیه ی سلول‌ها با چشم شمرده شده و با استفاده از شمارش‌گر مخصوص تعداد آنها ثبت می گردید. جهت بالا بردن دقت درکار شمارش سلولی تمام جنین‌ها توسط یک نفر انجام می شد و هر شمارش نیز دوبار تکرار می گردید.

روش آنالیز آماری

میزان تشکیل تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیت‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده در گروه‌های مختلف در هر آزمایش با استفاده از روش One way ANOVA و با کمک نرم‌افزار spss 10 مورد مقایسه و تجزیه تحلیل قرار گرفت.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

یافته ها

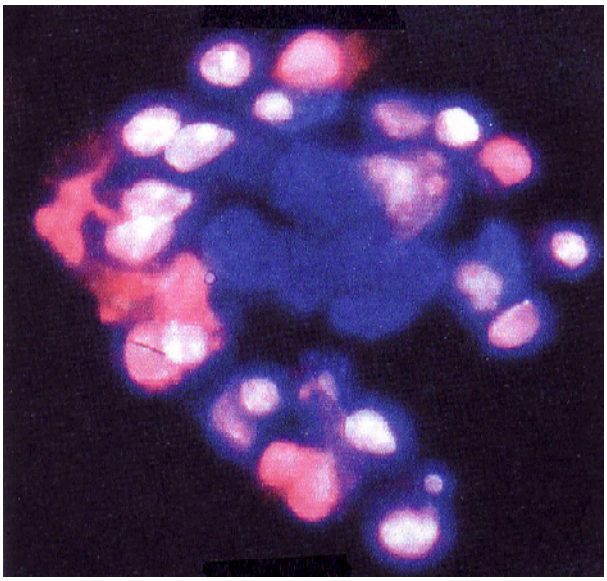
در این مطالعه از ٤٠ سر موش سفید آزمایشگاهی نژاد ICR (سن ۱۰- ۸ هفته)، ٤٨٧ جنین دو و چهار سلولی جمع‌آوری گردید. از این تعداد ۲۷۰ جنین دو سلولی و ۲۱۷ جنین چهار سلولی بودند. در این مطالعه ۱۷۰ جنین دو سلولی با پرده شفاف سالم و ١٦٥ جنین چهار سلولی با پرده ی شفاف سالم مورد مطالعه قرار گرفتند. هم چنین پرده شفاف ۱۰۰ جنین دو سلولی و ٥٢ جنین چهار سلولی برداشته شد و به ترتیب ١٦٦ و ١٦٤ بلاستومر سالم حاصل گردید. لازم به ذکر است که ٣٤ بلاستومر جدا شده از جنین دو سلولی و ٤٤ بلاستومر جدا شده از جنین چهار سلولی به دلیل آسیب غشای آنها از مطالعات حذف شدند. همانطوریکه در جدول شماره ۱ آمده است ۳۸/۸۲ درصد از جنین‌های دو سلولی کشت داده شده و ٤٠/٦ درصد از جنین‌های چهار سلولی کشت داده شده به بلاستوسیست تکامل یافته بودند. این نتایج نشانگر آن بود که میزان بلاستوسیست‌های حاصل از هر دو گروه مورد مطالعه ی فوق از نظر آماری با همدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند (P>0.05). همچنین به ترتیب ٢٤/٦٩ درصد از بلاستومرهای جدا شده از جنین دو سلولی و٢٢/٥٦ درصد از بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های چهار سلولی به بلاستوسیست تکامل یافته بودند. میزان بلاستوسیست‌های حاصل از کشت دو نمونه نیز با همدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند(P>0.05) . با رنگ آمیزی بلاستوسیست‌های حاصل از کشت نمونه‌ها (شکل ٤) و شمارش سلول‌های توده‌ای داخلی و خارجی مشاهده شد که میزان سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های دو و چهار سلولی به ترتیب برابر ٢/٦ ± ۱۹ و ۳/۷ ± ۲۱ و در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین‌ها دو و چهار سلولی به ترتیب ۱/۸ ± ۷ و ۰/۵ ± ۵ می‌باشد. میزان سلول‌های توده‌ای خارجی بلاستوسیست‌های حاصل از کشت نمونه‌ها به ترتیب عبارت بودند از: ٤/٨ ± ٥٠ در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت نمونه‌های دو سلولی، ٥/٥ ± ٥٦ در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو سلولی و ٤/٩ ± ٥٠ در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های چهار سلولی بود. با مقایسه میزان سلولهای توده‌ای داخلی در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرها با سلول‌های توده‌ای داخلی بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های سالم و دست نخورده مشاهده می‌شود که میزان این سلول‌ها در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرها کمتر است (P<0.05)، حال آنکه میزان سلول‌های توده‌ای خارجی در هر چهار گروه مورد مطالعه با همدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (P>0.05). لازم به ذکر است که از ١٦٦ بلاستومر جدا شده از جنین دو سلولی ۱۲۲ بلاستومر (۳۷/٤۹ درصد) و از ١٦٤ بلاستومر جدا شده از جنین‌های چهار سلولی ۱۱۹ بلاستومر (۷۲/٥۹ درصد) تقسیمات کلیواژی خود را طی ٢٤ ساعت اولیه کشت آغاز نمودند که میزان این تقسیمات با یکدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (P>0.05).

تصویر۳ – جنین‌های چهار و پنج سلولی حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های چهار سلولی در محیط کشت LIF+KSOM

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

جدول شماره ۱- میزان بلاستوسیست ها، سلول های توده ای داخلی و خارجی حاصل از کشت نمونه‌ها

نمونه	تعداد نمونه	دفعات تکرار	تقسیمات کلیواژی بلاستومرها	تعداد بلاستوسیست	تعداد ICM	تعداد DCM
جنین دو سلولی	۱۷۰	۱۰	--------	٦٦ (۳۸/۸۲)	۱۹ ± ۲/٦ (۲٤-۱۵)	٥۰ ± ٤/۸ (٤۳-٥٥)
جنین چهار سلولی	۱٦٥	۱۰	--------	٦۷ (٤۰/٦۰)	۲۱ ± ۳/۷ (۲٥-۱۸)	٥٦ ± ٥/٥ (٤۹-٦۰)
بلاستومر جدا شده از جنین دو سلولی	۱٦٦	۱۰	۱۲۲ (۷۳/٤۹)	٤۱ (۲٤/٦۹)	۷ ± ۱/۸ (۱۰-۳)	٥٤ ± ٥/۳ (٥۹-٥۰)
بلاستومر جدا شده از جنین چهار سلولی	۱٦٤	۱۰	۱۱۹ (۷۲/٥۹)	۳۷ (۲۲/٥٦)	٥ ± ۰/٥ (۸-۳)	٥۰ ± ٤/۹ (٥۳-٤۳)



تصویر ۴- بلاستوسیست حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین چهار سلولی در محیط کشت LIF+KSOM که توسط رنگ‌آمیزی افتراقی یا دوگانه رنگ‌آمیزی شده است. در این تصویر سلول‌های توده داخلی به رنگ آبی و سلول‌های توده خارجی به رنگ قرمز دیده می‌شوند

بحث

مطالعاتی که روی قدرت تکوین بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های ٤، ۸ و ۱٦ سلولی خرگوش انجام شده است، نشان می‌دهد که تقسیمات سریع کلیواژی در بلاستومرهای جدا شده امکان پذیر بوده و حتی این بلاستومرها در محیط کشت توانایی رسیدن به بلاستوسیست‌های ظاهراً نرمال را دارند (۵). همچنین این مطالعات موید این مطلب است که قدرت تکوین بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های ٤، ۸ و ۱٦ سلولی با هم متفاوت است و این با دوره ی تکوین جنین‌هایی که بلاستومرها از آن جدا می‌شوند نسبت عکس دارد، به این صورت که با افزایش دوره تکوینی جنین‌ها قدرت تکوین بلاستومرها کاهش می‌یابد (۵). در همین رابطه یافته‌های Ekert و همکاران (۱۲) که مطالع ی خود را روی بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های خوک انجام دادند که نتایج مشابهی را در بر داشت. با توجه به مطالب بالا و نتایج این مطالعات به نظر می رسد که الگوی تکوین جنین‌های اولیه در موش ICR، در خرگوش و خوک مشابه است. Ekert و همکاران درتحقیقات خود متوجه شدند که میزان کل سلول‌ها در یک بلاستوسیست و سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیست‌های حاصل از تکوین بلاستومرها کمتر از میزان سلول‌های توده‌ای داخلی بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های سالم است. این یافته‌ها با نتایج سایر محققان که روی موش (۲۱)، خرگوش (٤)، گوسفند (۲۰) و خوک (۲۲) مطالعه نمودند مطابقت دارد. در عوض محققان دیگری معتقدند که بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های هشت سلولی رشد بیشتری نسبت به بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های چهار سلولی دارد (۱۱).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

همچنین دیده شده است که نسبت سلول‌های توده‌ای داخلی و کل سلول‌ها در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین های ۸ سلولی در محیط کشت بیشتر از مواردی است که بلاستومرها از جنین چهار سلولی جدا شده باشند.

مطالعات نشان داده است که در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های سالم و دست نخورده ٤، ۸ و ١٦ سلولی خرگوش میزان سلول‌های توده‌ای داخلی و کل سلول‌ها از میزان سلول های بلاستوسیست‌های حاصل از کشت ٤، ۸ و ١٦ سلولی بدون پرده شفاف بیشتر است (۲۳،٥،۱۲،۱٥). این مطالعات نشان می‌داد که پرده شفاف نه تنها به عنوان سد حفاظتی برای جنین عمل می‌کند بلکه تقسیمات سلولی و رشد سلول‌های ICM و تروفوکتودرم را نیز در گونه‌های مختلف جانوران تنظیم می‌کند.

در این پروژه جنین‌های دو و چهار سلولی موش سفید آزمایشگاهی نژاد ICR و بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو و چهار سلولی در محیط کشت KSOM+ AA تا ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند. این مطالعه نشان داد که قدرت تکوینی جنین‌های دو و چهار سلولی با همدیگر یکسان است. همچنین بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو و چهار سلولی دارای این توانایی می‌باشند که به بلاستوسیست تکوین یابند و میزان این تکوین در هر دو گروه بلاستومر تقریبا یکسان است. یعنی با یافته های این مطالعه می‌توان گفت که قدرت تکوین بلاستومرهای مربوط به جنین‌های دو و چهار سلولی به دوره تکوین جنین‌هایی که از آن جدا می‌شوند بستگی ندارند. این یافته با یافته‌های Tao. T (٥) و با یافته‌های Saito. S و همکاران منطبق است (۱۱). شمارش سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های دو و چهار سلولی نشان داد که تعداد این سلول‌ها در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده بطور معنی‌داری از جنین‌های دو و چهار سلولی سالم و دست نخورده (Intact) کمتر است، در صورتیکه میزان سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های دو و چهار سلولی با هم دیگر تفاوت معنی‌داری را نشان نمی داد. همچنین درست است که تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده در جنین‌های دو و چهار سلولی نسبت به جنین های سالم و دست نخورده کمتر است، اما نسبت به همدیگر تفاوت معنی‌داری ندارد. دلیل کاهش میزان سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرها در مقایسه با بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های سالم و دست نخورده شاید به دلیل کلیواژ تأخیری سلول‌های توده‌ای داخلی بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده باشد که شاید دلیل آن حساسیت بالای سلول‌های توده‌ای داخلی به شرایط محیط کشت بدون پرده ی شفاف باشد. میزان سلول‌های توده‌ای خارجی در بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های دو و چهار سلولی و همچنین بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو و چهار سلولی با همدیگر تفاوت معنی‌داری نشان نمی داد و این شاید به این دلیل باشد که این سلول‌ها حساسیت کمتری به شرایط محیط کشت دارد. تذکر این نکته ضروری بنظر می‌رسد، اینکه چه تعداد سلول باید در توده ی داخلی باشد تا یک بلاستوسیست در دیواره رحم جایگزین و به نوزاد تبدیل شود، دقیقا مشخص نیست، اما بیشترین درصد سلول‌ها توده ی داخلی در بلاستوسیست تکوین یافته در محیط داخلی بدن حدود ٤٠٪ گزارش شده است. همچنین این سؤال مطرح می‌شود که چرا بعضی از بلاستوسیست‌ها با مقدار کم سلول در توده داخلی موقعی که به رحم منتقل می‌شوند می‌توانند بطور طبیعی تکوین یابند و به نوزاد سالم برسند؟ حقیقت این است که جواب دادن به این سؤال به مطالعات بیشتر و گسترده احتیاج دارد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

منابع

1. Nicholas Js, Hall BV: Experiments on developing rats. The development of isolated blastomeres and fused eggs. J. Exp zool. 1942: 90: 441-549.

2.Tarkowski AK: Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature. 1959: 184: 1286-7.

3.Rossant J: Postimplantation development of blastomeres isolated from 4-and 8-cell mouse eggs. J. Embryol EXP Morphol. 1999: 36: 283-90.

4. Moore NM., Adams CE., Rowsan LEA: Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. J. Repord. Fertil. 1986: 17: 527-31.

5. Tao T., Niemann H: Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4, 8 and 16 cell embryos and isolated blastomeres cultured invitro. Hum. Repord. 2000: 15: 881-9.

6. Willadsen SM: A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins-nature. 1999: 277: 298-300.

7. Willadsen SM: The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. J. reprod. Fertile. 1980: 59: 357-62.

8. Willadsen SM: Micromanipulation of embryos of the large domestic species in Adams, C.E, Mammalian Egg transfer. CRC Press, Boca Raton, USA, 1982: 185-210.

9. Willadsen SM., Polge C: Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. (Abst) ret RCC. 1981: 108-211.

10. Jonson WH., Loskutoff NM., plante Y., Betteridge KJ: Production of four identical calves by the separation of blatomeres from an invitro derived four cell embryous. Ver. Rec. 1995: 137: 15-7.

11. Saito S., Niemann H: Effect of extra cellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine germ cells. Biol. Reprod. 1991: 44: 927-37.

12. Ekert J., Tao T., Niemann H: Ratio of inner cell mass and trophoectoderm in blastocysts derived from porcine 4-and 8-cell embryos and isolated blastomeres cultured in vitro in the presence or absence of protein and human LIF. Biol. Reprod. 1997: 57: 552-60.

13. Wilaton NJ., Trounson Ao: Biopsy of preimplantation mouse embryo: Development of micromanipulated embryos proliferation of single blastomeres in vitro. Biol. Reprod. 1999: 40: 145-52.

14. Hishimuma M., Takahashi Y., Kanagawa H: Post implantation development of demi-embryos and induction of decidual cell reaction in mice. Theriogenology. 1996: 45: 1187-1200.

15. Tao T., Reichelt B., Niemann H: Ratio of inner cell mass and trophoblastic cells in demi and intact porcine embryos. J. Reprod fertil. 1995: 104: 251-8.

16. Lawitts JA., Biggers JD: Joint effects of sodium chloride, glutamine and glucose in mouse preimplantation embryos culture media. Mol. Reprod. Dev. 1992: 31: 189-94.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

17. Earbach GT., Lawitts JA., Papaioannon VE., Biggers JD: Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. Biol Reprod. 1994: 50: 1027-33.

18. Kito S., Tatano S., Ohato Y: Kinetics of in vitro fertilization and development of an inbred mouse strain: A study comparing REF/MS with C57BL/6J. J. Mann. Ova. Res. 2002: 19: 32-8.

19. Briston DR., Schultz RM: Apoptosis during mouse blastocyst formation: Evidence a role for survival factors including transforming growth factor. Biol. Reprod. 1997: 57: 1088-96.

20. Thouas G: Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophoectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod. Biomedi. Online web paper. 2001: 17: 150.

21. Willadsen SM: The developmental capacity of blastomeres from 4-and 8-cell sheep embryos. J. Embryol. EXP. Morphol. 1991: 165-72.

22. Menino AR., Wright RW: Effect of pronase treatment, microdissecton and zona pellucida on the development of porcine embryos and blastomeres in vitro. Biol. Reprod. 1993: 28: 433-46.

23. Suzuki H., Togashi M., Adachi J., and Toyoda Y: Developmental ability of zona free mouse embryos is influenced by cell association at the 4 cell stage. Biol. Reprod. 1995: 53: 78-83.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]