

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 بلاستوسیت 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. ۴۸-۵۰ 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 ۳۷°C و ۵%CO₂ کشت داده شدند. بلاستوسیت 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 در بلاستوسیت 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 LIF به 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 بلاستوسیت می تواند بلاستوسیت هایی با تعداد سلولهای توده ای داخلی بیشتر در اختیارمان قرار دهد، اگرچه اثبات این امر به مطالعات بیشتر و گسترده تری نیاز دارد.

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 صحرایی (۱)، موش سفید آزمایشگاهی (۳،۲)، خرگوش (۵،۴) و اخیراً روی بلاستومرهای جدا شده از حیوانات اهلی از جمله گوسفند (۷،۶)، گاو (۸-۱۰) و خوک (۱۲،۱۱) انجام گرفته است.

مطالعات نشان داده است که بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو سلولی موش (۳،۲)، ۸-۴ سلولی خرگوش (۴)، ۴ 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 می‌شود 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 می‌دهند. به همین دلیل در زمینه بهبود کیفیت محیط کشت تحقیقات گسترده‌ای انجام دادند. به عنوان مثال این محققان متوجه شدند در صورتی 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 بلاستومرهای جدا شده، بیشتر می‌شود. هم چنین مطالعات محققان نشان می‌دهد، در صورتی که این بلاستوسیست‌ها به رحم گیرنده انتقال داده شوند فقط تعداد کمی از آنها به نوزاد تکامل می‌یابند. در توجیه این نقصان آنها احتمال می‌دهند که بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده دارای تعداد کمی سلول در توده

داخلی می‌باشند (۱۴،۱۵). بنابراین به نظر می‌رسد 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 دیدگاه مناسب بلاستوسیست‌های حاصل از کشت بلاستومرها با بلاستوسیست‌های حاصل از کشت جنین‌های دو و چهار سلولی دست نخورده مقایسه گردیده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

در این پژوهش موشهای سفید آزمایشگاهی نژاد ICR (۸ الی ۱۰ هفته‌ای) مورد استفاده قرار گرفته‌اند. موشها در شرایط ۱۲ ساعت نور ۱۲ ساعت تاریکی (روشنایی از ساعت ۵ صبح تا ۵ بعدازظهر) و دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. برای تحریک تخمک‌گذاری و جفت‌گیری تنها از حیواناتی استفاده شد که ظاهر سالم داشته و فعال به نظر می‌رسیدند.

القاء تخمک‌گذاری و جفت‌گیری

به منظور تحریک تخمک‌گذاری مقدار ۷/۵ واحد بین‌المللی هورمون گنادوتروپین سرم خون اسب حامله PMSG و ۴۸ ساعت بعد ۷/۵ واحد بین‌المللی هورمون 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 ۱۲-۱۰ 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

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

بدست آوردن جنین

برای بدست آوردن جنین‌های دو و چهار سلولی ۴۸-۵۶ ساعت پس از تزریق HCG موش‌های ماده با جابجایی مهره‌های گردنی (Cervical dislocation) کشته شده و در شرایط استریل پوست، عضلات شکم و صفاق آن‌ها 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 ۱۰۰-۵۰ میکرولیتری از محیط کشت HTF حاوی ۱ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر BSA (فراکسیون V- فاقد اسید چرب) قرار داده شد و بلافاصله جنین‌ها از لوله رحم به روش فلاشینگ (Flushing) خارج شدند. پس از خارج کردن جنین‌ها از لوله 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 تیروید (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 تیروید که قبلاً در ظرف مخصوص کشت به ابعاد ۳۵ میلی‌متر قرارداد 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 می‌شدند. بدینوسیله از بین رفتن قشر شفاف در زیر میکروسکوپ تعقیب می‌شد تا بلافاصله بلاستومرهای مورد نظر جمع‌آوری شوند تا به غشاء سلولی بلاستومرها آسیبی وارد نیاید. بعد از

گذشت ۲-۱ دقیقه پرده ی 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 نگه‌داری می‌شدند. بعد از این مدت، عمل پی‌پتینگ انجام می‌شد و بلاستومرها از همدیگر جدا (شکل ۱) و هر بلاستومر به‌طور جداگانه در یک قطره محیط کشت، کشت داده می‌شدند. لازم به ذکر است که بلاستومرهایی که در طول مراحل آماده‌سازی سالم بودند کشت داده شدند.

محیط کشت

برای کشت آزمایشگاهی بلاستومرهای جدا شده تا بحال 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 $\frac{1 \text{ ml}}{100 \text{ ml}}$ ، آمینواسید غیر ضروری $\frac{0.5 \text{ ml}}{100 \text{ ml}}$ و آلبومین سرم گاوی به میزان $\frac{1 \text{ mg}}{\text{ml}}$ 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 می‌شدند. 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 ۱۰۰x و یا ۲۰۰x صورت می‌گرفت. ارزیابی اولیه جهت مشاهده ی تقسیمات کلیواژی

آن رسید. در این بلاستوسیست، بلاستوسل بزرگتر از حالت‌های قبل متسع شده و پرده‌ی شفاف نیز نازکتر شده است. به منظور یکسان‌سازی مطالعات، تمام مراحل بلاستوسیستی در یک گروه و تحت عنوان بلاستوسیست شناخته شده‌اند.

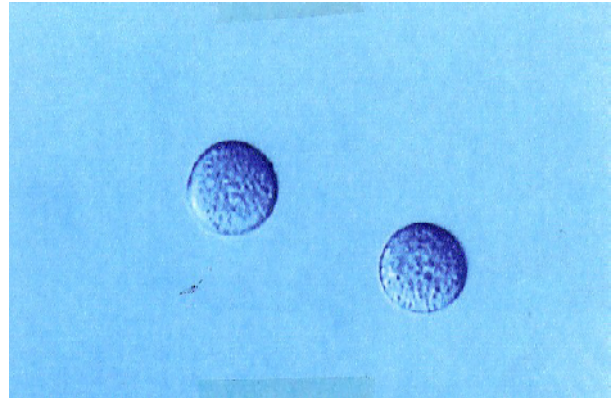
رنگ آمیزی افتراقی بلاستوسیست‌ها

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 X100 و Propidium Iodide) به مدت ۱۰ ثانیه نگه داشته شدند. سپس بلافاصله بلاستوسیست‌ها را به ۵۰۰ میکرولیتر محلول S_2 (این محلول شامل الکل اتانل ۱۰۰٪ و Hoechst 33258) منتقل شده و در دمای $4^{\circ}C$ 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 می‌شدند. سپس شمارش سلولی با استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهز به لامپ اشعه ماوراء بنفش و فیلتر خروجی (Exitation Filter) با طول موج ۴۶۰ نانومتر انجام می‌گرفت. با این رنگ آمیزی سلول‌های توده‌ای داخلی (ICM) به رنگ آبی و سلول‌های تروفوکتودرم به رنگ قرمز دیده می‌شوند (شکل ۴). با توجه به تعداد محدود سلول‌ها، کلیه‌ی سلول‌ها با چشم شمرده شده و با استفاده از شمارش‌گر مخصوص تعداد آنها ثبت می‌گردید. جهت بالا بردن دقت در کار شمارش سلولی تمام جنین‌ها توسط یک نفر انجام می‌شد و هر شمارش نیز دوبار تکرار می‌گردید.

روش آنالیز آماری

میزان تشکیل تعداد سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیست‌های 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.

وسیر تکاملی نمونه‌ها (شکل ۲ و ۳) و ارزیابی بعدی جهت بررسی بلاستوسیست‌ها صورت می‌گرفت.



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



تصویر ۲- 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 می‌شد که بلاستوسل کمتر از نیمی از حجم جنین را بخود اختصاص می‌داد، بلاستوسیست (Blastocyst) به آنهایی گفته می‌شد که بلاستوسل بیش از نیمی از حجم جنین را اشغال نموده بود، بلاستوسیست کامل (Full blastocyst) به آنهایی گفته می‌شد که بلاستوسل بطور کامل جنین را اشغال نموده و نهایتاً بلاستوسیست در حال اتساع (Expanded blastocyst) به آنهایی گفته می‌شد که فقط با کشت نمونه‌های دارای پرده‌ی شفاف سالم می‌توان به

یافته ها

در بلاستوسیت‌های حاصل از کشت نمونه‌های دو سلولی، $5/5 \pm 56$ در بلاستوسیت‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو سلولی و $4/9 \pm 50$ در بلاستوسیت‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های چهار سلولی بود. با مقایسه میزان سلولهای توده‌ای داخلی در بلاستوسیت‌های حاصل از کشت بلاستومرها با سلول‌های توده‌ای داخلی بلاستوسیت‌های حاصل از کشت از جنین‌های سالم و دست نخورده مشاهده می‌شود که میزان این سلول‌ها در بلاستوسیت‌های 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 166 بلاستومر جدا شده از جنین دو سلولی 122 بلاستومر ($37/49$ درصد) و از 164 بلاستومر جدا شده از جنین‌های چهار سلولی 119 بلاستومر ($72/59$ درصد) تقسیمات کلیواژی خود را طی 24 ساعت اولیه کشت آغاز نمودند که میزان این تقسیمات با یکدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ($P > 0.05$).



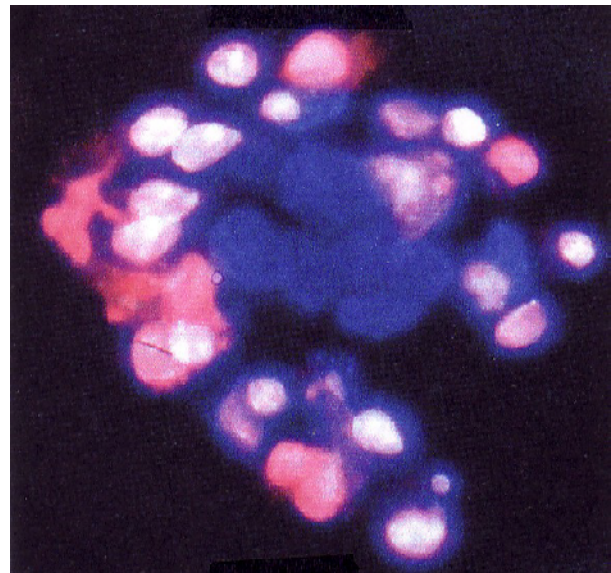
تصویر ۳ - جنین‌های چهار و پنج سلولی حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های چهار سلولی در محیط کشت LIF+KSOM

در این مطالعه از 40 سر موش سفید آزمایشگاهی نژاد ICR (سن $10 - 8$ هفته)، 487 جنین دو و چهار سلولی جمع‌آوری گردید. از این تعداد 270 جنین دو سلولی و 217 جنین چهار سلولی بودند. در این مطالعه 170 جنین دو سلولی با پرده شفاف سالم و 165 جنین چهار سلولی با پرده ی شفاف سالم مورد مطالعه قرار گرفتند. هم چنین پرده شفاف 100 جنین دو سلولی و 52 جنین چهار سلولی برداشته شد و به ترتیب 166 و 164 بلاستومر سالم حاصل گردید. لازم به ذکر است که 34 بلاستومر جدا شده از جنین دو سلولی و 44 بلاستومر جدا شده از جنین چهار سلولی به دلیل آسیب غشای آنها از مطالعات حذف شدند. همانطوریکه در جدول شماره ۱ آمده است $38/82$ درصد از جنین‌های دو سلولی کشت داده شده و $40/6$ درصد از جنین‌های چهار سلولی کشت داده شده به بلاستوسیت تکامل یافته بودند. این نتایج نشانگر آن بود که میزان بلاستوسیت‌های حاصل از هر دو گروه مورد مطالعه ی فوق از نظر آماری با همدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$). همچنین به ترتیب $24/69$ درصد از بلاستومرهای جدا شده از جنین دو سلولی و $22/56$ درصد از بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های چهار سلولی به بلاستوسیت تکامل یافته بودند. میزان بلاستوسیت‌های حاصل از کشت دو نمونه نیز با همدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$). با رنگ آمیزی بلاستوسیت‌های حاصل از کشت نمونه‌ها (شکل ۴) و شمارش سلول‌های توده‌ای داخلی و خارجی مشاهده شد که میزان سلول‌های توده‌ای داخلی در بلاستوسیت‌های حاصل از کشت جنین‌های دو و چهار سلولی به ترتیب برابر $2/6 \pm 19$ و $3/7 \pm 21$ و در بلاستوسیت‌های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین‌ها دو و چهار سلولی به ترتیب $1/8 \pm 7$ و $0/5 \pm 5$ می‌باشد. میزان سلول‌های توده‌ای خارجی بلاستوسیت‌های حاصل از کشت نمونه‌ها به ترتیب عبارت بودند از: $4/8 \pm 50$

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

نمونه	تعداد جنین	تعداد تکرار دفعات	تقسیمات کلیواژی بلاستومرها	تعداد بلاستوسیت	تعداد ICM	تعداد DCM
جنین دو سلولی	۱۷۰	۱۰	-----	۶۶ (۳۸/۸۲)	۱۹ ± ۲/۶ -۲۴ (۱۵)	۵۰ ± ۴/۸ (۴۳-۵۵)
جنین چهار سلولی	۱۶۵	۱۰	-----	۶۷ (۴۰/۶۰)	۲۱ ± ۳/۷ -۲۵ (۱۸)	۵۶ ± ۵/۵ (۴۹-۶۰)
بلاستومر جدا شده از جنین دو سلولی	۱۶۶	۱۰	(۷۳/۴۹) ۱۲۲	۴۱ (۲۴/۶۹)	۷ ± ۱/۸ (۳-۱۰)	۵۴ ± ۵/۳ (۵۰-۵۹)
بلاستومر جدا شده از جنین چهار سلولی	۱۶۴	۱۰	(۷۲/۵۹) ۱۱۹	۳۷ (۲۲/۵۶)	۵ ± ۰/۵ (۳-۸)	۵۰ ± ۴/۹ (۴۳-۵۳)

امکان پذیر بوده و حتی این بلاستومرها در محیط کشت توانایی رسیدن به بلاستوسیت های ظاهراً نرمال را دارند (۵). همچنین این مطالعات موید این مطلب است که قدرت تکوین بلاستومرهای جدا شده از جنین های ۴، ۸ و ۱۶ سلولی با هم متفاوت است و این با دوره ی تکوین جنین هایی که بلاستومرها از آن جدا می شوند نسبت عکس دارد، به این صورت که با افزایش دوره تکوینی جنین ها قدرت تکوین بلاستومرها کاهش می یابد (۵). در همین رابطه یافته های Ekert و همکاران (۱۲) که مطالع ی خود را روی بلاستوسیت های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین های 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 جنین های اولیه در موش ICR، در خرگوش و خوک مشابه است. Ekert و همکاران در تحقیقات خود متوجه شدند که میزان کل سلول ها در یک بلاستوسیت و سلول های توده ای داخلی در بلاستوسیت های حاصل از تکوین بلاستومرها کمتر از میزان سلول های توده ای داخلی بلاستوسیت های حاصل از کشت جنین های سالم است. این یافته ها با نتایج سایر محققان که روی موش (۲۱)، خرگوش (۴)، گوسفند (۲۰) و خوک (۲۲) مطالعه نمودند مطابقت دارد. در عوض محققان دیگری معتقدند که بلاستومرهای جدا شده از جنین های هشت سلولی رشد بیشتری نسبت به بلاستومرهای جدا شده از جنین های چهار سلولی دارد (۱۱).



تصویر ۴- بلاستوسیت حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده از جنین چهار سلولی در محیط کشت LIF+KSOM که توسط رنگ آمیزی افتراقی یا دوگانه رنگ آمیزی شده است. در این تصویر سلول های توده داخلی به رنگ آبی و سلول های توده خارجی به رنگ قرمز دیده می شوند

بحث

مطالعاتی که روی قدرت تکوین بلاستومرهای جدا شده از جنین های ۴، ۸ و ۱۶ سلولی خرگوش انجام شده است، نشان می دهد که تقسیمات سریع کلیواژی در بلاستومرهای جدا شده

سالم و دست نخورده (Intact) کمتر است، در صورتیکه میزان سلولهای توده ای داخلی در بلاستوسیت های حاصل از کشت جنین های دو و چهار سلولی با هم دیگر تفاوت معنی داری را نشان نمی داد. همچنین درست است که تعداد سلولهای توده ای داخلی در بلاستوسیت های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده در جنین های دو و چهار سلولی نسبت به جنین های سالم و دست نخورده کمتر است، اما نسبت به همدیگر تفاوت معنی داری ندارد. دلیل کاهش میزان سلولهای توده ای داخلی در بلاستوسیت های حاصل از کشت بلاستومرها در مقایسه با بلاستوسیت های حاصل از کشت جنین های سالم و دست نخورده شاید به دلیل کلیواژ تأخیری سلولهای توده ای داخلی بلاستوسیت های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده باشد که شاید دلیل آن حساسیت بالای سلولهای توده ای داخلی به شرایط محیط کشت بدون پرده ی شفاف باشد. میزان سلولهای توده ای خارجی در بلاستوسیت های حاصل از کشت جنین های دو و چهار سلولی و همچنین بلاستومرهای جدا شده از جنین های دو و چهار سلولی با همدیگر تفاوت معنی داری 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 می رسد، اینکه چه تعداد سلول باید در توده ی داخلی باشد تا یک بلاستوسیت در دیواره رحم جایگزین و به نوزاد تبدیل شود، دقیقاً مشخص نیست، اما بیشترین درصد سلولها توده ی داخلی در بلاستوسیت تکوین یافته در محیط داخلی بدن حدود ۴۰٪ گزارش شده است. همچنین این سؤال مطرح می شود که چرا بعضی از بلاستوسیتها با مقدار کم سلول در توده داخلی موقعی که به رحم منتقل می شوند می توانند 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.

همچنین دیده شده است که نسبت سلولهای توده ای داخلی و کل سلولها در بلاستوسیت های 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 بلاستوسیت های حاصل از کشت جنین های سالم و دست نخورده ۴، ۸ و ۱۶ سلولی خرگوش میزان سلولهای توده ای داخلی و کل سلولها از میزان سلول های بلاستوسیت های حاصل از کشت ۴، ۸ و ۱۶ سلولی بدون پرده شفاف بیشتر است (۱۵، ۱۲، ۵، ۲۳). این مطالعات نشان می داد که پرده شفاف نه تنها به عنوان سد حفاظتی برای جنین عمل می کند بلکه تقسیمات سلولی و رشد سلولهای ICM و تروفوکتودرم را نیز در گونه های مختلف جانوران تنظیم می کند.

در این پروژه جنین های دو و چهار سلولی موش سفید آزمایشگاهی نژاد ICR و بلاستومرهای جدا شده از جنین های دو و چهار سلولی در محیط کشت KSOM+ AA تا ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند. این مطالعه نشان داد که قدرت تکوینی جنین های دو و چهار سلولی با همدیگر یکسان است. همچنین بلاستومرهای جدا شده از جنین های دو و چهار سلولی دارای این توانایی می باشند که به بلاستوسیت تکوین یابند و میزان این تکوین در هر دو گروه بلاستومر تقریباً یکسان است. یعنی با یافته های این مطالعه می توان گفت که قدرت تکوین بلاستومرهای مربوط به جنین های دو و چهار سلولی به دوره تکوین جنین هایی که از آن جدا می شوند بستگی ندارند. این یافته با یافته های Tao. T (۵) و با یافته های Saito. S و همکاران منطبق است (۱۱). شمارش سلولهای توده ای داخلی در بلاستوسیت های حاصل از کشت جنین های دو و چهار سلولی نشان داد که تعداد این سلولها در بلاستوسیت های حاصل از کشت بلاستومرهای جدا شده بطور معنی داری از جنین های دو و چهار سلولی

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. Reprod. 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. Reprod.* 2000: 15: 881-9.
6. Willadsen SM: A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twinning. 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 blastomeres from an invitro derived four cell embryos. *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. Wilton 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.

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. Biomed.* 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, microdissection 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.