مقاله تحقیقی

ارزیابی آثار فاکتور رشد اپیدرمال بر تکوین جنین موش در مراحل قبل از لانه‌گزینی

منصوره موحدین Ph.D.*، سیدمرتضی کروجی M.Sc.*، عبدالهادی انجم‌روز M.Sc.*

*گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: بهمن ماه ۸۱، تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۸۲

چکیده

هدف: ارزیابی اثرات دوزهای مختلف فاکتور رشد اپیدرمال (EGF) اگزوژنوس بر تکوین جنین موش در مراحل قبل از لانه‌گزینی.

مواد و روشها: زیگوت، جنین دو سلولی، هشت سلولی و مورولا از موشهای ماده بالغ نژاد NMRI پس از تحریک تخمک‌گذاری، به ترتیب ۲۴، ۴۸، ۶۴ و ۸۰ ساعت پس از تزریق hCG به‌دست آمد و جنینهای هر یک از مراحل تکاملی به چهار گروه شاهد و سه گروه تجربی تقسیم شدند.

به محیط جنینهای گروههای تجربی EGF با دوزهای ۱، ۴، ۱۰ ng/ml افزوده شد و جنینهای هر یک از گروهها به‌مدت ۹۶ ساعت کشت داده شدند. میزان بلاستوسیست حاصله و همچنین بلاستوسیست‌های خارج شده یا در حال خروج از زونا روزانه گزارش شدند و نتایج بدست آمده توسط آزمون آماری مجذور کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که EGF اگزوژنوس قادر نبود که به زیگوتها برای غلبه بر ایست تکوینی در مرحله دو سلولی کمک کند و میزان جنین دو سلولی حاصل در گروههای تجربی کمتر از گروه شاهد بود. از نظر میزان خروج از زونا تفاوت معنی‌داری بین جنینهای دو سلولی گروه شاهد و گروههای تجربی مشاهده نشد. اما تعداد بلاستوسیست حاصل در گروه تجربی دوم که EGF با غلظت ۴ng/ml دریافت کردند به‌صورت معنی‌داری کمتر از گروه شاهد و دیگر گروههای تجربی بود. میزان درصد خروج از زونا جنینهای هشت سلولی و مورولا که EGF با غلظت ۱۰ ng/ml به محیط کشت آنها اضافه شده بود، به‌صورت معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد و دوزهای دیگر EGF بود.

نتیجه‌گیری: EGF اگزوژنوس قادر است که رشد و تکوین جنین موش در مرحله قبل از لانه‌گزینی را پس از هشت سلولی بهبود بخشد. اما در مراحل اولیه تکاملی، اثرهای تسریع تکامل با افزودن EGF به محیط کشت مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: فاکتور رشد اپیدرمال، جنین قبل از لانه‌گزینی، موش

مقدمه

با اینکه بیش از یک دهه از لقاح در محیط کشت[1] IVF و انتقال جنین می‌گذرد و در شرایط کشت جنین پیشرفت‌های زیادی حاصل شده است، اما هنوز میزان لانه‌گزینی و موفقیت در بارداری پایین است. همزمان با این پیشرفت‌ها، تحقیقات زیادی به منظور بهبودی شرایط کشت بلاستوسیست و انتقال در این مرحله صورت گرفته و امروزه طراحی محیطهای کشتی که دارای ترکیبات جدید بوده و قادر به حمایت از نیازهای تغذیه‌ای جنین در حال تکامل هستند، آغاز شده است.

تحقیقات اخیر نشان دهنده آنست که فاکتورهای رشد و سیتوکینها دارای نقش مهمی در تکامل اولیه جنینی و پروسه لانه‌گزینی هستند [۱و۲].

گزارشهایی مبنی بر بروز فاکتورهای رشد اپیدرمال (EGF)[2]، رشد ترنسفورمینگ آلفا و بتا (TGF-$\alpha\beta$)[3]، رشد شبه انسولین (IGFI,II)II,I[4]، رشد مشتق از پلاکتها (PDGF)[5]، اینترلوکین I(IL)[6] و مهارکننده لوسمی (LIF)[7] و گیرنده‌های آنها در جنین و سیستم تناسلی موش [۳]، گاو [۴]، گوسفند [۵] و انسان [۶] در دست است. از میان این فاکتورهای

1- In Vitro Fertilization
2- Epidermal Growth Factor
3- Transforming Growth Factor $\alpha\beta$
4- Insulin-like Growth Factor
5- Platelet-derived Growth Factor
6- Interlukin
7- Leukmia Inhibitory Factor

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح
صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵ Email: movahedm@hotmail.com

رشد، EGF تکثیر سلول و تمایز را تحریک کرده [۷]، باعث بلوغ سیتوپلاسم تخمک نابالغ موش [۸] و انسان [۹] شده و همچنین EGF به همراه گیرنده آن در تخمدان، لوله فالوپ و آندومتر پستان داران پیدا شده است [۱۰،۱۱و۱۲].

بعضی محققین که به آثار سودمند کشت همزمان جنین با تک لایه سلولی اشاره کرده‌اند، اظهار داشته‌اند که در این سیستم‌های کشت برخی از فاکتورهای رشد از جمله TGF-a,EGF [۱۳و۱۴] و اینترلوکین -۶ ترشح می‌شود [۱۵].

هرچند که وجود یک لایه سلول تغذیه‌کننده، هرگز قابل مقایسه با محیط پیچیده و قابل تغییر لوله فالوپ نیست، مشکلات بسیاری هم در راه استفاده از رده‌های سلولی در روش کشت همزمان وجود دارد. گاهی ممکن است از متابولیسم سلول‌های به‌کار رفته، محصولات فرعی مضری به درون محیط آزاد شود یا محیط و پیش ماده‌های لازم برای سلول‌های تغذیه‌کننده با جنین متفاوت باشد. مشکل دیگر آنست که سلول‌های به‌کار رفته باید در کشتهای طولانی مدت نگهداری شوند و این زمان طولانی احتمال آلودگی را بالا می‌برد؛ در نتیجه به ترکیبات آنتی‌بیوتیکی پیچیده‌تر و غلیظ‌تری نیاز است و علاوه بر این؛ سلولها ممکن است نسبت به جنین نیازهای کاملاً متفاوتی داشته باشند [۱۶] که با توجه به این مسائل، استفاده از هم کشتی در کشت جنین دارای مشکلات فراوانی است. بنابراین به نظر می‌رسد که چنانچه بتوان فاکتورهای رشد را به محیط کشت جنین اضافه نمود می‌توان از همان اثرهای هم کشتی سود جست. هر چند که مکانیسم دقیق و زمان تأثیر EGF بر تکامل جنین و لانه‌گزینی هنوز مشخص نشده، اما کوشش‌های محدودی به منظور افزودن این فاکتور رشد به محیط کشت جنین صورت گرفته [۱۷،۱۸و۱۹] که در هر حال به‌صورت معنی داری میزان تولید بلاستوسیست را در محیط کشت افزایش داده است.

در تحقیقات انجام شده مشخص نشده است که EGF قادر است روی کدامیک از مراحل تکاملی جنین قبل از لانه‌گزینی بیشترین تأثیر را داشته باشد. علاوه بر آن؛ محققین با استفاده از دوزهای متفاوتی از EGF آثار مفید آن‌را مشاهده نمودند که به نظر می‌رسد پاسخ جنین تا اندازه‌ای وابسته به‌گونه و مرحله تکاملی جنین باشد. بنابراین در این تحقیق به بررسی آثار EGF با دوزهای متفاوت بر مراحل مختلف تکاملی جنین از زیگوت تا مورولا پرداخته شده تا مشخص شود که در کدام مرحله تکاملی و کدام دوز مناسبترین پاسخ از نظر تسریع در رشد و تکوین مشاهده می‌شود.

مواد و روشها

حیوان آزمایشگاهی

موشهای ماده از نژاد NMRI با سن ۶ تا ۹ هفته از انستیتوی رازی تهران تهیه و تحت شرایط کنترل شده ۱۲ ساعت دوره روشنایی و ۱۲ ساعت دوره تاریکی و درجه حرارت ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند. موش‌های نر بالغ از همان نژاد با سن تقریبی ۱۰ تا ۱۲ هفته نیز برای جفت‌گیری انتخاب شدند.

تحریک تخمک‌گذاری

به منظور تحریک تخمک‌گذاری به موشهای ماده میزان ۱۰ واحد بین‌المللی از hMG (Serono, Italy) به‌صورت داخل صفاقی[1] تزریق و پس از گذشت ۴۸ ساعت ۱۰ واحد بین‌المللی hCG (Organon,Holland) به همان صورت تزریق شد. سپس به منظور جفت‌گیری موشهای نر و ماده به‌صورت یک به یک کنار هم قرار گرفتند. صبح روز بعد با مشاهده پلاک واژن، موشهای باردار جدا شدند و برای بدست آوردن جنینهای تک سلولی، دو سلولی، هشت سلولی و مورولا، موش‌های باردار به ترتیب ۲۴، ۴۸، ۶۴ و ۸۰ ساعت پس از تزریق hCG با روش دررفتگی گردن کشته شده و لوله‌های رحم و رحم آنها خارج شد. برای بدست آوردن زیگوت و جنینهای دو و هشت سلولی لوله رحم و برای به‌دست آوردن مورولا هم لوله رحم و هم رحم با تزریق مقداری محیط کشت T6 حاوی سرم به داخل آنها، فلاش شد و جنینهای به‌دست آمده پس از چند بار شستشو، در قطره‌های T6 [که قبلا آماده شده بود و محتوی Bovine Serum Albumin) BSA با میزان ۵mg/ml بود] به منظور تعادل قرار گرفتند.

1- Intra peritoneal

کشت جنینها و افزودن EGF به محیط کشت و آزمون آماری

برای تهیه غلظتهای مورد نظر از ذخیره ۱۰۰۰ng/ml، EGF استفاده شد و با افزودن به محیط کشت T_6 غلظتهای ۱، ۴ و ۱۰ ng/ml حاصل شد. سپس به قطرات محیط کشت از هر یک از سه غلظت مورد نظر افزوده و قطرات محیط کشت حداقل به‌مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور CO_2 دار با میزان ۵ درصد قرار داده شد.

جنینهای به‌دست آمده در هر مرحله تکاملی به چهار گروه شاهد (کشت در محیط T_6)، تجربی ۱ (کشت در محیط T_6 حاوی ۱ng/ml از EGF)، تجربی ۲ (کشت در محیط T_6 حاوی ۴ng/ml از EGF) و تجربی ۳ (کشت در محیط T_6 حاوی ۱۰ng/ml EGF) تقسیم شدند. تکامل جنینهای کلیه گروهها به‌مدت ۹۶ ساعت توسط میکروسکوپ معکوس بررسی و روزانه گزارش شد. تکرار آزمایش ۳ تا ۵ بار بود. نتایج به‌دست آمده توسط آزمون آماری مجذور کای آنالیز شده و اختلاف معنی‌داری در نظر گرفته شد ($P<0.05$).

یافته‌ها

در جداول ۱ تا ۴ نتایج حاصل از افزودن EGF با غلظت‌های ۱، ۴ و ۱۰ ng/ml به محیط کشت T_6 خلاصه شده است. همان‌طور که از جدول ۱ برمی‌آید هیچ‌یک از غلظتهای EGF نتوانسته است بر ایست تکوینی در مرحله دو سلولی که در جنین موش بعضی از گونه‌ها مشاهده می‌شود، غلبه کند و زیگوت‌ها از مرحله دو سلولی به بعد پیش نرفتند. به عبارت دیگر همان‌طور که محیط ساده نمکی T_6 قادر به حمایت از عبور زیگوت‌ها از مرحله دو سلولی نبود، افزودن EGF نیز نتوانست به این مسأله کمکی کند. میزان درصد جنینهای دوسلولی حاصل در گروههای شاهد و گروههای تجربی که به آنها EGF با غلظت ۱، ۴ و ۱۰ ng/ml افزوده شده بود به ترتیب ۷۰/۷، ۶۲، ۴۰ و ۶۹ درصد بود که از این میان گروهی که به محیط کشت آن ng/ml ۴ از EGF اضافه شده بود، کمتر بوده و با بقیه گروهها تفاوت معنی‌دار داشت ($P<0.05$).

در جدول ۲ نتایج حاصل از افزودن EGF به محیط کشت جنینهای دو سلولی موش خلاصه شده است. این جدول نشان می‌دهد درحالی‌که میزان درصد بلاستوسیست در گروه شاهد ۸۲ درصد بوده است. این مقدار برای گروه تجربی که به آن ng/ml ۴ افزوده شده بود کمتر (۶۶/۱ درصد) از بقیه گروهها و با کلیه گروهها تفاوت معنی‌دار داشت ($P< 0.05$). اما از نظر میزان بلاستوسیست در حال خروج یا خارج شده از زونا بین گروه شاهد و گروههای تجربی هیچ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، هر چند این مقدار برای گروه تجربی دوم از همه کمتر بود.

جدول ۱. رشد و تکوین زیگوت‌های موش در محیط کشت T_6 حاوی EGF با غلظت‌های مختلف پس از ۹۶ ساعت کشت

غلظت‌های EGF (ng/ml)	تعداد زیگوت‌ها	جنینهای دوسلولی (درصد)	تعداد بلاستوسیست حاصل (درصد)
شاهد	۷۵	۵۳ (۷۰/۷)	۰ (۰)
تجربی ۱	۷۸	۴۴ (۶۲)	۰ (۰)
تجربی ۲	۶۸	۲۷[a] (۴۰)	۰ (۰)
تجربی ۳	۶۴	۳۹ (۶۹)	۰ (۰)

غلظت EGF در تجربی ۱: ۱ng/ml، تجربی ۲: ۴ng/ml، تجربی ۳: ۱۰ng/ml بوده و شاهد فاقد EGF بود.

a : تفاوت با کلیه گروهها معنی‌دار است ($P<0.05$).

جدول ۲. رشد و تکوین جنینهای دو سلولی موش در محیط کشت T_6 حاوی EGF با غلظت‌های مختلف پس از ۹۶ ساعت کشت

غلظت‌های EGF (ng/ml)	تعداد جنینهای دو سلولی	تعداد بلاستوسیست حاصل (درصد)	تعداد بلاستوسیست خارج شده یا در حال خروج از زونا (درصد)
شاهد	۵۰	۴۱ (۸۲)	۳۲ (۶۴)
تجربی ۱	۵۷	۴۵ (۷۹)	۳۴ (۵۹/۵)
تجربی ۲	۵۹	۳۹[a] (۶۶/۱)	۳۱ (۵۳)
تجربی ۳	۶۲	۵۱ (۸۲/۳)	۴۰ (۶۴/۵)

غلظت EGF در تجربی ۱: ۱ng/ml، تجربی ۲: ۴ng/ml، تجربی ۳: ۱۰ng/ml بوده و شاهد فاقد EGF بود.

a : تفاوت با کلیه گروهها معنی‌دار است ($P<0.05$).

نتایج حاصل از افزودن EGF به محیط کشت جنینهای هشت سلولی در جدول ۳ درج شده است. این جدول نشان می‌دهد که از نظر میزان درصد بلاستوسیست حاصل بین گروه شاهد و گروههای تجربی تفاوت معنی‌دار وجود نداشت و این میزان در گروه تجربی سوم که به محیط کشت جنینهای آن EGF با غلظت ۱۰ng/ml افزوده شده بود، بیشتر از بقیه گروهها بود (۷۸/۹ درصد). میزان بلاستوسیست خارج شده و یا در حال خروج از زونا گروه تجربی سوم از گروه شاهد و بقیه گروههای تجربی بیشتر بوده (۸۱ درصد) و با کلیه گروهها تفاوت معنی‌دار داشت. ($P< 0.05$).

جدول ۳. رشد و تکوین جنینهای هشت سلولی موش در محیط کشت T_6 حاوی EGF با غلظت‌های مختلف پس از ۹۶ ساعت کشت.

غلظت‌های EGF (ng/ml)	تعداد جنین هشت سلولی دو سلولی	تعدادبلاستوسیست حاصل (درصد)	تعداد بلاستوسیست خارج شده یا در حال خروج از زونا (درصد)
شاهد	۵۹	۴۸ (۸۱/۴)	۴۱ (۶۹/۴)
تجربی ۱	۶۰	۵۰ (۸۳/۵)	۴۶ (۷۶/۷)
تجربی ۲	۶۲	۵۳ (۸۵/۵)	۴۸ (۷۷/۴)
تجربی ۳	۵۸	۵۱ (۸۷/۹)	۴۷[a] (۸۱)

غلظت EGF در تجربی ۱: ۱ng/ml، تجربی ۲: ۴ng/ml، تجربی ۳: ۱۰ng/ml بوده و شاهد فاقد EGF بود.

a : تفاوت با کلیه گروهها معنی‌دار است ($P<0.05$).

یافته‌های حاصل از افزودن EGF با غلظت‌های ۱، ۴ و ۱۰ ng/ml بر جنینهای مورولای موش در جدول شماره ۴ خلاصه شده است. این جدول نشان می‌دهد که از نظر تعداد کل بلاستوسیست که در طی ۹۶ ساعت کشت در گروههای شاهد و تجربی به‌دست آمده تفاوت معنی‌داری بین گروهها مشاهده نشد و بیشترین درصد بلاستوسیست مربوط به گروه تجربی سوم که EGF با غلظت ۱۰ ng/ml دریافت کردند، بود. از نظر میزان بلاستوسیست خارج شده یا در حال خروج بیشترین مقدار مورولا به گروه تجربی سوم بود (۸۳/۲ درصد) و از این نظر با گروه شاهد و دیگر گروههای تجربی تفاوت معنی‌دار دیده شد ($P< 0.05$).

جدول ۴. رشد و تکوین جنینهای مورولای موش در محیط کشت T_6 حاوی EGF با غلظت‌های مختلف پس از ۹۶ ساعت کشت

غلظت‌های EGF (ng/ml)	تعداد مورولا هشت سلولی دو سلولی	تعداد بلاستوسیست حاصل (درصد)	تعداد بلاستوسیست خارج شده یا در حال خروج از زونا (درصد)
شاهد	۵۸	۴۹ (۸۴/۵)	۴۱ (۷۰/۶)
تجربی ۱	۴۸	۴۲ (۸۷/۵)	۳۲ (۶۶/۷)
تجربی ۲	۵۱	۴۶ (۹۰/۲)	۳۵ (۶۸/۶)
تجربی ۳	۵۹	۵۵ (۹۳/۳)	۴۹[a] (۸۳/۲)

غلظت EGF در تجربی ۱: ۱ng/ml، تجربی ۲: ۴ng/ml، تجربی ۳: ۱۰ng/ml بوده و شاهد فاقد EGF بود.

a : تفاوت با کلیه گروهها معنی‌دار است ($P<0.05$).

بحث

برای اینکه جنین بتواند با موفقیت مراحل تکاملی خود را طی کند نیاز به بروز ژنوم در زمان مناسب، تنظیم هورمونی، منبع انرژی و فاکتورهای رشد یا سیتوکین‌هایی که توسط لوله فالوپ، رحم یا خود جنین ترشح می‌شود، دارد. هر چند که مکانیسم دقیق هنوز مشخص نشده است، اما مسلم است که این فاکتورهای رشد نقش مهمی در پروسه لانه‌گزینی همزمان با تکامل جنین دارد [۱۹]. فاکتورهای رشد از قبیل EGF، TGF-α، IGF-I,II و PDGF در سیستم تناسلی ساخته شده [۲۰] و باعث تمایز در جنین مراحل اولیه تکامل می‌شوند. زمان سنتز، مقدار و مکانیسم دقیق این فاکتورهای رشد هنوز نامشخص است و در مورد اثر آنها بر تکامل جنین نظرات متناقضی وجود دارد [۱۹]. از میان فاکتورهای رشد، EGF باعث تمایز و تکثیر سلولی شده [۷]، محرک بلوغ سیتوپلاسم تخمک نابالغ موش و انسان [۸و۹] محسوب شده و به‌عنوان یک میتوژن قوی باعث افزایش میتوز شده و تمایز تروفواکتودرم جوندگان را تسریع می‌کند [۲۱]. در ضمن گزارش

شده است که اگر به اندازه کفایت وجود نداشته باشد، لانه‌گزینی موفق رخ نخواهد داد [۲۲].

برخی از محققین هم اعتقاد دارند که EGF دارای نقش مهمی در مرحله compaction و تولید بلاستوسیست جنین در مراحل اولیه تکامل است [۲۳]. اما هنوز مرحله خاصی که EGF می‌تواند در آن تأثیر داشته باشد، مشخص نشده است.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که EGF قادر است رشد و تکوین جنین موش پس از مرحله دو سلولی را تحریک کند و میزان بلاستوسیست حاصل را افزایش دهد. در عین حال؛ در این زمان میزان خروج از زونا که در حقیقت نمادی از لانه‌گزینی است را هم افزایش می‌دهد.

در این مطالعه مراحل تکوینی زیگوت، دو سلولی، هشت سلولی و مورولا انتخاب شده بود. EGF بر زیگوت اثری نداشت و نتوانست باعث غلبه بر ایست تکوینی آن در مرحله دو سلولی شود. علاوه بر این؛ میزان درصد جنینهای دو سلولی حاصل در گروه تجربی دوم که به محیط کشت آن EGF با غلظت ۴ng/ml اضافه شده بود، به‌صورت معنی‌داری کمتر از گروه شاهد و گروههای تجربی دیگر بود که به نظر می‌رسد علیرغم آنکه EGF در این مرحله تکاملی اثر مثبتی از خود نشان نداد؛ اما این غلظت دارای اثرهای مضر بود که علت آن مشخص نیست. اما با توجه به اینکه در مراحل پیشرفته‌تر (هشت سلولی و مورولا) که EGF باعث تسریع در رشد و تکوین جنینها شد، اما با همین غلظت EGF تعداد کمتری به مرحله خروج از زونا رسیدند (جنینهای مورولا) که شاید علت آن نیاز جنین به EGF پاراکرین با یک غلظت خاص باشد.

افزودن EGF به محیط کشت جنینهای دو سلولی باعث افزایش میزان خروج از زونا در گروههای تجربی نسبت به شاهد نشد، هر چند که این مقدار در گروه تجربی سوم که EGF را با غلظت ۱۰ ng/ml دریافت کرده بودند، کمی بیش از گروه شاهد و گروههای دیگر بود، اما در میزان بلاستوسیست‌های حاصل، گروه تجربی دوم (غلظت ۴ ng/ml از EGF) با گروه شاهد و گروههای تجربی دیگر تفاوت معنی‌دار نشان داد. همان‌طور که ذکر شد احتمالاً این اختلاف معنی‌دار به دلیل نیاز جنین به EGF پاراکرین با دوز خاصی است که برای این گونه ۴ ng/ml دوز مطلوبی نیست. درحالی‌که بعضی از محققین دیگر [۱۸] با این دوز توانستند به اثرهای سودمند افزودن EGF به محیط کشت دست یابند. در عین حال مشخص شد که یک محیط کشت ساده نمکی همچون T6 قادر است نیازهای متابولیکی جنین دو سلولی را برآورده سازد و بلاستوسیست و خروج از زونا با میزان خوبی حاصل شود.

در تحقیق حاضر این نتیجه به‌دست آمد که اگر EGF به مراحل تکاملی بعد از دو سلول افزوده شود می‌تواند آثار سودمند خود را آشکار سازد. چنانچه Kim و همکارانش [۱۹] که جنین هشت سلولی را مطالعه کردند به نتایج مشابهی دست یافتند و Desai و همکارانش [۱۸] هم به اثرهای EGF مورولا پرداختند و این مرحله تکاملی را مناسب تشخیص دادند. از آنجا که از مرحله هشت سلولی به بعد نسبت به مراحل ابتدایی‌تر، جنین به مقدار کمتری تحت تأثیر ژنوم اسپرم یا تخمک است و از این مرحله به بعد است که بروز ژنوم پایان می‌یابد؛ بنابراین خود جنین است که به EGF پاراکرین پاسخ می‌دهد [۱۹].

از آنجا که میزان خروج از زونا در جنینهای هشت سلولی و مورولایی که به محیط کشت آنها EGF با غلظت ۱۰ ng/ml افزوده شده بود، افزایش معنی‌دار نشان داد، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت مناسب EGF اگزوژنوس قادر است اثر تحریکی بر لانه‌گزینی جنین، مستقل از آندومتریوم داشته باشد. بنابراین می‌توان گفت که لانه‌گزینی جنین وابسته به تحریک پاراکرین EGF است. احتمال دارد که غلظت مناسب EGF باعث ارتقای فعالیت آنزیمی متالوپروتئینازها[1]، کلاژنازها و فعالیت مولکول‌های cell adhesion در شرایط *in vivo* شود [۱۹]. پس غلظت اختصاصی EGF در یک مرحله تکاملی خاص می‌تواند خروج از زونا و لانه‌گزینی در *in vivo* را هم افزایش دهد.

علل ناکافی بودن لانه‌گزینی را می‌توان توقف تکاملی به‌علت ناهنجاری‌های کروموزومی جنین، نامناسب بودن شرایط کشت، آماده نبودن آندومتریوم و غیره ذکر کرد. بهبود میزان لانه‌گزینی در برنامه‌های IVF-ET هم ناشی از پیشرفت‌هایی است که در نوع محیط کشت و روش کشت حاصل شده است. بنابراین نتایج این مطالعه نشان دهنده آنست که فاکتور رشد EGF

1) Metalloproteinases

می‌تواند در مراحل نهایی تکامل جنین قبل از لانه‌گزینی و در مراحل لانه‌گزینی مؤثر باشد. پس یک محیط کشت ساده همچون T6 قادر به برآورده ساختن نیازهای جنینهای مراحل پیشرفته‌تر تکامل نیست و افزودن EGF اگزوژنوس می‌تواند سودمند باشد. البته باید مطالعات بیشتری درباره اثرهای فاکتورهای رشد بر جنین انسانی در مرحله لانه‌گزینی صورت گیرد تا بتوان محیطهای کشت بهتری طراحی نمود و در نتیجه به هدف نهایی که افزایش میزان بارداری در زوجهای نابارور است، دست یافت.

References

1. **Pfeifer TL, Chegini N.** Immunohistochemcal localization of insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-I receptor and IGF binding proteins 1-4 in human fallopian tube at various reproductive stages. Biol Reprod. 1994; 50: 281-289
2. **Imai T, Kurachi H, Adachi K.** Changes in epidermal growth factor receptor and the levels of its ligands during menstrual cycle in human endometrium. Biol Reprod. 1995; 52: 928-938
3. **Zhang X, Watson AJ, Schultz GA, Armstrong DT.** Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in preimplantation development. Investigation of gene expression by RT-PCR. J Reprod Fertil. 1994; 100: 375-382
4. **Watson** AJ, Hogan A, Mahnel A, Weimer KE, Schultz GA. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. Mol Reprod Dev. 1992; 31: 87-95
5. **Watson AJ, Watson PH, Arcellana-Panlilio M, Warnes D, Walker SK, Schultz G.A, Armstrong DT, Seamark RF.** A growth factor phenotype map for bovine preimplantation development. Biol Reprod. 1994; 50: 725-733
6. **Schultz GA, Heyner S.** Growth factors in preimplantation mammalian embryos. In: Milligan S, ed. Oxford Reu. Reprod Biol. 1993; 15: 43-81
7. **Hill DJ.** Growth factors and their cellular actiens. J Reprod Fertil 1989; 85: 723-730.
8. **Downs SM, Daniel SAJ, Eppig JJ.** Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and a positive stimulus of somatic cell origin. J Exp Zool. 1988; 245: 86-96
9. **Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Teratz GE, Phipps WR, Leung BS.** Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. Fertil Steril. 1991; 55: 1000-1004
10. **Maruo T, Ladines-Liave CA, Samoto T, Matsuo H, Manal AS, Ito H, Mochizuki M.** Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. Endocrinolony. 1993; 132: 924-931
11. **Morishige KI, Kurachi H, Amemiya K, Adachi H, Adachi K, Sakayama Y, Miyake A, Tanizawa O.** Menstrual stage specific expression of epidermal growth factor and transforming growth factor-α in human oviduct epithelium and their role in early embryogenesis. Endocrinology. 1993; 133: 194-201
12. **Berchuck A, Soisson AP, Olt GJ, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Bast RCJr, McCarty KSJr.** Epidermal growth factor receptor expression in normal and malignant endometrium. Am J Obstet Gynecol. 1989; 161: 1247-1252
13. **Haining R, Cameron I, Van Papendarf C.** Epidermal growth factor in human endometrium: Proliferative effects in culture and immunochemical localization in normal and endometriotic tissues. Hum Reprod. 1991; 6: 1200-1205
14. **EL-Dansouri L, Frances A, Westphal L.** Immunocytochemical localization of transforming growth factor-α and epidermal growth factor receptor in human fallopian tubes and cumulus cells. Am J Reprod Immunol. 1993; 30: 82-87
15. **Desai N , Goldfarb J.** Co-cultured human embryos may be subjected to widely different microenvironment

pattern of growth factor/ cytokine release by vero cells during the co-culture interval. Hum Reprod. 1998; 13: 1600-1605

۱۶. **موحدین منصوره، شیخی رضا، قربان مهرنسیم، حسینی سیدزهرا، عاصمی آویسا.** روش‌های عملی و کنترل کیفیت در آزمایشگاه جنین‌شناسی انسانی. مرکز درمان ناباروری و ناتوانی جنسی کوثر، تهران، ایران. ۱۳۸۱ صفحهٔ: ۶۹

17. **Martin K, Barlow D, Sargent I.** Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. Hum Reprod. 1998; 13: 1645-1652

18. **Desai N, Lawson J, Goldfarb J.** Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocysl stage. Hum Reprod. 2000; 15: 410-418

19. **Kim CH, Chae HD, Cheon YP, Kang BM, Chang YS, Mok JE.** The effect of epidermal growth factor on preimplantation development, implantation and its receptor expression in mouse embryos. J Obstet Gynaecol Res. 1999; 25: 87-93

20. **Brison DR, Hewitson LC, Leese HJ.** Glucose, Pyruvate and lactate concentration in the blastocoele cavity of rat and mouse embryos. Mol Reprod Dev. 1993; 35: 227-232

21. **Paria BC, Dey SK.** Preimplantation embryo development in vitro cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87: 4756-4760

22. **Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ.** Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. Nature. 1992; 359: 76-79

23. **Dardik A, Schultz RM.** Blastocoele expansion in the preimplantation mouse embryo. Stimulatory effects of TGF-α and EGF. Development 1991; 113: 919-930