مقاله تحقیقی

بهبود تکوین و کیفیت جنینهای هشت سلولی موش در محیط کشت حاوی فاکتور محرک کولونی ماکروفاژ - گرانولوسیت

بهناز شیخ‌الاسلامی .M.Sc*، مژده صالح‌نیا .Ph.D**، مجتبی رضازاده .Ph.D***

* کارشناس ارشد گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

** دانشیار گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

*** استاد گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: اردیبهشت ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: تیر ماه ۸۳

چکیده

هدف: فاکتور محرک کولونی گرانولوسیت - ماکروفاژ (GM-CSF: Granolocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) فاکتوری از خانواده لنفوهماتوپوئیتیکی است که توسط سلولهای اپی‌تلیالی اندومتر ترشح می‌شود و جنین مراحل پیش از لانه‌گزینی گیرندهٔ آن را بروز می‌دهند. در این تحقیق تکوین جنینهای هشت سلولی در حضور و غیاب GM-CSF با هم مقایسه شد.

مواد و روشها: موشهای نژاد NMRI پس از تحریک تخمک‌گذاری با pMSC (pregnant Mare Serum Gonadotropin) و hCG (human Chorionic Gonadotropin) با فاصله ۴۸ ساعت و انجام جفت‌گیری در روز سوم بارداری با جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند و جنینهای هشت سلولی تخلیه شده و درون قطرات محیط کشت قرار داده شدند و در دو گروه کشت شدند: یک گروه شاهد شامل جنینهای هشت سلولی در محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی و یک گروه آزمون که در محیط آنها ۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF نیز افزوده شده بود. تکوین جنینهای هشت سلولی به مدت ۹۶ ساعت بررسی شد. بلاستوسیستها برای شمارش تعداد کل سلولها رنگ‌آمیزی شدند و قطر آنها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: جنینهای هشت سلولی در حضور GM-CSF تکوین سریعتری داشته‌اند به‌طوری که سرعت تکوین آنها ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از برداشت جنین نسبت به گروه شاهد بیشتر بوده است و همچنین میزان درصد بلاستوسیستهای حاصل از این جنین در دو گروه شاهد و حاوی GM-CSF به ترتیب ۷۷/۸۶ و ۸۸/۶۲ درصد بود که از نظر آماری این اختلاف معنی‌دار بود ($p<0.005$). قطر بلاستوسیستهای حاصل از این جنینها به ترتیب ۱۳۴/۱۱ و ۱۳۸/۹۷ میکرومتر بود و تعداد کل سلول بلاستوسیستهای حاصل از این جنینها در دو گروه فوق نیز به ترتیب ۸۱ و ۹۵/۶۰ سلول بود که از این نظر نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد GM-CSF می‌تواند سرعت تکوین اولیه و نیز تشکیل بلاستوسیست را در جنینهای هشت سلولی را بهبود بخشیده و قطر بلاستوسیست و تعداد کل سلول بلاستوسیستهای حاصل از آنها را نیز افزایش دهد.

کلید واژه‌ها: فاکتور محرک کولونی گرانولوسیت - ماکروفاژ، جنین هشت سلولی، بلاستوسیست

مقدمه

تکوین جنینهای پیش از لانه‌گزینی تحت کنترل فاکتورهای رشد اتوکرینی و پاراکرینی است. اپی‌تلیوم رحم و لوله رحمی و طیف وسیعی از ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها که در سیستم تولیدمثلی طی بارداری وجود دارد احتمالاً منابع اصلی فاکتور رشد پاراکرینی هستند که جنین در حال تکوین را تحت تأثیر قرار می‌دهند. برخی از این فاکتورهای رشد به‌وسیله سلولهای اپی‌تلیال رحمی و سلولهای لنفوهماتوپوئیتیکی هر دو ترشح می‌شوند و به نظر می‌رسد که همپوشانی نسبی بین سیگنالهای

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

تنظیم‌کننده سیستم‌های تولیدمثلی و لنفوهماتوپوئیتیکی وجود دارد. این چنین فاکتورهای رشد احتمالاً واسطه‌ای بین جنین پیش از لانه‌گزینی و تغییراتی هستند که توسط هورمونهای استروئیدی در رحم ایجاد می‌شوند [۳-۱].

یکی از این فاکتورهای خانواده لنفوهماتوپوئیتیکی، فاکتور محرک کولونی ماکروفاژ -گرانولوسیت (GM-CSF) است که در تکثیر و تمایز سلولهای هماتوپوئیتیکی دخالت دارد [۱ و ۲]. این فاکتور توسط طیف وسیعی از سلولها مثل لنفوسیت‌های T، منوسیت‌ها، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها و سلولهای اندوتلیالی گونه‌های مختلف پستانداران ساخته می‌شوند [۸-۴]. این فاکتور طی فاز استروس و اوایل بارداری از رحم و لوله فالوپ ترشح می‌شود و در عملکرد جنین طی مراحل ابتدایی بارداری نقش دارد و در زمان لانه‌گزینی ترشح آن کاهش می‌یابد [۹ و ۱۰]. جنین جوندگان در مراحل پیش از لانه‌گزینی [۱۱]، توده داخل سلولی و سلولهای تروفوکتودرم بلاستوسیست انسان [۱۲] زیرگروه آلفای گیرنده GM-CSF را بروز می‌دهند. در حالیکه گیرنده β در هیچ یک از مراحل تکوینی جنین پیش از لانه‌گزینی بروز نمی‌کند [۱۱ و ۱۲]. مطالعاتی که درخصوص تأثیر GM-CSF بر تکوین و بروز ژن در جنین مراحل قبل از لانه‌گزینی صورت گرفته گرچه تفاوتهایی را ارایه نموده‌اند اما در مجموع آثار مثبت این فاکتور را بر جنین تأیید کردند [۱۵-۱۳]، به‌عنوان مثال زمانی که GM-CSF را در مرحله بلاستوسیست به محیط جنین گاو افزوده‌اند، تأثیری بر افزایش میزان بلاستوسیستهای خارج شده از زونا (Hatched) نداشته است، اما زمانی که در مراحل پایین‌تر آن را به محیط کشت افزوده‌اند به میزان قابل توجهی میزان بلاستوسیستهای حاصل از تکوین این جنینها افزایش یافت است [۱۶].

ترشح وابسته به سیکل GM-CSF در سیستم تولیدمثلی گونه‌های مختلف، نقش فیزیولوژیک آن را در فراهم‌سازی تکوین جنین پیش از لانه‌گزینی مطرح می‌کند به همین دلیل در این آزمایش تأثیر GM-CSF بر تکوین جنینهای هشت سلولی موش نژاد NMRI بررسی شده است.

مواد و روشها

موشهای ماده نژاد NMRI با سن ۱۰-۶ هفته با تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد گنادوتروپین سرم مادیان باردار (pMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin) و ۴۸ ساعت بعد با تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد کوریونیک گنادوتروپین انسانی (hCG: human Chorionic Gonadotropin) تحریک تخمک‌گذاری شدند و درون قفس‌های نر قرار گرفتند. صبح روز بعد پلاک واژن آنها به‌منظور تأیید بارداری بررسی شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق hCG موشهای باردار با جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند و جنینهای دو سلولی از لوله رحمی آنها فلاش شد.

جنینها در دو گروه کنترل (شامل جنینهای هشت سلولی در محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌متر سرم آلبومین گاوی (BSA: Bovine Serum Albumin) و گروه حاوی GM-CSF (شامل جنینهای هشت سلولی در محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA و ۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF) کشت شدند [۱۱]. تکوین جنینهای هشت سلولی به‌صورت روزانه تا ۹۶ ساعت پس از برداشت جنین به‌وسیله میکروسکوب معکوس بررسی و گزارش شد. قطر بلاستوسیستها با Eye piece کالیبره اندازه‌گیری شد.

به‌منظور رنگ‌آمیزی، بلاستوسیستهای حاصل از جنینهای هشت سلولی در مراحل Hatched و Hatching استفاده شدند. بلاستوسیستها در محلول (محیط کشت T6 با یک درصد ترایتون X-۱۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروپیدیوم آیوداید) به مدت ده ثانیه قرار داده شد تا تروفوکتودرم قرمز رنگ شد. بلاستوسیستهای رنگ‌آمیزی شده مستقیماً از محلول به گلیسرول منتقل و پس از آن روی لام برده شدند. شمارش سلولی به‌وسیله یک میکروسکوپ فلوروسنت با طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام شد [۱۷].

اطلاعات مربوط به رشد و تکوین جنین با روش مجذور کای (Chi-square) مقایسه و بررسی شد و با استفاده از روش آنالیز واریاسیون یک طرفه (ANOVA) شمارش کل سلولی و میانگین قطر بلاستوسیستها ارزیابی شد.

یافته‌ها

خلاصه‌ای از نتایج حاصل از کشت جنینهای هشت سلولی تا ۹۶ ساعت پس از برداشت در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. بررسی تکوین روزانه جنین‌های هشت سلولی در حضور و غیاب GM-CSF تا ۹۹ ساعت پس از کشت

زمان	۲۴ ساعت پس از برداشت جنین		۴۸ ساعت پس از برداشت جنین		۷۲ ساعت پس از برداشت جنین		۹۶ ساعت پس از برداشت جنین	
گروه	شاهد	GM-CSF	شاهد	GM-CSF	شاهد	GM-CSF	شاهد	GM-CSF
هشت سلولی (٪)	۴۸ (۳۴/۳۹)	۲۷ (۲۰/۴۵)	۳۴ (۲۷/۸۶)	۱۲ (۹/۰۹)	۱۲ (۹/۸۳)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)
مورولا (٪)	۶۸ (۵۵/۷۳)	۱۰۰* (۷۵/۹)	۷۵ (۶۱/۴۷)	۱۰۳* (۷۸/۰۳)	۳۲ (۲۶/۲۲)	۲۹ (۲۱/۹۶)	۶ (۴/۹۱)	۱ (۰/۷۵)
بلاستوسیست (٪)	۰ (۰)	۰ (۰)	۳ (۲/۵۳)	۹ (۶/۸۱)	۶۱ (۵۰)	۸۵* (۶۴/۳۹)	۲۰ (۳۹)	۲۲ (۱۶/۶۶)
خروج از زونا (٪)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۴ (۳/۲۴)	۷ (۵/۳۰)	۷۵ (۶۱/۴۷)	۹۵ (۷۱/۹۶)
دژنره (٪)	۶ (۴/۹۱)	۴ (۳/۰۳)	۱۰ (۸/۱۹)	۸ (۶/۰۶)	۱۳ (۱۰/۶۵)	۱۱ (۸/۳۳)	۲۱ (۱۷/۲۱)	۱۴ (۱۰/۶۰)

* وجود اختلاف در تکوین روزانه جنین‌های هشت سلولی در حضور GM-CSF ۴۸ ساعت، ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت پس از کشت با گروه شاهد داشت ($P<0.05$). تعداد جنین‌های گروه شاهد و حاوی GM-CSF به ترتیب ۱۲۲ و ۱۳۲ جنین بود.

مقایسه تکوین روزانه جنینهای هشت سلولی در دو گروه شاهد و حاوی GM-CSF نشان داد که این جنینها در حضور GM-CSF در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از برداشت جنین سرعت کلیواژی بیشتری نسبت به گروه شاهد در رسیدن به مرحله مورولا داشتند که از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0.05$). ۹۶ ساعت پس از کشت جنین، درصد بلاستوسیستهای حاصل در دو گروه کنترل و حاوی GM-CSF به ترتیب ۷۷/۶۶ و ۸۸/۶۲ درصد بود که از این میزان به ترتیب ۶۱/۴۷ و ۷۱/۹۶ درصد به مرحله Hatched بلاستوسیست رسیده بودند.

میزان جنینهای دژنره در دو گروه کنترل و حاوی GM-CSF ، ۹۶ ساعت پس از برداشت به ترتیب ۱۷/۲۱ و ۱۰/۶۰ درصد بود که این اختلاف از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نداشت.

در گروه کنترل و حاوی GM-CSF میانگین قطر بلاستوسیستها به ترتیب ۱۳۴/۱۱ و ۱۳۸/۹۷ میکرومتر بود که این تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0.05$).

تعداد کل سلولهای بلاستوسیست حاصل از تکوین جنینهای گروه کنترل و حاوی GM-CSF به ترتیب ۸۱ و ۹۰/۶ سلول بود که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0.05$).

بحث

بررسی نتایج حاصل از تکوین جنینهای هشت سلولی در تحقیق حاضر نشان داد که در گروه کنترل و گروه حاوی GM-CSF ۷۷/۶۶ و ۸۸/۶۱ درصد از جنینها به مرحله بلاستوسیست رسیدند و از این تعداد ۶۱/۴۷ و ۷۱/۹۶ درصد از آنها به مرحله خروج از زونا رسیده بودند. مقایسه آماری این دو گروه نشان داد که از حیث تشکیل بلاستوسیست تفاوت معنی‌داری ($p<0.05$) وجود داشته ولی از نظر درصد خروج از زونا تفاوت معنی‌داری نبود. همچنین مراحل تکوینی اولیه تحت تأثیر GM-CSF سرعت بیشتری در مقایسه با مرحله تکوینی انتهایی داشت. همچنین قطر بلاستوسیستهای آنها تحت تأثیر GM-CSF بزرگتر از گروه کنترل بود و این جنینها در حضور این فاکتور به‌طور متوسط ۱۰ سلول بیشتر از گروه کنترل داشته‌اند. در همین ارتباط نتایج متفاوتی درخصوص جنین گونه‌های مختلف به‌دست آمده است [۱۳ و ۱۸]. به‌عنوان مثال آلیس (Alice) [۱۸] و کویی (Cui) [۱۳] و همکارانشان در گزارش‌های خود اعلام کردند که GM-CSF باعث افزایش سرعت تقسیم نمی‌شود اما بالعکس تحقیق حاضر و نتایج دیگر محققین نشان داد که سرعت تقسیم جنین افزایش می‌یابد [۱۱ و ۱۲].

با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر به نظر می‌رسد که

GM-CSF آثار خود را در مرحله هشت سلولی به‌صورت تکوین بیشتر این جنینها به مرحله بلاستوسیست و کیفیت بهتر آنها نشان داده است، به‌طوری که تعداد کل بلاستوسیست، قطر و تعداد کل سلولهای آنها را افزایش داده است. ممکن است CM-CSF با مشارکت در تحریک متابولیسم سلولی و دریافت گلوکز از طریق مسیر مستقل کینازی [۱۱] مانند آنچه که در سلولهای ملانوما [۱۹] رخ می‌دهد بر تکوین جنینهای پیش از لانه‌گزینی مؤثر باشد. در همین ارتباط کو (Ko) و همکارانش نیز نشان دادند که تعداد کل سلول جنین در مرحله بلاستوسیست در حضور مقادیر متفاوت GM-CSF (۱ ng/ml، ۵ و ۱۰) در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش داشته [۱۴] اما برخلاف نتایج او قبلاً نشان داده شده بود که در حضور GM-CSF تعداد سلولهای جنین تغییری نکرده اما شکل‌گیری بلاستوسیست افزایش داشته [۱۱، ۱۲ و ۱۸] به‌طور مشابه افزایش درصد بلاستوسیست در تحقیق حاضر نیز نشان داده شد که احتمالاً به نظر می‌رسد GM-CSF باعث بروز ژنهای کلیدی شده که در شکل‌گیری بلاستوسیست و عمل Compaction از جمله پروتئینهای E Cadherin یا ژنهای مربوط به کمپلکسهای اتصالی دخالت دارد [۱۵].

افزودن GM-CSF به محیط کشت جنین هشت سلولی گاو علاوه بر بهبود تکوین آنها، درصد خروج از زونا را افزایش داده است [۱۶] اما برخلاف این نتایج، تحقیق حاضر نشان داد که GM-CSF باعث تغییری در درصد هچینگ جنین موش در شرایط *In vitro* نشده است. با توجه به اینکه در موشهای طبیعی حداکثر ترشح GM-CSF طی اوایل بارداری (دوره پیش از لانه‌گزینی) رخ می‌دهد [۱۰] و پس از آن در روز سوم تا چهارم بارداری (زمان لانه‌گزینی) ترشح آن به شدت کاهش می‌یابد [۹]. به نظر می‌رسد GM-CSF در *In vitro* و *In vivo* برای هچینگ ضروری نیست به‌طوری که در *In vivo* عواملی مستقل از GM-CSF در این امر دخیل هستند و بر روند لانه‌گزینی تأثیر می‌گذارند.

بنابراین در مجموع GM-CSF احتمالاً می‌تواند به‌عنوان یک عامل امبریوتروفیک برای تکوین جنین پیش از لانه‌گزینی در محیط کشت مفید باشد و اثر کمتری بر درصد هچینگ جنینها دارد.

References

1. **Ruef C, Coleman DL.** GM-CSF: Pleiotropic cytokine with potential clinical usefulenss. Rev Infect Dis 1990; 12, 1: 41-63.
2. **Chegini N, Tang XM, Dou M.** The expression, activity and regulation of GM-CSF in human endometrial and stromal cells. Mol Hum Reprod 1999; 5: 359.
3. **Croy BA, Guibrt LJ, Browne MA, Gough NM, Stinchcomb DT, Reed N, et al.** Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. Reprod Immunol 1991; 19: 149-66.
4. **Crainie M, Guilbert L, Wegmann TG.** Expression of novel cytokine transcripts in the murine plancenta. Biol Reprod 1990; 43: 999-1005.
5. **Moraes AAS, Paula-Lopes FF, Chegini N, Hansen PJ.** Localization of GM-CSF in the bovine reproductive tract. Reprod Immunol 1999; 52: 154.
6. **Tamura K, Harbison LA, Christenson RK, Imakawa K.** Regulation of endometrial GM-CSF production in the ewe. Biol Reprod 1995; 52: 154.
7. **Tremellen KP, Seamark RF, Robertson SA.** Seminal TGF-β1 stimulates GM-CSF production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. Biol Reprod 1998; 58: 1217-25.
8. **Athanassakis I, Farmakiotis V, Papadimitrious L.** Uterine cytokine production during the menstrual cycle and premplantation stage in mice. Dev Immunol 1999; 7: 33-42.
9. **Robertson SA, Seamark RF.** GM-CSF: one of family of epithelial cell derived cytokines in the preimplantation uterus. Reprod Fertil Dev 1992; 4: 435-48.
10. **Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark Rf.** Ovarian steroid homones regulate GM-CSF synthesis by uterine epithelial cell in the mouse. Biol Reprod 1996; 54: 183-96.
11. **Robertson SA, Sjoblom C, Jasper MJ, Norman RJ, Seamark RE.** GM-CSF promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantion embryos. Biol Reprod 2001; 64: 1206-15.
12. **Sjoblom C, Wikland M, Robertson SA.** GM-CSF acts independently of the bea common subunit of the

GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. Biol Reprod 2002; 67: 1817-23.

13. **Cui XS, Lee JY, Choi SH, Kwon MS, Kim T, Kim NH.** Mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances viability of porcine embryos in defined culture conditions. Anim Rprod Sci 2004; 84: 169-77.
14. **Ko DS, Kim DH, Lee HC, Lee HJ, Park W, Kim SS.** Effect of murine GM-CSF on the expression of GLUT isoforms during mouse preimplantation embryo development. Fertil Steril 2002; 78: 272.
15. **Behr B, Dasig D, Gebhardt J, Wang H, Yen W, Polan ML.** The gap junction gene connexin 37 is upregulated by low level GM-CSF in mouse preimplantation embryos. Fertil Steril 2002; 77: 9.
16. **Moraes AAS, Hansen PJ.** Granulocyte-macrophage colony - stimulating factor promotes development of in vitro produced bovine embryos. Biol Reprod 1997; 57: 1060-5.
17. **Thouas G.** Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod Biomed 2001; 3: 25-9.
18. **Alice AS, Moraes AA, Hansen PJ.** Granulocyte-macrophage colony - stimulating factor promotes development of in vitro produced bovine embryos. Biol Reprod 1997; 57: 1060-5.
19. **Spielholz C, Heaney ML, Morrison ME, Houghton AN, Vera JC, Golde DW.** GM-CSF signals for increased glucouse uptake in human melanoma cells. Blood 1995; 85: 973-80.