مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره یازدهم/ بهار ۱۳۸۵/ ۷۰-۶۰

بررسی اثر فاکتور رشد اپیدرمال بر تکوین جنین‌های ۱۶-۸ سلولی موش و بیان ژن گیرنده این فاکتور پس از انجماد شیشه‌ای

نسیم قربانمهر[۱]، دکتر منصوره موحدین[۲]، دکتر سید جواد مولی[۳]

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

۲- دانشیار گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس (مؤلف مسئول) mansoure@modares.ac.ir

۳- دانشیار گروه ژنتیک دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

زمینه و هدف: انجماد جنین‌های انسانی یک فعالیت روتین در درمانگاههای درمان ناباروری می‌باشد. تکوین موفقیت‌آمیز و لانه‌گزینی جنین‌های منجمد شده به میزان زیادی به محیط کشت مناسب، فاکتورهای رشد، سایتوکاینها و بیان ژنومی دارد. مطالعات اخیر بیانگر نقش مهم فاکتور رشد اپیدرمال (EGF) و رسپتور آن در تکوین جنین و مراحل لانه‌گزینی می‌باشند.

هدف از این مطالعه تعیین تأثیر فاکتور رشد اپیدرمال در تکوین قبل از لانه‌گزینی و بیان رسپتور آن در جنین موش منجمد شده با استفاده از نی کشیده شده می‌باشد.

روش بررسی: جنین‌های ۱۶-۸ سلولی ٦٦ تا ۷۲ ساعت پس از تزریق HCG از موشهای تحریک تخمک‌گاری شده نژاد NMRI بدست آمدند و به ٤ گروه (دو گروه شاهد و دو گروه آزمون) تقسیم شدند. جنین‌های گروه شاهد ۱و۲ به مدت ۹٦ ساعت در محیط- MEM-α و MEM-α +EGF(10 ng/ml) کشت داده شدند. جنین‌های گروه آزمون ۱ و ۲ بلافاصله پس از جمع‌آوری منجمد شدند و پس از ذوب به ترتیب در دو محیط MEM-α و MEM-α +EGF (10 ng/ml) برای مدت ۹٦ ساعت کشت داده شدند. تکوین جنین‌ها بطور روزانه ثبت شد. نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون χ^2 بررسی شدند.

بررسی بیان ژن گیرنده با روش RT-PCR در جنین‌های خارج شده و یا در حال خروج از زونا صورت گرفت. به دنبال واکنش RT (ترجمه معکوس) واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای Nested صورت پذیرفت تا دقت و حساسیت کار افزایش یابد.

یافته‌ها: میزان تشکیل بلاستوسیست و خروج از زونا در جنین‌های منجمد شده به میزان قابل توجهی کمتر از جنین‌های غیرمنجمد بود. میزان دژنراسیون در جنین‌های منجمد شده بوضوح بالاتر بود. مقایسه دو گروه شاهد ۱ با ۲ و آزمون ۱ با ۲ بصورت دو به دو نشان داد که میزان تشکیل بلاستوسیست، خروج از زونا و دژنراسیون در بین این گروهها از تفاوت معنی‌داری برخوردار نیست. بررسی‌های مولکولی با روش RT-PCR نشان دادند که پس از ۹٦ ساعت کشت جنین‌ها mRNA مربوط به گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال در هر ٤ گروه شاهد ۱و ۲، آزمون ۱ و ۲ بیان می‌شود.

نتیجه‌گیری: افزودن EGF با غلظت 10 ng/ml به یک محیط کشت مانند MEM-α هیچگونه تأثیر محرکی بر تکوین جنین‌های منجمد شد و غیرمنجمد ندارد.

انجماد باعث ایجاد وقفه در بیان ژن گیرنده فاکتور رشد پس از ۹٦ ساعت کشت جنین‌های منجمد شده، نمی‌شود.

کلید واژه‌ها: جنین قبل از لانه گزینی، انجماد جنین، فاکتور رشد اپیدرمال، بیان ژن.

وصول مقاله: ۸۴/۹/۲۸ اصلاح نهایی: ۸۵/۳/۱۵ پذیرش مقاله: ۸۵/۳/۱۸

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

مقدمه

علیرغم یک دهه تجربه در امر بارورسازی تخمک در آزمایشگاه، کشت جنین و انتقال آن، متأسفانه میزان لانه گزینی جنین‌های آزمایشگاهی هنوز مطلوب نمی‌باشد (۱). تحقیقات اخیر نشان دهنده نقش فاکتورهای رشد یا سایتوکین‌ها در تکوین اولیه جنین و لانه گزینی آن می‌باشد (۳ و۲). مطالعات متعددی در زمینه سنجش ضرورت حضور فاکتورهای رشد در تکوین جنین‌ها در محیط آزمایشگاه انجام شده است (۵ و۴ و۲). نتایج نشان داده‌اند که فاکتور رشد اپیدرمال در تحریک رشد و تمایز سلولی نقش دارد (۶). همچنین مشخص شده است که حضور EGF[1] تشکیل بلاستوسیست و خروج از زونا را در جنین موش افزایش می‌دهد (۷). از طرفی Kim و همکارانش طی مطالعه‌ای نشان دادند که علی‌رغم تأثیر فاکتور رشد اپیدرمال در میزان خروج از زونا این فاکتور نمی‌تواند میزان تشکیل بلاستوسیست را بهبود بخشد (۱) و Clover و همکارانش نیز اعلام نمودند که افزودن فاکتور رشد اپیدرمال به محیط کشت جنین قبل از لانه‌گزینی، تکوین جنین در محیط آزمایشگاه را تحریک نمی‌نماید (۸).

از سوی دیگر انجماد جنین و نگهداری طولانی مدت آن امروزه یکی از روشهای روتین در درمانگاههای درمان ناباروری و آزمایشگاههای تحقیقاتی می‌باشد و بررسی‌ها نشان داده‌اند که میزان تکوین و لانه گزینی در جنین‌های منجمد شده کمتر از جنین‌های غیر منجمد می‌باشد (۱۱-۹). جهت رفع این مشکل در این زمینه مطالعات بسیاری انجام شد به عنوان مثال Desai و همکارانش نشان دادند که همکشتی[2] بلاستوسیست‌های منجمد شده انسانی با سلولهای Vero بلافاصله پس از ذوب، سرعت تکوین را افزایش می‌دهد (۱۲). مقایسه تکوین جنین ۴ روزه موش در محیط کشت و شرایط همکشتی نشان می‌دهد که استفاده از سیستم همکشتی و یا کشت به همراه ترشحات حاصل از این سیستم، تکوین جنین‌های منجمد شده را در محیط آزمایشگاه بهبود می‌بخشد (۹). از آنجایی که کاربرد سیستم همکشتی با مشکلاتی همراه می‌باشد (۱۳) و EGF می‌تواند یکی از ترشحات این سیستم باشد شاید بتوان این فاکتور را جایگزین این سیستم نمود. هدف از این مطالعه تعیین اثرEGF بر تکوین جنین موش منجمد شده در شرایط آزمایشگاه پس از ذوب و بررسی بیان رسپتور این فاکتور می‌باشد.

روش بررسی

۱- حیوانات آزمایشگاهی: موشهای ماده نژاد NMRI با سن ۶ تا ۸ هفته‌ای از موسسه سرم سازی رازی تهیه شدند و پس از یک هفته قرارگیری در شرایط حیوانخانه (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد مورد استفاده قرار گرفتند. موشهای نر سالم از همین نژاد و با سن حدود ۱۴-۱۰ هفته برای جفت‌گیری استفاده شدند.

۲- تحریک تخمک‌گذاری و جمع‌آوری جنین‌ها: به منظور القاء تخمک‌گذاری در موشهای ماده ابتدا ۷/۵ واحد بین‌المللی PMSG به طریقه درون صفاقی به هر موش تزریق شد و به دنبال آن پس از ۴۸ ساعت ۷/۵ واحد بین‌المللی HCG[3] به موشها تزریق شد. بلافاصله موشها بصورت یک به یک به منظور جفت‌گیری در قفسهای حاوی موش نر قرار داده شدند. صبح روز بعد موشهای ماده از نظر وجود پلاک واژن مورد بررسی

1. Epithermal Growth Factor
2. Co-culture
3. Human Chorionic Gonadotrophin

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

قرار گرفتند و موشهای حامله جدا شدند.۷۲ ساعت پس از تزریق HCG موشهای حامله قطع نخاع شدند و لوله‌های رحمی آنها خارج شدند. لوله‌ها بلافاصله در قطره‌های محیط کشت حاوی سرم قرار داده شدند و با تزریق مقداری محیط کشت به درون لوله‌های رحمی جنین‌های ۸-۱۶ سلولی خارج شده و جمع‌آوری شدند. مجموع جنین‌های مورد استفاده در این بررسی ۳۹۶ عدد بود که از این تعداد ۱۷۶ عدد در دو گروه انجمادی و ۲۲۰ عدد در گروههای شاهد (غیر انجمادی) قرار گرفتند. جنین‌های نامبرده بصورت اتفاقی به ۴ گروه تقسیم شدند: جنین‌های گروه شاهد ۱ به مدت ۹۶ ساعت در محیط کشت MEM-α کشت داده شدند. جنین‌های گروه شاهد ۲ به مدت ۹۶ ساعت در محیط کشت EGF+ MEM-α کشت داده شدند. جنین‌های گروه آزمون ۱و۲ بلافاصله پس از جمع‌آوری به روش انجماد شیشه‌ای منجمد شده و پس از ذوب به مدت ۹۶ ساعت به ترتیب در دو محیط MEM-α و MEM-α +EGF کشت داده شدند.

۳- انجماد شیشه‌ای به روش OPS[1]**:** ضد یخ استفاده شده در این روش ESF40 بود که توسط kasai و همکارانش شرح داده شده بود (۱۴) ترکیب این ضد یخ به قرار زیر بود:

MEM-α.Ficol 30% (Sigma), Sucrose 0.5 mol (Sigma), Ethylene glycol 40%(v/v)

در این روش نی فرانسوی مخصوص انجماد بر روی یک صفحه داغ حرارت دیده و کشیده شد به طریقی که قطر خارجی و داخلی نی حدوداً به نصف قطر اولیه آن رسید (۱۵). سپس نی در باریکترین قسمت توسط یک قیچی تیز بریده شد به نحوی که در دیواره نی ترک و شکاف ایجاد نشود. جنین‌ها پس از جمع‌آوری در قطرات کوچک (با حجم حدود ۲ میکرولیتر) از ضد یخ قرار داده شد و با قرار دادن انتهای باریک نی درون قطره توسط نیروی موئینگی، ضد یخ حاوی جنین‌ها درون نی بالا رفت سپس نی حاوی جنین و ضد یخ بطور مستقیم درون ازت مایع شناور شد. جهت ذوب انتهای نی حاوی جنین‌ها پس از خروج از ازت مایع بطور مستقیم درون قطره محلول ساکارز ۰/۵ مولار قرار داده شد. ستون منجمد شده در عرض ۲-۱ ثانیه ذوب شده و محلول ساکارز وارد نی شد. بلافاصله پس از آن جنین‌ها رسوب کرده از نی خارج شده و وارد محیط ساکارز شدند. پس از چندین بار شستشوی جنین‌ها در محیط کشت محلول ضد یخ به آرامی از محیط جنین پاک شده و نهایتاً جنین‌ها در محیط مورد نظر قرار داده شدند (تصویر ۱).

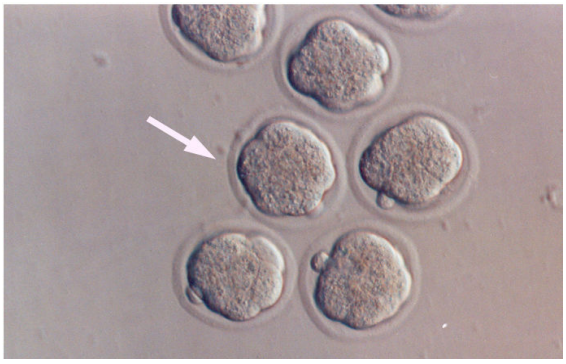


تصویر ۱: جنین بلافاصله پس از ذوب

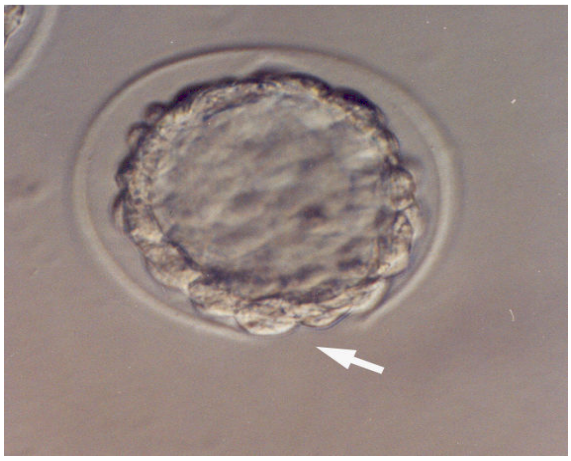
مراحل رشد و تکوین جنین‌ها (تصویر ۲-الف وب وج) به مدت ۹۶ ساعت بطور روزانه و مرتب مورد بررسی قرار گرفت و ثبت شد. بررسی‌های آماری با آزمون مربع کای (X^2) و نرم افزار SPSS صورت گرفت.

1. Open Pulled Strow

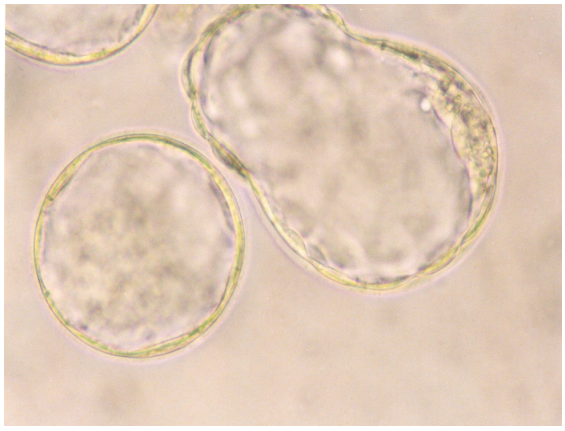
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]



تصویر ۲- الف: جنین در مرحله مورولا



تصویر ۲-ب: جنین در حال خروج از زونا (ب)



تصویر ۲- ج: جنین خارج شده از زونا (ج)

۴- بررسی بیان ژن به کمک RT-PCR[1]: ۱۶۸ ساعت پس از تزریق HCG (در انتهای ۹۶ ساعت کشت جنین‌ها) جنین‌های خارج شده و یا در حال خروج از زونا جهت بررسی بیان ژن گیرنده EGF جدا شدند. این جنین‌ها تا زمان بررسی‌های مولکولی با کمترین حجم محیط کشت (۱µl-۲) درون میکروتیوب و در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

لیز سلولهای جنینی: به ازاء هر ۳ عدد جنین ۵ میکرولیتر بافر لیز کننده به تیوب حاوی جنین‌ها افزوده شد. فرمول این بافر به قرار زیر بود (۱۶):

NP40 (50%), Tris (PH:8 10mmol/L),
Nacl (10 mmol/L), Mgcl (3 mmol/L)

تیوب بلافاصله بر روی یخ قرار گرفت. طول زمان لیز سلولی کمتر از ۲ دقیقه بود که تمام طول این مدت تیوب بر روی یخ قرار داشت. بلافاصله پس از این زمان واکنش RT شروع شد. در مواردی که RT بلافاصله پس از لیز سلولی انجام نشد تیوب حاوی جنین‌های لیز شده با غوطه‌ور شدن مستقیم در ازت مایع منجمد شده و بلافاصله در فریزر ۷۰- قرار داده شد.

واکنش RT: به ازاء هر ۵ میکرولیتر محلول حاوی سلولهای لیز شده، ۱۵ میکرولیتر از محلول زیر به تیوب اضافه شد.

۴ میکرولیتر بافر RT (DTT 50mM, Tris-Hcl PH:8.5 250mM, ۳,۳ میکرولیتر پرایمر-MWG] [Oligo(dt), Biotech] ۱ میکرولیتر مخلوط dNTP و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم M-MULV (200µl) به تیوب حاوی عصاره سلولی افزوده شد. تیوب کنترل منفی حاوی تمام ترکیبات فوق به جز آنزیم RT بود. سپس تیوب مذکور به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه قرار داده شد و در

[1] Revers Transcription- Polymerase Chain Reaction

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

مرحله بعد به منظور پایان واکنش به مدت ۵ دقیقه تا دمای ۹۵ درجه حرارت داده شد. مراحل فوق در دستگاه ترمال سایکلر (Techne) انجام شد. پس از پایان واکنش تیوب‌ها برای مدت ۱-۲ دقیقه اسپین شدند. رسوب حاوی بقایای لیز سلولی و محلول سرریز به آرامی جدا شده و هر ۲۰ میکرولیتر از آن به یک تیوب استریل جداگانه منتقل شد تا جهت واکنش PCR مورد استفاده قرار گیرد.

واکنش PCR: با افزودن محلول زیر به تیوب حاوی ۲۰ میکرولیتر DNA حجم تیوب به ۳۰ میکرولیتر رسید:

۲ میکرولیتر بافر PCR (Tris-Hcl 10mmol/L PH:8.3)، ۱ میکرولیتر dNTP(10mM)، ۰/۵ میکرولیتر Taq polymerase (5u/µl)، ۰/۶ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای خارجی (EGFR-1) بالادست و پایین دست (20mM) و۴/۳ میکرولیتر آب دیونیزه.

شرایط واکنش به ترتیب زیر بود:

دناتوراسیون اولیه شامل یک سیکل در دمای ۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه و ۳۵ سیکل با شرایط ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه آنیلینگ در دمای ۵۵ درجه سلسیوس، و اکستنشن به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس.

مرحله اکستنشن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد.

دو جفت پرایمر اختصاصی برای ژن EGFR به صورت Nested طراحی شده و یک جفت برای ژن β2m در نظر گرفته شد و واکنش PCR انجام شد. محصول تکثیر با پرایمرهای خارجی ۵۴۵ جفت باز بود که این محصول سپس در یک راند دوم PCR با کمک جفت پرایمر خارجی بصورت nested تکثیر شد قطعه حاصل از تکثیر با پرایمرهای داخلی (محصول Nested PCR) ۹۳ جفت باز بود. پرایمرها بر روی اگزونهای مختلف طراحی شدند علاوه بر آن پرایمر معکوس(Reverse) جفت خارجی (EGFR-1R) بر روی مرز اگزون ۱۲ و ۱۳ واقع شده و در نتیجه از تکثیر احتمالی DNA جلوگیری می‌نمود.

EGFR-1F 5′ AAG ATG CCA TCC GCA ATT 3′

EGFR-1R 5′CCT TGC AGT CCT TCT CAG CTC 3′

EGFR-2F 5′ TCC TCC TCT AGA CCC ACG AG 3′

EGFR-2R 5′ TCC AGT TAT CAG GCC AAG 3′

ژن β2m در تمام سلولها دارای بیان می‌باشد بنابراین انتظار می‌رود که mRNA آن در تمام سلولها وجود داشته باشد. توالی پرایمرهای بکار رفته جهت تکثیر این mRNA بقرار زیر بود:

B2m-F: 5′ TGA CCG GCT TGT ATG CTA TC 3′

β2m-F: 5′ CAC ATG TCT CGA TCC CAG TAG3′

با کمک این جفت پرایمر نیز یک واکنش PCR بر روی محصول واکنش RT صورت گرفت. قطعه قابل تکثیر با این پرایمرها طولی معادل ۳۱۶ جفت باز داشت. هر سه جفت پرایمر ذکر شده به گونه‌ای طراحی شده بودند که دارای Tm و سایر خصوصیات مشابه بودند و بنابراین شرایط PCR در تمام واکنشها یکسان بود.

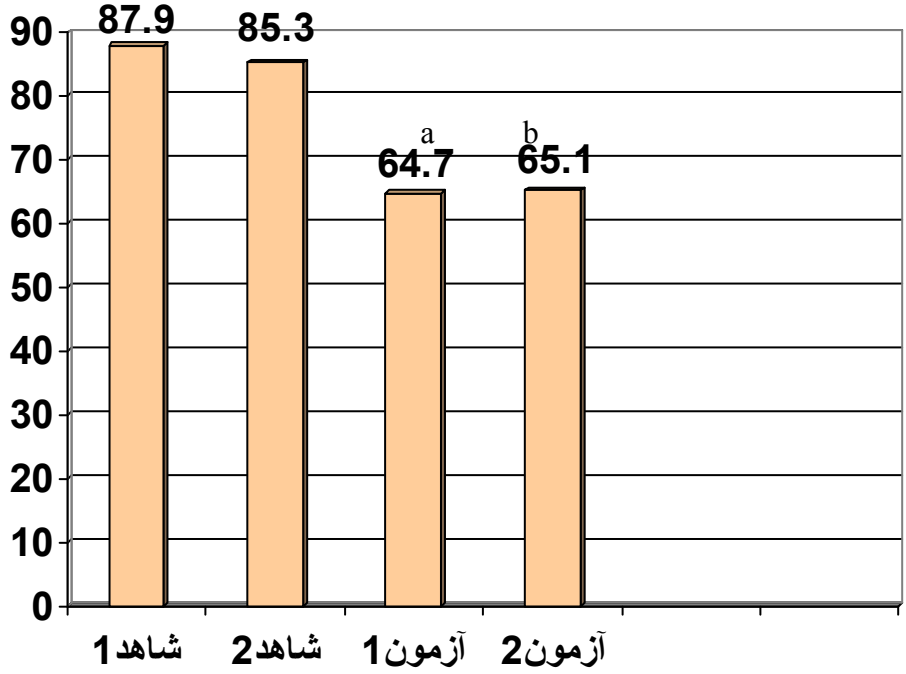
یافته‌ها

نمودارهای ۱و ۲و ۳ به ترتیب نشان دهنده میزان کلی تشکیل بلاستوسیست، میزان خروج از زونا و دژنراسیون در طی ۹۶ ساعت کشت جنین می‌باشد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

الف: میزان کلی تشکیل بلاستوسیست در گروههای مورد مطالعه:

نمودار ۱ نشان دهنده این موضوع است که میزان تشکیل بلاستوسیست در طی ۹۶ ساعت کشت در گروههای شاهد ۱و۲ (به ترتیب ۸۷/۹٪ و ۸۵/۳٪) بطور معنی‌داری بیشتر از گروههای آزمون ۱و۲ (به ترتیب ۶۴/۷٪ و ۶۵/۱٪) می‌باشد. اما مقایسه میزان تشکیل بلاستوسیست بین گروههای شاهد ۱(۸۷/۹٪) با گروه شاهد ۲ (۸۵/۳٪) و گروه آزمون ۱ (۶۴/۷٪) با گروه آزمون ۲ (۶۵/۱٪) اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.(همانطور که مشاهده می‌شود انجماد کاهش قابل توجهی در میزان تشکیل بلاستوسیست ایجاد نموده ولی افزودن فاکتور رشد اپیدرمال نتوانسته تأثیر معنی‌داری در آن داشته باشد.)



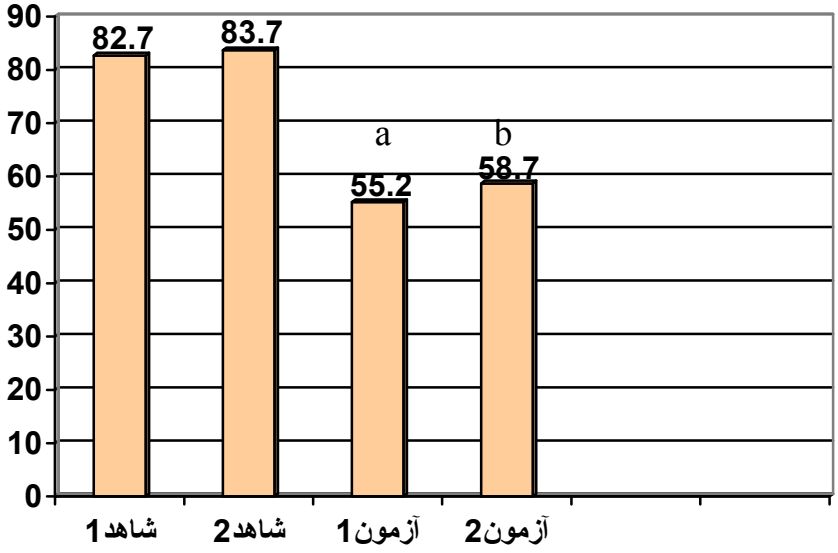
نمودار ۱: میزان کلی تشکیل بلاستوسیست پس از ۹۶ ساعت
a: اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد۱($p<0.05$) b: اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد ۲ ($p<0.05$)

ب: میزان کلی خروج از زونا در گروههای مورد مطالعه:

مقایسه ستونهای موجود در نمودار ۲ نشان دهنده این موضوع است که میزان کلی خروج از زونا در گروههای شاهد ۱و۲ (به ترتیب ۸۲/۷٪ و ۸۳/۷٪) به طور معنی‌داری بیشتر از گروههای آزمون ۱و۲ (به ترتیب ۵۵/۲٪ و ۵۸/۷٪) می‌باشد. اما اختلاف معنی‌داری در میزان تشکیل

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

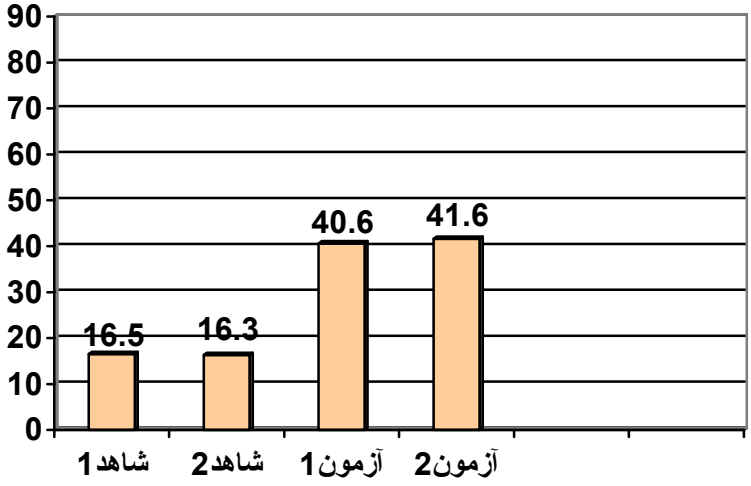
بلاستوسیست بین گروه شاهد ۱ با گروه شاهد ۲ و گروه آزمون ۱ با گروه آزمون ۲ دیده نمی‌شود. همانطور که مشاهده می‌شود انجماد تأثیر بسزایی در میزان خروج از زونا داشته است اما افزودن فاکتور رشد اپیدرمال به محیط NEM-α نتوانسته تغییر چندانی در میزان خروج از زونا ایجاد نماید.



نمودار۲: میزان کلی خروج از زونا پس از ۹۶ ساعت
a: اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد۱($p<0.05$) b: اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد ۲ ($p<0.05$)

ج: میزان کلی دژنراسیون در گروههای مورد مطالعه:
مقایسه میزان دژنراسیون بین گروه شاهد ۱ با شاهد ۲ (۱۶/۵٪ در مقابل ۱۶/۳٪) و همینطور گروه آزمون ۱ در مقابل آزمون ۲ (۴۰/۶٪ در مقابل ۴۱/۶٪) اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌داد اما میزان دژنراسیون گروه شاهد ۱ با آزمون ۱ (به ترتیب ۱۶/۵٪ و ۴۰/۶٪) و شاهد ۲ با آزمون ۲ (به ترتیب ۱۶/۳٪ و ۴۱/۶٪) اختلاف واضح و معنی‌داری را نشان می‌داد (نمودار ۳). در اینجا نیز تأثیر قابل توجه انجماد در افزایش میزان دژنراسیون دیده می‌شود. اما فاکتور رشد اپیدرمال به محیط MEM-α در هیچ یک از گروههای انجمادی و غیر انجمادی نتوانسته تأثیر چندانی در میزان دژنراسیون ایجاد نماید.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]



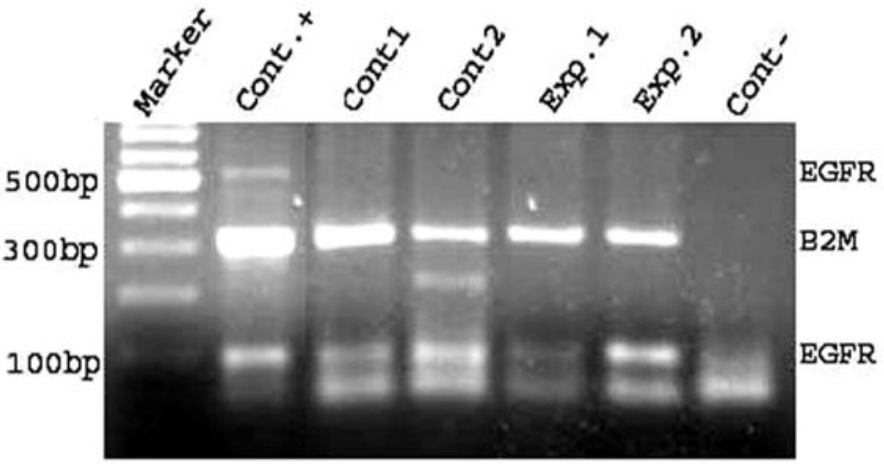
نمودار ۳: میزان کلی دژنراسیون پس از ۹۶ ساعت

a: **اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد ۱**($p<0.05$) b: **اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد ۲** ($p<0.05$)

نتایج مولکولی:

RNA استخراج شده از کبد موش به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد. الکتروفورز محصول PCR با پرایمرهای β2m نشان دهنده وجود یک باند قوی در ناحیه ۳۱۶ جفت بازی در کلیه نمونه‌ها بغیر از کنترل منفی می‌باشد. الکتروفورز محصول راند اول PCR با استفاده از پرایمرهای خارجی مربوط به ژن EGFR (EGFR-1F و EGFR-1R) نشان دهنده حضور یک باند در ناحیه ۵۴۵ جفت بازی در مورد نمونه کبد بود اما در مورد نمونه‌های جنین هیچ باندی در این ناحیه مشاهده نشد. پس از انجام راند دوم PCR بر روی محصول راند اول با استفاده از پرایمرهای داخلی (EGFR-2F و EGFR-2R) و الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز در مورد تمام نمونه‌ها (کبد و جنین) یک باند در ناحیه ۹۳ جفت بازی مشاهده شد (تصویر ۳). همانطور که در تصویر دیده می‌شود فضای زیر زونا گسترش یافته و سلولهای جنینی خود را جمع کرده‌اندکه پس از گذشت حدود یک ساعت جنین شکل طبیعی خود را بدست می‌آورد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]



تصویر ۳: الکتروفورزیس محصول PCR بر روی ژل آگارز

بحث

در این مطالعه تأثیر فاکتور رشد اپیدرمال بر تکوین قبل از لانه گزینی جنین‌های منجمد شده مورد بررسی قرار گرفت. هدف اصلی ما مطالعه اثر افزودن EGF به محیط کشت جنین‌های منجمد پس از ذوب و بررسی تأثیر آن بر بهبود تکوین این جنین‌ها بود. نتایج حاصل چنین نشان می‌دادند که EGF تأثیر چندانی بر میزان تشکیل بلاستوسیست و خروج از زونا در جنین‌های منجمد شده ندارد. Kim و همکارانش (۱) نیز به چنین نتایجی دست یافته بودند، آنها اعلام کردند که افزودن EGF به محیط کشت جنین‌های ۸ سلولی تأثیری بر میزان تشکیل بلاستوسیست ندارد. آنها نتیجه‌گیری کردند که جنین‌های ۸ سلولی به تنهایی توانایی تکوین و رسیدن به مرحله بلاستوسیستی را دارند. شواهدی دال بر ساخته شدن برخی فاکتورهای رشد اندوژن توسط جنین وجود دارد (۱۷). استفاده از روشهای gene knock out نشان می‌دهند که کمبود بیان یک فاکتور رشد به تنهایی تأثیر چندانی بر رشد و بقاء جنین ندارد (۱۸). هدف مهمتر این تحقیق بررسی این موضوع بود که آیا پروسه انجماد می‌تواند بیان ژن را تحت تأثیر قرار دهند؟ نتایج نشان دادند که mRNA مربوط به ژن EGFR در جنین‌های منجمد و غیر منجمد وجود دارند. Qu و همکارانش بیان رسپتور TGF-α وEGF را در فولیکولهای بافت تخمدانی انسان، قبل و بعد از انجماد مورد بررسی قرار دادند (۱۹) و نشان دادند که انجماد، واکنش ایمونولوژیک نسبت به TGF-α وEGF و EGFR را تغییر نمی‌دهد. Tachataki و همکارانش (۲۰) بیان ژن توبراسکولورزیس TSC2 را در جنین‌های منجمد انسانی مورد بررسی قرار دادند و نتیجه‌گیری کردند که انجماد الگوی نرمال بیان ژن را در طی تکوین قبل از لانه گزینی تغییر می‌دهد. سنجش کمی میزان بیان TSC2 بلافاصله پس از ذوب و پس از یک روز کشت جنین‌ها نشان داد که بلافاصله پس از ذوب، میزان بیان ژن کاهش یافته اما یک روز کشت جنین باعث جبران این کاهش می‌شود. در مطالعه حاضر RT-PCR پس از پایان دوره کشت

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

جنین‌های منجمد شده انجام شد. نتایج نشان دهنده تغییر مشخصی در میزان بیان ژن پس از انجماد نبود، این یافته با نتایج اعلام شده توسط Tachataki همخوانی داشت و می‌توانست نشان‌دهنده اثرات جبرانی ۹۶ ساعت کشت، بر روی بیان ژن باشد، اما باید به این موضوع توجه داشت که از آنجایی که مطالعه بصورت کمی نبود نمی‌توان قطعاً اعلام نمود که انجماد هیچگونه تأثیری بر میزان بیان ژن ندارد، در مورد اثرات جبرانی کشت جنین‌های منجمد شده باید یادآور شد که همین نتایج دقیقاً توسط سایر محققان در مورد فراساختار جنین‌های منجمد شده حاصل شد. آنها اعلام کردند که بسیاری از آسیبهای فرا ساختاری ایجاد شده در اثر انجماد یک روز پس از کشت جنین‌ها جبران می‌شوند (۲۱).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که افزودنEGF (10 ng/ml) به یک محیط کشت پیچیده مانند (MEM-α) هیچگونه تأثیر محرکی بر تکوین جنین‌های منجمد شده و غیر منجمد ندارد. انجماد بیان ژن EGFR را ۹۶ ساعت پس از ذوب ممانعت نمی‌نماید اما به نظر می‌رسد که افزودن EGF به محیط کشت جنین بیان EGFR را در بلاستومرهای موش افزایش می‌دهد.

References

1. Kim CH, Chae HD, Cheon YP, Kang BM, Chang YS, Mok JE. The effect of epidermal growth factor on the preimplantation development, implantation and its receptor expression in mouse embryos. J Obstet Gynaecol Res 1999; 25: 87-93.
2. Pfeifer TL, Chegini N. Immunohistochemical 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 stage. Biol Reprod 1994; 50: 281-289.
3. Imai T, Kurachi H, Adachi K, Adachi H, Yoshimoto Y, Homma H, Tadokaro C, Takeda S and et al. Changes in epidermal growth factor receptor and the levels of its ligands during menstrual cycle in human endometrium. Biol Reprod 1995; 25: 928-938.
4. Chai N, Patel Y, Jacobson K, McMahon J, McMahon A, Rappolee DA. EGF and its essential regulator of the fifth cell division in preimplantation mouse embryos. Dev Biol 1998; 198: 105-115.
5. Wei Z, Park KW, Day BN, Prather RS. Effect of epidermal growth factor on preimplantation development and its receptor expression in porcine embryos. Mol Reprod Dev 2001; 60: 457-462.
6. Stewart CL, Cullinan EB. Preimplantation development of the mammalian embryos and its regulation by growth factors. Dev Gen 1997; 21: 91-101.
7. Adamson ED. Activities of growth factors in preimplantation embryos. J Cell Biochem 1993; 53: 280-287.
8. Colver RM, Howe AM, McDonough PG, Boldt J. Influence of growth factors in defined culture medium on in vitro development of mouse embryos. Fertil Steril 1991; 55: 194-199.
9. Valojerdi RM, Movahedin M, Hosseini A. Improvement of development of vitrified 2 cell mouse embryos by Vero cell co-culture. J Assist Reprod Genet 2002; 19(1): 31-38.
10. Nematollahi N, Valojerdi RM. Effect of Vero cell co-culture on the development of frozen-thawed two-cell mouse embryos. J Assist Reprod Gen 1999; 16(7): 308-314.
11. Karistorm PO, Bergh T, Forsberg AS, Sandkvist U, Wikland M. Prognostic factors for success rate of embryo freezing. Hum Reprod 1997; 12: 1263-1266.
12. Desai N, Goldfarb J. Co-cultured human embryos may be subjected to widely different microenvironment: pattern of growth factor/cytokine release by Vero cell during the co-culture interval. Hum Reprod 1998; 13: 1600-1605.
13. Desai N, Goldfarb J, Lawson J. Assessment of growth factor effects on post- thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. Hum Reprod 2000; 15: 410-418.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

14. Kasai M. Cryopreservation of mammalian embryos. Mol Biotech 1997; 7: 173-179.
15. Vajta J, Holm P, Kuvayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, and et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to produce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Dev 1998;51: 53-58.
16. Taylor DM, Handyside AH, Ray PF, Dibb NJ , Winston ML, Ao A. Quantitative measurement of transcript levels throughout human preimplantation development: analysis of hypoxanthine phosphoribosyl transferase. Mol Hum Reprod 2001; 7: 147-154.
17. Adamson ED. Two photo-oncogenes that play dual roles in embryonal cell growth and differentiation. Int J Dev Biol 1993b; 37: 111-116.
18. Shastry BS. More to learn from gene knockouts. Mol Cell Biochem 1994; 136: 171-182.
19. Qu J, Nisolle M, Donnez J. Expression of transforming growth factor- alpha, epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. Fertil Steril 2000; 74: 113-121.
20. Tachataki M, Winston RM, Taylor DM. Quantitative RT-PCR reveals tuberous sclerosis gene, TSC2, mRNA degradation following cryopreservation in the human preimplantation embryo. Mol Hum Reprod 2003; 9(10): 593-601.
21. Vajta G, Hyttel P, Callesen H. Morphological Changes of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration and culture. Mol Reprod Dev 1997; 48: 9-17.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]