تأثیر شیوه‌های مختلف جداسازی بلاستومرهای جنین دوسلولی موش بر تکوین آن‌ها تا مرحله بلاستوسیست در آزمایشگاه

بهناز شیخ‌الاسلامی[۱]، مجید آل‌طه[۲]، سعید طهماسبی[۳]

۱) کارشناس ارشد علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران

۲) کارشناس ارشد جمعیت‌شناسی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران

۳) دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

چکیده

هدف: در این مطالعه پتانسیل تکوینی بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دوسلولی موش توسط چهار شیوه مختلف جدا سازی تا مرحله بلاستوسیست بررسی و مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: برداشتن زوناپلوسیدا و جداسازی بلاستومرها توسط هر دو روش شیمیایی (محلول تیرود، هیالورونیداز، EDTA) و روش مکانیکی انجام گرفت. بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو سلولی در شرایط آزمایشگاهی کشت شدند. تعداد جنین‌های دژنره و غیرطبیعی و نیز قطر و تعداد کل سلولی بلاستوسیست‌های حاصل از تکوین بلاستومرها شمارش و اندازه‌گیری شدند.

نتایج: میزان جنین‌های دژنره در گروه‌های مکانیکی، محلول تیرود، EDTA و هیالورونیداز به ترتیب ۴۲/۸۵، ۵۷/۵، ۶۲/۴۸ و ۶۱/۶۰ در صد بود که این میزان در گروه مکانیکی کمتر از سایر گروه‌ها گزارش شد ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: تحقیق ما نشان داد که همه شیوه‌های جداسازی بلاستومرها بر تکوین آنها تا مرحله بلاستوسیست تأثیری منفی دارند اما زمانی که از شیوه مکانیکی استفاده شد، نتایج بهتری حاصل گردید.

کلمات کلیدی

بلاستوسیست، بلاستومر جداشده، شیوه‌های جداسازی، جنین دوسلولی موش

مقدمه

بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های پیش از لانه‌گزینی به منظور بررسی قدرت تکوین جنین و تعیین اختلالات ژنتیکی و متابولیستی پیش از لانه‌گزینی استفاده می‌شوند (۱) و تنها با برداشتن یک نمونه کوچک (در حد یک سلول) از جنین مرحله پیش از لانه‌گزینی قابل انجام است. در انسان، بلاستومر جدا شده از جنین پیش از لانه گزینی را در تحقیقات DNA برای تعیین جنسیت و ارزیابی پتانسیل‌های

تکوینی جنین والد نیز بکار برده اند (۳ و ۲). در پستانداران بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو تا چهار سلولی موش (٤)، چهار تا هشت سلولی خرگوش (٥)، چهار تا هشت سلولی گاو و گوسفند (٦) را در آزمایشگاه تا مرحله بلاستوسیست کشت داده‌اند، تا قدرت تکوین و رشد آنها را بررسی نمایند.

قدرت تکوین بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های پیش از لانه‌گزینی اندک است، به طوری که فقط تعداد کمی از این بلاستومرها می‌توانند تا مرحله بلاستوسیست تکوین یابند (۷، ۸ و ۹). برخی گزارشات علت این امر را محیط کشت نامناسب و ناکافی دانسته اند. به همین دلیل با استفاده از فاکتورهایی مثل LIF و GM-CSF به عنوان مکمل‌های محیط کشت باعث رشد و تکوین بهتر بلاستومرها شده اند (۱۰، ۱۱ و ۱۲) اما در بهترین نتایج فقط تا ٥۰ درصد بلاستومرهای جداشده به مراحل بالاتر تکوین یافته است. به همین دلیل در این مطالعه بررسی علل عقب ماندگی رشد این جنین‌ها مد نظر قرار گرفت و این سوال مطرح شد که شیوه‌های جداسازی بلاستومرها تا چه حدی می‌توانند بر تکوین آن‌ها موثر باشند. برای برداشتن زوناپلوسیدا و جداسازی بلاستومرها شیوه‌های مختلف مکانیکی و شیمیایی وجود دارد (۱۲، ۱۳، ۱٤). در شیوه مکانیکی با استفاده از میکروپیپت ظریف برداشتن زونا پلوسیدا و جداسازی بلاستومرها انجام می‌گیرد. در این شیوه انجام صحیح کار تا حد زیادی به مهارت فرد بستگی دارد و در یک نوبت جداسازی تعداد زیادی از بلاستومرها ممکن نیست (۱٥). در شیوه شیمیایی از مواد مختلفی استفاده می‌شود که معمولاً توسط آن‌ها در یک زمان کوتاه می‌توان زونا پلوسیدای تعداد بیشتری از جنین‌ها را برداشت و بلاستومرهای آن‌ها را از هم جدا کرد. برخی از این مواد مانند اسید تیرود و هیالورونیداز در محیط اسیدی (pH=۲/٥) عمل می‌کنند و در اینگونه موارد شوک ناشی از pH ممکن است از عوامل آسیب‌رسان به جنین باشد (۱٥ و ۱٦). بعضی از این مواد شیمیایی با ایجاد محیطی بدون کلسیم در اطراف جنین اتصالات سلولی وابسته به کلسیم را می‌گسلند، محلول اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) از این دسته مواد است که آن هم ممکن است به غشای سلولی آسیب برساند (۱٦ و ۱۷).

جداسازی بلاستومرهای جنین‌های مراحل بالاتر به مرور مشکل می‌گردد که به دلیل اتصالات محکم و اتصالات چسبنده تکوین یافته تری است که بین سلول‌های خارجی آن‌ها وجود دارد. در مرحله ۱٦ سلولی از موادی نظیر تریپسین همراه با EDTA (اتیلن دی آمید تترا استیک اسید) و در مرحله بلاستوسیست از سیتوکالازین D یا CCD (داروی اضمحلال میکروفیلامنت‌ها) استفاده می‌شود(۱٦).

نکته قابل توجه دیگر در این زمینه این است که در جنین‌های پستاندارانی مانند موش که در زمان لانه‌گزینی تعداد سلول‌های کمتری نسبت به سایر پستانداران نظیر انسان دارند، بلاستومر جنین‌های مراحل بالاتر پیش از لانه‌گزینی (در مورد موش ۸ مرحله سلولی و بالاتر) قادر به تکوین تا مرحله بلاستوسیست نبوده اند (۱۱).

باتوجه به مطالب ارائه‌شده، در این مطالعه با ٤ شیوه مختلف شامل EDTA، محلول تیرود، هیالورونیداز و شیوه مکانیکی زونا پلوسیدای جنین‌های دو سلولی

موش را برداشتیم و بلاستومرهای آنها را از یکدیگر جدا کردیم. سپس تکوین آن‌ها را تا مرحله بلاستوسیست در آزمایشگاه دنبال نمودیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ٤٠ سر موش نر و ماده NMRI با ١٠-٦ هفته سن (از انستیتو رازی) استفاده شد. در راستای انجام این تحقیق کلیه اصول اخلاقی در مورد نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی مد نظر قرار گرفته است. موش‌های ماده پس از تحریک تخمک‌گذاری با Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG) و Human Chorionic Gonadotropin (HCG) با فاصله ٤٨ ساعت، در روز دوم حاملگی با جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند و جنین‌های دو سلولی تخلیه شده و درون قطرات محیط کشت در انکوباتور با دمای ٣٧درجه‌سانتی‌گراد و ٥درصد CO_2 قرار داده شدند. جنین‌های دوسلولی بصورت تصادفی برای برداشتن زوناپلوسیدا و جدا کردن بلاستومرهای آنها به چند شیوه مختلف انتخاب شدند. برداشتن زونا پلوسیدا و جدا سازی بلاستومرها به دو روش شیمیایی و مکانیکی انجام شد که گروه شیمیایی خود سه گروه مجزا داشت. روش کار به قرار ذیل بود:

روش مکانیکی: زوناپلوسیدا و بلاستومرهای جنین‌های دوسلولی بوسیله پیپت کردن مکرر و ملایم برداشته و جدا شدند. سپس بلاستومرها چند بار در محیط کشت شسته شدند.

روش‌های شیمیایی: ١. **محلول تیرود**: برخی از جنین‌های دو سلولی بطور تصادفی انتخاب شدند و به مدت ٣٠-١٠ ثانیه درون قطرات حاوی محلول تیرود (pH=٢/٥) قرار داده شدند. پس از حذف زونا پلوسیدا، بلاستومرها نیز از هم جدا شدند و سپس در محیط کشت چند بار شسته شدند(١٥).

٢. **محلول اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA)**: زونا پلوسیدای برخی از جنین‌های دو سلولی توسط شیوه مکانیکی برداشته شد، سپس به مدت ١٥-١٠ ثانیه درون قطرات حاوی EDTA (Sigma، 4-285) ٠/٠٠٢ مول قرار داده شدند. سپس بلاستومرهای آنها از هم جدا شدند و در محیط کشت چند بار شسته شدند(١٦).

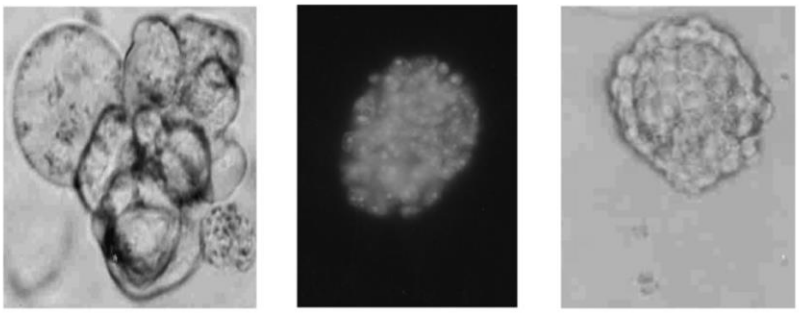
٣. **محلول هیالورونیداز**: جنین‌های دو سلولی به مدت ١٥-١٠ ثانیه درون قطرات حاوی T6 و هیالورونیداز (H3596, Sigma ،٠/١ درصد قرار داده شدند، زونا پلوسیدای آن‌ها هضم شد و سپس بلاستومرهای آنها به آرامی توسط میکروپیپت جدا شدند. بلافاصله چند بار شستشو داده شدند (١٦).

ویژگی مواد شیمیایی به کار رفته در این مطالعه در جدول ١ آورده شده است.

محیط کشت: بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو سلولی در هر گروه به صورت منفرد درون قطرات حاوی محیط کشت T6 (مؤسسه تحقیقاتی رویان) تکمیل‌شده با ٥ میلیگرم بر میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی (A4378,Sigma) (BSA) و GM-CSF (2ng/ml, R&D Systems) قرار داده شده و درون انکوباتور با درجه حرارت ٣٧ درجه سانتی گراد و ٥ درصد CO_2 کشت شدند.

بررسی میکروسکوپی: تعداد بلاستوسیست‌ها، جنین‌های دژنره و جنین‌های غیرطبیعی تا ١٢٠ ساعت پس از کشت به وسیله میکروسکوپ معکوس بررسی

و گزارش شد. قطر بلاستوسیست‌ها با Eye piece کالیبره اندازه‌گیری شد. به منظور شمارش کل سلولها، بلاستوسیست‌ها با پریپدیوم آیوداید و بیزبنزومایدرنگ‌آمیزی شدند (تصویر ۱).



تصویر۱. تصاویر از راست به چپ به ترتیب بلاستوسیست حاصل از بلاستومر جداشده از جنین دوسلولی پس از ۱۲۰ساعت کشت، بلاستوسیست حاصل از بلاستومر ایزوله شده از جنین دو سلولی رنگ آمیزی شده با propidium iodide و bisbenzimide به منظور شمارش کل سلولی. جنین غیرطبیعی حاصل از کشت بلاستومر جدا شده از جنین دو سلولی 400×

بررسی آماری: در تحقیق حاضر با استفاده از روش آنالیز واریاسیون یک طرفه، میانگین تعداد بلاستوسیست‌ها، تعداد کل سلولی و قطر بلاستوسیست‌های گروه‌های مختلف مقایسه شدند.

نتایج

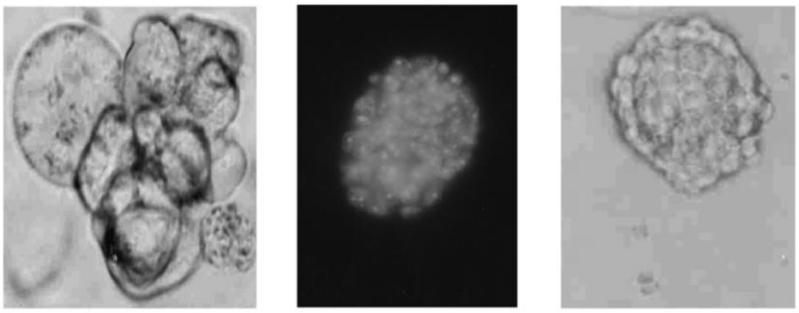
در این مطالعه چهار شیوه مختلف برداشتن زوناپلوسیدا و جداسازی بلاستومرها به روش‌های مکانیکی و شیمیایی (محلول تیرود، هیالورونیداز و EDTA) به کار رفت. در گروه مکانیکی، محلول تیرود، EDTA و هیالورونیداز به ترتیب ۱۶۸، ۱۷۰، ۱۶۵ و ۱۶۲ بلاستومر از جداسازی بلاستومرهای جنین دو سلولی موش جمع‌آوری گردید.

جدول ۱: ویژگی‌های مواد شیمیایی مورد استفاده در مطالعه حاضر

ماده یا محلول	غلظت	PH	دما (درجه سانتی‌گراد)	مدت زمان بکارگیری (ثانیه)
محلول تیرود	-	۲/۵	۳۷	۱۰-۳۰
هیالورونیداز	۰/۱ درصد	۲/۵	۳۷	۱۰-۱۵
EDTA*	۰/۰۰۲ مول	۷/۴۸	دمای معمولی اتاق	۱۰-۱۵

* اتیلن دی آمین تترا استیک اسید

و گزارش شد. قطر بلاستوسیست‌ها با Eye piece کالیبره اندازه‌گیری شد. به منظور شمارش کل سلولها، بلاستوسیست‌ها با پریپدیوم آیوداید و بیزبنزومایدرنگ‌آمیزی شدند (تصویر ۱).



تصویر۱. تصاویر از راست به چپ به ترتیب بلاستوسیست حاصل از بلاستومر جداشده از جنین دوسلولی پس از ۱۲۰ساعت کشت، بلاستوسیست حاصل از بلاستومر ایزوله شده از جنین دو سلولی رنگ آمیزی شده با propidium iodide و bisbenzimide به منظور شمارش کل سلولی. جنین غیرطبیعی حاصل از کشت بلاستومر جدا شده از جنین دو سلولی 400×

بررسی آماری: در تحقیق حاضر با استفاده از روش آنالیز واریاسیون یک طرفه، میانگین تعداد بلاستوسیست‌ها، تعداد کل سلولی و قطر بلاستوسیست‌های گروه‌های مختلف مقایسه شدند.

نتایج

در این مطالعه چهار شیوه مختلف برداشتن زوناپلوسیدا و جداسازی بلاستومرها به روش‌های مکانیکی و شیمیایی (محلول تیرود، هیالورونیداز و EDTA) به کار رفت. در گروه مکانیکی، محلول تیرود، EDTA و هیالورونیداز به ترتیب ۱۶۸، ۱۷۰، ۱۶۵ و ۱۶۲ بلاستومر از جداسازی بلاستومرهای جنین دو سلولی موش جمع‌آوری گردید.

جدول ۱: ویژگی‌های مواد شیمیایی مورد استفاده در مطالعه حاضر

ماده یا محلول	غلظت	PH	دما (درجه سانتی‌گراد)	مدت زمان بکارگیری (ثانیه)
محلول تیرود	-	۲/۵	۳۷	۱۰-۳۰
هیالورونیداز	۰/۱ درصد	۲/۵	۳۷	۱۰-۱۵
EDTA*	۰/۰۰۲ مول	۷/۴۸	دمای معمولی اتاق	۱۰-۱۵

* اتیلن دی آمین تترا استیک اسید

جدول ۲. میزان بلاستوسیست‌های حاصل از شیوه‌های مختلف جداسازی بلاستومرهای جدا شده از جنین دو سلولی را نشان می‌دهد. با توجه به جدول میزان بلاستوسیست‌های حاصل از شیوه مکانیکی (٤١/٦٦٪)٧٠، محلول تیرود (٢٨/٢٣٪)٤٨، EDTA (٢١/٢١٪)٣٥ و هیالورونیداز (٢٠/٣٠٪)٣٤ بود. آزمون آماری نشان داد که تعداد بلاستوسیست‌های حاصل از شیوه مکانیکی تفاوت معنی داری با سایر شیوه‌ها داشت (P<٠/٠٥).

جدول ۲: میزان جنین‌های دژنره و بلاستوسیست‌های حاصل از شیوه‌های مختلف جداسازی بلاستومرهای جنین دوسلولی

شیوه جداسازی بلاستومرها	تعداد بلاستومر	دفعات تکرار	میزان بلاستوسیست تعداد (درصد)	میزان جنین دژنره
شیوه مکانیکی	۱۶۸	۱۴	۷۰ (۴۱/۶۶)	۷۲ (۴۲/۸۵)
محلول تیرود	۱۷۰	۱۵	۴۸ (۲۸/۲۳)	۹۷ (۵۷/۰۵)
EDTA	۱۶۵	۱۴	۳۵ (۲۱/۲۱)	۱۰۱ (۶۲/۴۸)
هیالورونیداز	۱۶۲	۱۳	۳۴ (۲۰/۳)	۱۰۰ (۶۱/۶۰)

میزان کل جنین‌های دژنره. در شیوه مکانیکی، محلول تیرود، EDTA و هیالورونیداز به ترتیب (٤٢/٨٥٪) ٧٢، (٥٧/٠٥٪) ٩٧، (٦٢/٤٨٪) ١٠١ و (٦١/٦٠٪) ١٠٠ بود.

تفاوت معنی‌داری بین تعداد جنین‌های دژنره شیوه مکانیکی و دیگر شیوه‌ها وجود داشت و تعداد جنین‌های گروه اول از سایر گروه‌ها کمتر بود (P<٠/٠٥).

جنین‌های غیرطبیعی حاصل از تکوین بلاستومرهای جدا شده در گروه‌های مختلف این مطالعه تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. بیشترین میزان جنین‌های غیرطبیعی ٤٨ ساعت پس از کشت دیده شد. این جنین‌ها به صورت گروه‌های پهن شده یا رشته‌ای از بلاستومرها و یا توده‌ای حاصل از تقسیمات غیرطبیعی مشابه (تصویر ۱) دیده شدند.

جدول ۳. تعداد کل سلولی و قطر بلاستوسیستهای حاصل از شیوه‌های مختلف جداسازی بلاستومرهای جنین دو سلولی موش را نشان می‌دهد. با توجه به این جدول میانگین و انحراف معیار تعداد کل سلولی با شیوه مکانیکی، محلول تیرود، EDTA و هیالورونیداز به ترتیب ٢١/٨±٢/٣٩، ٣/٤٤ ± ٤٢/٢، ٣٩/٩±٢/٨٥ و ٤١/٨±٢/١٨ بود. میانگین و انحراف معیار قطر بلاستوسیست‌ها در گروه‌های فوق‌الذکر به ترتیب ٧٨/٨١±٥/١٤، ٧٥/١٨±٤/٢١، ٧٧/٢٥±٥/٢٢ و ٧٣/٢٢±٥/٠٩ بود. نتایج آزمون آماری نشان داد که

در تعداد کل سلولی و قطر بلاستوسیست‌های چهار گروه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

جدول ۳: تعداد کل سلولی و قطر بلاستوسیست‌های حاصل از شیوه‌های مختلف جداسازی بلاستومرهای جنین‌های دوسلولی

شیوه جداسازی بلاستومرها	تعداد بلاستومر	تعداد کل سلولی (میانگین ± انحراف معیار)	قطر بلاستوسیست (میانگین ± انحراف معیار)
شیوه مکانیکی	۱۶۸	۴۴/۸±۲/۳۹	۷۸/۸۱±۵/۱۴
محلول تیرود	۱۷۰	۴۲/۲±۳/۲۱	۷۵/۱۸±۴/۲۱
EDTA	۱۶۵	۳۹/۹±۲/۸۵	۷۷/۲۵±۵/۲۲
هیالورونیداز	۱۶۲	۴۱/۸±۲/۱۸	۷۳/۲۲±۵/۰۹

بحث

در مطالعه حاضر قدرت تکوین بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو سلولی در همه گروه‌ها ناچیز بود به طوری که در بهترین شرایط کمتر از نیمی از بلاستومرهای جدا شده (حدود ٤٢ درصد) به مرحله بلاستوسیست رسیدند، درحالیکه با انجام آزمایشاتی در شرایط مشابه بر روی جنین‌های سالم دو سلولی نشان دادیم که حدود ۷۳ درصد جنین‌های دو سلولی قادرند به مرحله بلاستوسیست برسند (۱۹). مشابه این مقایسه در آزمایشات بر روی خرگوش توسط Tao (۲۰۰۰) انجام گرفته است و تعداد ناچیز بلاستوسیست‌های حاصل از تکوین بلاستومرها نسبت به تعداد بلاستوسیست‌های حاصل از جنین سالم در این مطالعات کاملاً مشهود بوده است. این نتایج مشکلات بزرگی را نشان می‌دهد که احتمالا شیوه‌های جداسازی بلاستومرها بر تکوین آن‌ها ایجاد می‌کنند. در این مطالعه شیوه مکانیکی تأثیرات منفی کمتری نسبت به سایر شیوه‌های بکار رفته داشت به طوری که پس از ۱۲۰ ساعت کشت، میزان بلاستوسیست‌های زنده به این روش بیش از سایر روش‌های شیمیایی بود و همین‌طور تعداد جنین‌های دژنره در این گروه کمتر از سایر گروه‌ها بود. پس از شیوه مکانیکی، استفاده از محلول تیرود بهترین شیوه شیمیایی در این مطالعه بود. نتایج گروه تیرود در مطالعه حاضر از نظر میزان بلاستوسیست با نتایج تحقیق دکتر ساکی (۱۳۸٤) مشابه بود (۹).

در مطالعه حاضر با اینکه تعداد بلاستوسیست‌ها و تعداد جنین‌های دژنره درگروه مکانیکی تفاوت معنی داری با سایر گروه‌ها داشت اما تعداد کل سلول‌ها و قطر بلاستوسیست‌های حاصل از آن‌ها تفاوت معنی داری با هم نداشتند. با توجه به این نتایج احتمالا شیوه‌های جدا سازی با ایجاد آسیب‌های مختلف در ابتدای تکوین، حیات سلول‌ها را به خطر می‌اندازند و به همین دلیل تعداد زیادی از آن‌ها دژنره می‌شوند اما اگر این سلول‌ها بتوانند به حیات خود ادامه دهند، به نظر می‌رسد که شیوه‌های جداسازی بر کیفیت بلاستوسیست‌های حاصل از آن‌ها تأثیر زیادی نداشته است.

برداشتن زوناپلوسیدا هم از عوامل مهمی است که می‌تواند بر نتایج این مطالعه تأثیر گذارده باشد. برخی محققان مرحله تکوینی را که در آن زوناپلوسیدا برداشته می‌شود، در عقب ماندگی تکوینی مؤثر می‌دانند. برای مثال Ribas در سال ۲۰۰۶ نشان داد که برداشتن زوناپلوسیدا در مراحل اولیه تکوین، صرف نظر از شیوه جداسازی آن، باعث کاهش متیلاسیون DNA در مرحله دو و چهار سلولی می‌گردد و در نتیجه باعث کاهش تکوین جنین می‌شود (۲۰). اما همان طوری که در تحقیقات Pierce (۱۹۹۷)، Bielanske (۲۰۰۳) و Saik (۲۰۰۵) مشخص شده است با برداشتن زوناپلوسیدا، تشکیل بلاستوسیست از بلاستومرهای جدا شده از جنین دو سلولی در همان زمانی رخ می‌دهد که در جنین سالم دو سلولی اتفاق می‌افتد (۹، ۱۲ و ۱۳). در مطالعه ما نیز همین گونه بود و این زمان وابسته به برداشتن زوناپلوسیدا نبود، اما الگوهای غیرطبیعی در اثر تقسیمات ناصحیح بلاستومرهای جدا شده رخ داد که احتمالاً به دلیل برداشتن زوناپلوسیدا بود.

نکته قابل توجه دیگر این است که بلاستومرهای بدون زونا پلوسیدا بسیار چسبنده‌اند و زمانی که با هم در یک قطره محیط کشت قرار می‌گیرند، به هم می‌چسبند و امکان بررسی تکوین هر یک از آ نها را به طور جداگانه مشکل می‌سازد، به همین دلیل در این آزمایش هر یک از بلاستومرها به صورت جداگانه در یک قطره محیط کشت قرار گرفتند، درحالی‌که معمولاً جنین‌های دارای زونا پلوسیدا به صورت ۱۵-۱۰ تایی در یک قطره محیط کشت قرار داده می‌شوند(۱۵). این کشت همزمان جنین‌ها در یک قطره به دلیل تأثیر پاراکرینی سیتوکین‌های ناشی از خود جنین‌ها باعث رشد بهتر آنها می‌گردد در حالی که بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو سلولی در این آزمایش از آن بی‌بهره بوده‌اند.

با توجه به نتایج تحقیق حاضر، بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های دو سلولی موش نژاد NMRI توانایی بالقوه برای تکوین به مرحله بلاستوسیست را دارند و با جدا سازی بلاستومرها با استفاده از شیوه مکانیکی نتایج بهتری حاصل گردید. اما در بهترین شرایط کمتر از نیمی از بلاستومرها به مرحله بلاستوسیست رسیدند. به نظر می‌رسد که تأثیر شیوه‌های جداکننده بلاستومرها فقط بخشی از علل عقب ماندگی رشد آن‌ها باشد و احتمالاً عوامل دیگری نظیر برداشتن زوناپلوسیدا و عدم کشت همزمان بلاستومرها با هم را نیز می‌توان از علل دیگر عقب‌ماندگی رشد آن‌ها در نظر گرفت.

به منظور درک بهتر چگونگی رشد بلاستومرها و امکان تعمیم آن به رشد بلاستومرهای انسانی لازم است که این آزمایشات بر روی بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های مراحل بالاتر پیش از لانه‌گزینی و در حیواناتی نظیر گوسفند و گاو نیز انجام گیرد.

تشکر

در اینجا لازم می‌دانم از کارشناسان محترم آقای پوربیرانوند و خانم ابراهیمی که در انجام این مطالعه همکاری نموده اند، تشکر و قدردانی نماییم.

منابع

1. Bongso A. Trounson Ao. van steirteghem A. In: trouson Ao, Gardner DK, ed. 2000. In vitro Fertilization. CR CPress; PP. 127-264.

2. Gao S. Sun W. Wenjo Guam Q. Zhang Q. 2002. Investigation on development potential of blastomeres isolated from 4-cell human embryos. Zhonghua Fu chan ke za zhi; 37: 155-6.

3. Edwards RG. Schulman J. Dyban AP. In: verlinsky V.Kulier (ed). 2000. Preimplantation genetics. Pleneum press; PP. 1-85.

4. Tarjowski A. Ozdzenski W. Czolowska R. 2001. Mouse singletons and twins developed from isolated diploid blastomeres supported with tetra peloid blastomeres; Int J Dev Biol; 45:591-596.

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

6. Willadsen SM. Polge C. 1997. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomeres separation. Vet Rec; 51:1060-1065.

7. Desai N. Kattal N. Abdelhafez FF. Szeptychci – Lawson J.et al. 2007. GM-CSF and co culture and affect post-thaw development and apoptosis in cryopreserved embryos. J Assist Repord Genet; 24:215-22.

8. Mezhevikina LM. Fedorova VR. Kapralova IV. Fesenko EE. Et al. 2006. Increased survival of preimplantation mouse embryos in medium with recombinant cytokine LIF. Ontogenez; 37:55-56.

9. Sakie G. Sobhani A. Akbary M. 2005. The evaluation of inner cell mass in blastocysts from isolated blastomeres of 2 and 4 cell ICR mouse embryos. Tehran university J; 63(4): 270-78.

10. Robertson SA. 2007. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. Cytokine growth factor Rev; 18: 281-298.

11. Sheikholeslami B. Salehnia M. Rezazadeh VM. Ramezanzadeh M. 2008. Developmental potential of isolated blastomeres from early mouse embryos in the presence and absence of LIF and GM-CSF. J Assist Repord Genet; 25: 7-12.

12. Sjoblom C, Wikland M, Robertson SA. 2002 .GM-CSF acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. Biol Reprod; 67: 1817-1823.

13. Bielanske M. Tan SL. Ao A. 2003. Chromosomal information derived from single blastomeres isolated from cleavage – stage embryos and cultured in vitro. Fertil steril; 79: 1304-11.

14. Modlinski JA. Ozil JP. Modlinska MK. Szarska A. Reed MA. Wagner TE. 2000. Development of single mouse blastomeres enlarge d to zygote size in conditions of nuclei cytoplasm synchrony, zygote; 10: 283-9.

15. Tsunoday Y. Mclaren A.1983. Effect of various Procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. Reprod Fertil. 69: 315-322.

16. Nijs M. Van Steirteghem AC. 1987. Assessment of different isolation for blastomeres from two-cell mouse embryos. Hum Reprod.; 2: 421-424.

17. Montag M. Koll B. Holmes P. Ven H. 2000. Significance of the number of embryonic cells and the state of the Zona Pellucida for hatching of mouse blastocysts in vitro versus in vivo. Biol Reprod; 62: 1738-1744.

18. Thovas G. 2001. Simplified Technique for differential staining of inner cell mass and trophoectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod Biomed online; 17: 150.

19. Sheikholeslami B. Salehnia M. Rezazadeh VM. 2005. The effect of GM-CSF on development of tow cell mouse embryos to blastocyst stage. Yakhta. 9: 18-25.

20. Ribas RC Taylor JE. MC Corquodale C. 2006. Effect of Zona Pellucida removal on DNA Methylation in early mouse embryos. Biol Reprod; 74: 301-313.

Effects of various isolating methods of blastomeres from two cell mouse embryos on their developmental potential to blastocyst stage *in Vitro*

Behnaz sheikholeslami[1], Majid aletaha[2], saeed Tahmasebi[3]

1. Department of Experiment science, Medical science, Azad Eslamic University, Arak, Iran
2. Department of human science, Azad Eslamic University, Arak, Iran
3. Department of biology, Islamic Azad University, science and research Branch ,Tehran, Iran

Abstract:

Aim: The purpose of this study was to investigation and compares the developmental potential of isolated blastomeres from two cell embryo by four different isolating methods.

Material& methods: In order to remove Zona Pellucida and isolating blastomeres, physicochemical methods including exposure to tyrode acid, Hyaluronidase, EDTA and mechanical force were used. The blastomeres were cultured. Number of degenerated and abnormal embryos counted and diameter and total cell number of blastocysts were measured.

Results: Degenerated rates of blastomeres were 42.85, 57.5, 62.48 and 61.60 in mechanical, tyrode acid, EDTA and Hyaluronidase groups, respectively. It was lower in mechanical group than the others groups ($P< 0.05$).

Conclusion: In mechanical group, there were lesser negative influences on developmental potential of isolated blastomeres from two cell mouse embryos to blastocyst stage.

Key words:

Blastocyst, Isolated blastomere, Isolating methods, two cell mouse embryo