

## بررسی تأثیر فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) بر رشد و تکوین جنین‌های مورولای موش در محیط کشت

فروزان آبسالان<sup>۱</sup>، دکتر منصوره موحدین<sup>۱</sup>، دکتر سیدجواد مولا<sup>۲</sup>

### چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت رشد و تکوین جنین قبل از لانه‌گزینی و ضروری بودن فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) در فرآیند تکامل، بعضی برای آن نقش فاکتور رشد و حمایت از تکثیر سلولی و برخی دیگر نقش مهاری قائل هستند. در مورد نقش TNF- $\alpha$  در محیط کشت جنین قبل از لانه‌گزینی گزارشات کمی در دست است و مطالعه‌ای مبنی بر بررسی اثرات آن بر جنین مورولا یافت نشد. بر این اساس در این تحقیق تأثیر افزودن TNF- $\alpha$  با دوزهای ۰/۵، ۵ و ۵۰ ng/ml به محیط کشت جنین مورولای موش در سال ۱۳۸۱ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: تحقیق به روش تجربی روی ۴۵۲ جنین مورولای موش نژاد NMRI پس از تحریک تخمک‌گذاری [حدود ۷۸ تا ۸۰ ساعت پس از تزریق گونادوتروپین جفتی انسانی hCG] انجام گرفت. سیر تکوین جنین‌ها در چهار گروه شاهد (بدون افزودن TNF- $\alpha$  در محیط کشت)، آزمون ۱ (افزودن TNF- $\alpha$  با غلظت ۰/۵ ng/ml)، آزمون ۲ (غلظت ۵ ng/ml از TNF- $\alpha$ ) و آزمون ۳ (غلظت ۵۰ ng/ml از TNF- $\alpha$ ) به مدت ۹۶ ساعت مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. تأثیر مقادیر مشخص TNF- $\alpha$  بر مراحل مختلف رشد قبل از لانه‌گزینی و همچنین میزان مرگ جنین بررسی شد و با استفاده از آزمون آماری کای دو ( $\chi^2$ ) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: پس از ۹۶ ساعت کشت، ۷۲/۵ درصد از جنین گروه شاهد وارد مرحله خروج از زونا شدند که این مقدار برای گروه‌های آزمون به ترتیب ۴۴/۶، ۵۸ و ۲۸/۷ درصد بود و بین هریک از گروه‌ها با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار مشاهده شد ( $P < ۰/۰۵$ ). میزان دژنراسیون جنینی در گروه آزمون ۳ بالاتر از بقیه گروه‌ها بود (۳۳/۳ درصد) و از این نظر گروه شاهد با گروه آزمون ۲ اختلاف معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: افزودن TNF- $\alpha$  به محیط کشت جنین مورولای موش باعث کند شدن سیر تکوینی جنین‌ها تا مرحله خروج از زونا خواهد شد و TNF- $\alpha$  با دوز ۵ ng/ml نتیجه بهتری دارد. بر این اساس لازم است که مطالعات بیشتری در سطح مولکولی انجام شود.

واژگان کلیدی: جنین موش، محیط کشت، TNF- $\alpha$

۱- دانشگاه تربیت مدرس تهران، دانشکده پزشکی

۲- دانشگاه تربیت مدرس تهران، دانشکده علوم پایه

فوق در موقعیتهای مختلف است، لذا به نظر می‌رسد که در تنظیم این فاکتورها در طی تکامل دارای نقش مهمی باشد (۳). نشان داده شده که افزودن TNF- $\alpha$  به محیط کشت سلول‌های پیش‌ساز جرم باعث تکثیر آنها می‌شود. از این جهت برای آن در تنظیم و چگونگی تکثیر سلول‌های پیش‌ساز جرم در جنین، اهمیت خاصی قائل هستند (۱۱).

لازم به ذکر است که TNF- $\alpha$  از تخمدان، لوله‌های رحمی و رحم (۱۲) ترشح شده و برای رشد و عملکرد جفت و ادامه حیات جنین کاملاً ضروری است (۱۳). البته تجویز TNF- $\alpha$  در این زمان می‌تواند باعث سقط و یا ایجاد ناهنجاری در جنین شود (۱۴). مقدار TNF- $\alpha$  در رحم موش‌های حامله دیابتیک افزایش می‌یابد (۱۵) و این فرضیه مطرح شده است که تغییر در میزان تولید TNF- $\alpha$  می‌تواند با ادامه حیات جنین مغایرت داشته باشد (۱۶).

هم‌زمان با سنتز TNF- $\alpha$  در رحم، گیرنده‌های آن در بلاستوسیست (۱۷)، سلول‌های تروفواکتودرم (۱۸) و سلول‌های بنیادین جنین (۱۹) ظاهر می‌شود. برخی مطالعات نشان داده‌اند که افزودن TNF- $\alpha$  به محیط کشت بلاستوسیست میزان تکثیر سلول در توده داخلی سلولی بلاستوسیست را کاهش می‌دهد (۲۰)، توانایی سلول‌های بنیادین را برای تمایز کم می‌کند (۲۱) و سطح بروز گیرنده‌های سایر سیتوکین‌ها را در سلول‌های تروفواکتودرم کاهش می‌دهد (۱۸). لذا به نظر می‌رسد که TNF- $\alpha$  علی‌رغم نقش تحریک‌کننده رشد و تکثیر سلولی (۴ و ۵)، بر روی توده سلولی داخل و سلول‌های تروفواکتودرم نقش مهاری دارد (۲۲) و احتمالاً الگوهای پاسخ به سیتوکین‌ها برای سلول‌ها اختصاصی می‌باشد (۲۲). در پژوهش حاضر

امروزه یکی از دغدغه‌ها و نگرانی‌ها در آزمایشگاه‌های لقاح خارج رحمی مسأله رشد و تکوین جنین قبل از لانه‌گزینی است و سعی می‌شود حتی الامکان محیط کشت شبیه *in vivo* طراحی شود تا از یک سو تعداد جنین بیشتری با کیفیت مناسب به دست آید و از سوی دیگر از میزان دژنراسیون جنین کاسته شود. شواهد زیادی در دست است که حاکی از نقش مهم سیتوکین‌ها در تنظیم تکامل جنین و لانه‌گزینی می‌باشد (۱). فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) یکی از انواع سیتوکین‌ها است که راجع به نقش آن در تقابل<sup>۱</sup> ما بین جنین و رحم در هنگام لانه‌گزینی مطالعات زیادی صورت گرفته است. این پروتئین داشت اولین بار در سال ۱۹۷۵ توسط Coly در سرم یافت شد و مشاهده شد که قابلیت درمان سرطان دارد (۲). TNF- $\alpha$  در تنظیم مرگ سلولی به عنوان فاکتور رشد و تمایز، بازسازی ماتریکس خارج سلولی و تحریک مولکول‌های چسبنده سلول‌ها و اپیتگن‌ها نقش دارد (۳). TNF- $\alpha$  قادر است مانند فاکتور رشد عمل کند (۴) و به عنوان تکثیردهنده سلولی به کار رود (۵). این فاکتور می‌تواند تعدادی از فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و گیرنده‌های آنها را تحریک کند. Active در مغز استخوان (۶) فاکتور مهارکننده لوسمی (LIF) در غضروف و کندروسیت‌های مفاصل انسانی (۷)، فاکتور رشد عصبی (NGF) در سلول‌های غیرعصبی (۸)، گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (EGF-R) در سلول‌های گلیوما<sup>۲</sup> (۹) و سلول‌های سرطانی پانکراس (۱۰) دارای نقش شناخته شده‌ای در فرآیند تکامل هستند. با توجه به این که TNF- $\alpha$  قادر به تحریک ظهور فاکتورهای

<sup>۱</sup> - Interaction

<sup>۲</sup> - Glioma

مورولا، موش‌های حامله پس از ۷۸ تا ۸۰ ساعت از تزریق hCG با دررفتگی گردن کشته شدند و لوله‌های رحمی و رحم آنها خارج شد و با تزریق مقداری محیط کشت T6 حاوی سرم به داخل لوله‌های رحمی و در قطره‌های T6 (حاوی ۵mg/ml bovine Serum Albumin) جنین‌های مورولا که در مرحله early compaction قرار داشتند به دست آمد.

۳- کشت جنین‌ها و افزودن  $TNF-\alpha$  به محیط کشت: با افزودن مقادیر مختلف  $TNF-\alpha$  به محیط کشت T6 غلظتهای ۰/۵ng/ml، ۱/۰ng/ml و ۵ng/ml حاصل شد. سپس به قطرات محیط کشت از هر یک از سه غلظت مورد نظر افزوده شد و قطرات محیط کشت حداقل به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور  $CO_2$  قرار داده شد. جنین به دست آمده به چهار گروه شاهد آزمون ۱ (غلظت ۰/۵ng/ml از  $TNF-\alpha$ )، آزمون ۲ (غلظت ۵ng/ml از  $TNF-\alpha$ ) و آزمون ۳ (غلظت ۵۰ ng/ml از  $TNF-\alpha$ ) تقسیم شدند. تأثیر  $TNF-\alpha$  بر روی مراحل مختلف رشد جنین مورولای موش هر یک از چهار گروه به مدت ۹۶ ساعت توسط میکروسکوپ معکوس بررسی شد و در هر روز گزارش شد. در هر چهار گروه، ۵ تا ۷ بار آزمایشات تکرار شد.

نتایج به دست آمده توسط آزمون آماری کای دو آنالیز شد.

#### یافته‌ها

در مجموع ۴۵۲ جنین مورولا مورد بررسی قرار گرفتند که ۱۳۱ جنین در گروه شاهد، ۱۰۱ جنین در گروه آزمون ۱، ۱۱۲ جنین در گروه آزمون ۲ و ۱۰۸ جنین در گروه آزمون ۳ قرار داشتند. نتایج حاصل

تأثیرات  $TNF-\alpha$  با دوزهای مختلف بر جنین مورولای موش بررسی شد. در این زمان هنوز گیرنده‌های  $TNF-\alpha$  به صورت کامل در سلولها ظاهر نشده است (۱۷) و به دنبال پاسخ به این سؤال بودیم که آیا افزودن  $TNF-\alpha$  به محیط کشت جنین‌های مورولای موش توانایی تکامل آنها را به مرحله خروج از زونا که نماد لانه‌گزینی در محیط کشت است، کاهش می‌دهد یا نه؟ و کدام دوز به کار رفته کمترین تأثیرات سوء را دارد؟

#### مواد و روش‌ها

تحقیق به صورت تجربی روی ۴۵۲ جنین مورولای موش انجام گرفت.

#### ۱- حیوان آزمایشگاهی

موش‌های ماده از نژاد NMRI با سن ۶-۹ هفته از انستیتوی رازی تهران تهیه شدند و تحت شرایط کنترل شده ۱۲ ساعت دوره روشنایی و ۱۲ ساعت دوره تاریکی و درجه حرارت  $22-25^{\circ}C$  در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند. موش‌های نر بالغ از همان نژاد با سن تقریبی ۱۰-۱۲ هفته نیز برای جفت‌گیری انتخاب شدند.

#### ۲- تحریک تخمک‌گذاری و به دست آوردن جنین:

به منظور تحریک تخمک‌گذاری به موش‌های ماده ۱۰ واحد بین‌المللی (hMG (Serono, Italy) به صورت داخل صفاقی (IP) تزریق شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت ۱۰ واحد بین‌المللی از  $hCG$  (Organan, Holand)<sup>2</sup> به صورت IP تزریق شد. سپس به منظور جفت‌گیری، موش‌های نر و ماده به صورت یک به یک کنار هم قرار گرفتند. صبح روز بعد با مشاهده پلاک واژنی، موش‌های حامله جدا شدند. جهت به دست آوردن جنین

<sup>1</sup> - human Menopausal Ghonadotropin

<sup>2</sup> - human Chorionic Gonadotropin I

آزمون ۱ داشت ( $P < 0/05$ ). رشد جنین‌ها در گروه آزمون ۳ بسیار بیشتر از گروه‌های آزمون دیگر و حتی گروه شاهد بود و در این زمان ۷۷/۸ درصد از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیدند اما هیچ یک نتوانسته بودند به مرحله خروج از زونا وارد شوند. جنین دژنره‌ای در این روز از این گروه مشاهده نشد.

از رشد جنین‌ها در ۲۴ ساعت اول کشت در جدول شماره ۱ ارائه گردیده است و نشان می‌دهد در این روز جنین‌های گروه آزمون ۱ تفاوت معنی‌داری با جنین‌های گروه شاهد نداشتند. در مورد جنین‌های گروه آزمون ۲ نیز همین وضعیت صدق می‌کرد هرچند که میزان بلاستوسیست (اولیه و ثانویه) از گروه شاهد بیشتر بود و تفاوت معنی‌داری با گروه

جدول شماره ۱- مقایسه میزان رشد و تکوین جنین‌های گروه‌های شاهد، آزمون ۱ (غلظت  $0/5 \text{ ng/ml}$  از  $\text{TNF-}\alpha$ ) آزمون ۲ (غلظت  $5 \text{ ng/ml}$  از  $\text{TNF-}\alpha$ ) و آزمون ۳ (غلظت  $50 \text{ ng/ml}$  از  $\text{TNF-}\alpha$ ) پس از گذشت ۲۴ ساعت کشت

Deg (%)	Hg+Hd (%)	EB+LB (%)	CM (%)	مراحل رشد گروه مورد مطالعه
۴ (۳/۱)	۹ (۶/۹)	۷۷ (۵۸/۷)	۴۱ (۳۱/۳)	شاهد (N=۱۳۱)
۲ (۲)	۳ (۳)	۵۰ (۴۹/۵)	۴۶ (۴۵/۵)	آزمون ۱ (N=۱۰۱)
۴ (۳/۶)	۶ (۵/۴)	۷۳ b* (۶۵/۲)	۲۹ b** (۲۵/۹)	آزمون ۲ (N=۱۱۲)
۰ (۰)	a **, C* (۰)	a** b***c* ۸۴ (۷۷/۸)	۲۴ b*** (۲۲/۲)	آزمون ۳ (N=۱۰۸)

a: تفاوت با گروه شاهد معنی دار است. b: تفاوت با گروه آزمون ۱ معنی دار است. c: تفاوت با گروه آزمون ۲ معنی دار است.

مورولا در مرحله COM: Compact، بلاستوسیست اولیه: EB، بلاستوسیست ثانویه: LB، در حال خروج از زونا: Hd

دژنره: Deg.  $P < 0/05^*$   $P < 0/01^{**}$   $P < 0/001^{***}$

میزان خروج از زونا نیز نسبت به گروه شاهد کمتر بود و اختلاف معنی‌داری نشان داد ( $P < 0/05$ ). در گروه آزمون ۳ تعدادی از جنین‌ها وارد مرحله خروج از زونا شدند اما این مقدار نسبت به گروه شاهد و دو گروه آزمون دیگر کمتر بود و با همه این گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان داد. در ضمن میزان دژنراسیون جنینی در این گروه ناگهان افزایش زیادی پیدا کرد به طوری که ۱۷/۶ درصد جنین‌ها دژنره شدند.

جدول شماره ۲ میزان تکامل جنین‌ها را بعد از ۴۸ ساعت کشت نشان می‌دهد. در این روز میزان خروج از زونا در گروه آزمون ۱ به صورت معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ( $P < 0/05$ ) اما از نظر میزان تعداد بلاستوسیست و یا جنین دژنره تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در گروه آزمون ۲ تعداد بیشتری از جنین‌ها در مرحله تکاملی بلاستوسیست باقی‌مانده بودند که با گروه ۱ تفاوت معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ) و

جدول ۲- مقایسه میزان رشد و تکوین جنین‌های گروه‌های شاهد، آزمون ۱ (غلظت ۰/۵ng/ml از  $TNF-\alpha$ ) آزمون ۲ (غلظت ۵ ng/ml از  $TNF-\alpha$ ) و آزمون ۳ (غلظت ۵۰ng/ml از  $TNF-\alpha$ ) پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت

Deg (%)	Hg+Hd (%)	EB+LB (%)	CM (%)	مراحل رشد گروه مورد مطالعه
۱۲ (۹/۲)	۴۶ (۳۵/۱)	۶۸ (۵۱/۹)	۵ (۳/۸)	شاهد (N=۱۳۱)
۲۰ (۱۹/۸)	a* ۲۰ (۱۹/۸)	۵۸ (۵۷/۴)	۳ (۳)	آزمون ۱ (N=۱۰۱)
b*** ۶ (۵/۴)	a* ۲۶ (۲۳/۲)	a* ۷۳ (۶۵/۲)	۷ (۶/۲)	آزمون ۲ (N=۱۱۲)
a* c** ۱۹ (۱۷/۶)	a*** ۱۲c* b* (۱۱/۱)	a* ۷۰ (۶۴/۸)	۷ (۶/۵)	آزمون ۳ (N=۱۰۸)

a: تفاوت با گروه شاهد معنی‌دار است. b: تفاوت با گروه آزمون ۱ معنی‌دار است. c: تفاوت با گروه آزمون ۲ معنی‌دار است. مورولا در مرحله CM: Compact، بلاستوسیت اولیه: EB، بلاستوسیت ثانویه: LB، در حال خروج از زونا: Hg، خروج از زونا: Hd، دژنه: Deg.

$P < 0.001$  \*\*\*

$P < 0.01$  \*\*

$P < 0.05$  \*

باشند. از میان گروه‌های آزمون، گروه آزمون ۳ بیشترین درصد جنین در مرحله بلاستوسیت را دارا بود که با دو گروه آزمون دیگر هم تفاوت معنی‌داری داشت. از نظر میزان خروج از زونا هر سه گروه آزمون تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشتند که باز هم جنین‌های گروه آزمون ۳ از این جهت بسیار کمتر بوده و با دو گروه آزمون دیگر

چگونگی رشد و تکوین جنین‌ها پس از گذشت ۷۲ ساعت در جدول شماره ۳ آمده است. در این روز هر سه گروه آزمون از نظر تعداد جنین در مرحله بلاستوسیت با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. درصد بالاتری جنین در این مرحله قرار داشت، در حالی که انتظار می‌رفت بیشتر جنین‌ها وارد مرحله خروج از زونا شده

تفاوت معنی داری داشتند. میزان دژنراسیون جنینی در گروه شاهد و گروه‌های آزمون ۱ و ۲ در یک دامنه قرار داشت اما در گروه آزمون ۳ بیشتر بود و با گروه شاهد و آزمون ۲ اختلاف معنی داری داشت.

جدول ۳- مقایسه میزان رشد و تکوین جنین‌های گروه‌های شاهد، آزمون ۱ (غلظت ۰/۰۵ ng/ml از  $TNF-\alpha$ ) آزمون ۲ (غلظت ۵ ng/ml از  $TNF-\alpha$ ) و آزمون ۳ (غلظت ۵۰ ng/ml از  $TNF-\alpha$ ) پس از گذشت ۷۲ ساعت کشت

مراحل رشد / گروه مورد مطالعه	EB+LB (%)	Hg+Hd (%)	Deg (%)
شاهد (N=۱۳۱)	۲۱ (۱۶)	۹۱ (۶۹/۵)	۱۹ (۱۴/۵)
آزمون ۱ (N=۱۰۱)	a * ۳۳ (۳۲/۶)	a*** ۴۵ (۴۴/۶)	۲۳ (۲۲/۸)
آزمون ۲ (N=۱۱۲)	a *** ۴۸ (۴۲/۹)	a *** ۴۶ (۴۱/۱)	۱۸ (۱۶/۱)
آزمون ۳ (N=۱۰۸)	a*** b*** c* ۶۲ (۵۷/۴)	a *** ۱۶ c*** b*** (۱۴/۷)	a* c * ۳۰ (۲۷/۸)

a: تفاوت با گروه شاهد معنی دار است. b: تفاوت با گروه آزمون ۱ معنی دار است. c: تفاوت با گروه آزمون ۲ معنی دار است.

بلاستوسیست اولیه EB، بلاستوسیست ثانویه LB، در حال خروج از زونا: Hg، خروج از زونا: Hd، دژنره Deg

P<۰/۰۰۱ \*\*\*

P<۰/۰۱ \*\*

P<۰/۰۵ \*

کمتری وارد مرحله خروج از زونا شدند که تفاوت با هر دو گروه نیز معنی دار بود. میزان دژنراسیون جنینی هم در این گروه نسبت به دو گروه شاهد و آزمون ۲ بیشتر بود و حاکی از اختلاف مشاهده شده معنی دار بود. میزان دژنراسیون جنینی در گروه آزمون ۳ بسیار بالا بود (۳۳/۳ درصد) که با گروه شاهد و دو گروه آزمون اختلاف معنی دار داشت و نمایانگر عدم کارایی شرایط کشت در این گروه بود. در ضمن میزان خروج از زونا همچنان از سه گروه دیگر کمتر بوده و تعداد بیشتری از جنین‌ها هنوز در مرحله بلاستوسیست بودند.

پس از گذشت ۹۶ ساعت از کشت (جدول شماره ۴) به نظر رسید که گروه آزمون ۲ تا حدی شبیه به گروه شاهد شده و تعداد بیشتری از بلاستوسیست‌ها توانسته‌اند به مرحله خروج از زونا برسند هرچند که از این نظر هنوز تفاوت معنی داری با گروه شاهد داشت (۵۸ درصد در گروه آزمون ۲ در مقابل ۷۲/۵ درصد در گروه شاهد) ( $P<۰/۰۵$ ) و از نظر میزان دژنراسیون جنینی هم تقریباً شبیه یکدیگر بودند. در گروه آزمون ۱ تعداد بیشتری در مرحله بلاستوسیست باقی مانده بودند و نسبت به دو گروه شاهد و آزمون ۲ هم تعداد

جدول ۴- مقایسه میزان رشد و تکوین جنین‌های گروه‌های شاهد، آزمون ۱ (غلظت ۰/۵ ng/ml از  $TNF-\alpha$ ) آزمون ۲ (غلظت ۵ ng/ml از  $TNF-\alpha$ ) و آزمون ۳ (غلظت ۵۰ ng/ml از  $TNF-\alpha$ ) پس از گذشت ۹۶ ساعت کشت.

مراحل رشد / گروه مورد مطالعه	EB+LB (%)	Hg+Hd (%)	Deg (%)
شاهد (N=۱۳۱)	۱۶ (۱۲/۲)	۹۵ (۷۲/۶)	۲۰ (۱۵/۲)
آزمون ۱ (N=۱۰۱)	a ** ۲۷ (۲۶/۷)	a *** ۴۵ (۴۴/۶)	a * ۲۹ (۲۸/۷)
آزمون ۲ (N=۱۱۲)	۲۲ (۱۹/۶)	a* b * ۶۵ (۵۸)	۲۵ (۲۲/۴)
آزمون ۳ (N=۱۰۸)	a *** ۴۱ c ** (۳۸)	a *** ۳۱ c *** b * (۲۸/۷)	a *** ۳۶ c * (۳۳/۳)

a: تفاوت با گروه شاهد معنی‌دار است. b: تفاوت با گروه آزمون ۱ معنی‌دار است. c: تفاوت با گروه آزمون ۲ معنی‌دار است.

بلاستوسیست اولیه EB، بلاستوسیست ثانویه: LB، در حال خروج از زونا: Hg، خروج از زونا: Hd و دژنره: Deg

P<۰/۰۰۱ \*\*\*

P<۰/۰۱ \*\*

P<۰/۰۵ \*

### بحث

$TNF-\alpha$  نقش‌های مهمی قائل شده‌اند (۱۱- ۶) اما کلیه موارد در سلول‌هایی بوده است که تا اندازه‌ای وارد مرحله تمایز خاصی شده بودند و گزارش‌های متعددی هم در دست است که اشاره به نقش مهاری  $TNF-\alpha$  در تکثیر سلولهای توده داخل سلولی بلاستوسیست (۲۰) و جلوگیری از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی (۲۱) می‌کند.

در پژوهش حاضر جنین مورولا انتخاب شد. به این دلیل که این مرحله تکاملی تحت تأثیر سیتوکین‌های اسپرم یا تخمک نمی‌باشد و بعد از مرحله هشت سلولی ظهور ژنوم گامت تمام شده است (۲۳) و می‌توان از این مرحله به بعد به مطالعه تأثیرات  $TNF-\alpha$  بر تکامل جنین پرداخت. هر چند که بسیاری از محققین آغاز بروز گیرنده‌های  $TNF-\alpha$  را در جنین بلاستوسیست گزارش کرده‌اند (۲۰-۲۲) اما به نظر می‌رسد که هم‌زمان با ظهور ژنوم در جنین، پاسخ به سیتوکین‌های اگزوژن هم

نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن  $TNF-\alpha$  به محیط کشت جنین‌های مورولا در سرعت رشد جنین‌ها تأثیر می‌گذارد و درصد کمتری از آنها نسبت به گروه شاهد به مرحله خروج از زونا می‌رسند. مشاهدات ما با این فرضیه که  $TNF-\alpha$  همانند فاکتور رشد عمل کرده (۴) و یک عامل تحریک تکثیر سلولی است (۵)، مطابقت ندارد. شمارش سلولی نشان داد که جنین‌هایی که به محیط کشت آنها  $TNF-\alpha$  افزوده شده بود دارای تعداد کمتری سلول در مقایسه با جنین‌های گروه شاهد بودند. Wu و همکاران (۲۲) و Pampfer و همکاران (۲۰) نیز نتایج مشابهی به دست آوردند. لذا به نظر می‌رسد که پاسخ سلول‌های متفاوت به  $TNF-\alpha$  یکسان نمی‌باشد و اینکه سلول در چه مرحله تکاملی قرار داشته باشد تعیین‌کننده نوع پاسخ به این سیتوکین است. برخی محققین برای

محیط کشت پرداختند که آنها نیز به این نتیجه دست یافتند که دوز بالاتر (۵۰ng/ml) دارای اثرات سوء بیشتری نسبت به دوز پایین تر (ng/ml) می باشد. انتظار این بود که دوز ۰/۵ng/ml که در این تحقیق هم به کار رفت اثرات سوء کمتری داشته باشد و جنین های گروه آزمون ۱ به گروه شاهد نزدیک تر باشند که این یافته به دست نیامد. با توجه به اینکه در پژوهش حاضر و مطالعه Wuu و همکاران (۲۲) از نژاد مشابهی استفاده شده است (نژاد NMRI) نمی توان نتیجه گیری کرد که هرچقدر مقدار TNF- $\alpha$  کمتر باشد برای رشد و تکامل جنین بهتر است. چنانچه در تحقیق حاضر مشاهده شد، در روزهای اول کشت گروه آزمون ۲ نسبت به گروه شاهد تکامل بدتری داشت اما در روز آخر کشت تقریباً مشابه گروه شاهد شد و هرچند که از نظر میزان خروج از زونا عقب تر از گروه شاهد بود ولی مقدار دژنراسیون جنینی که عمل مهمی برای ارزیابی شرایط کشت محسوب می شود (۲) مشابه گروه شاهد بود. در مجموع می توان نتیجه گرفت که TNF- $\alpha$  اگزوزون دارای اثرات مخرب بر تکامل جنین مورولای موش در محیط کشت است ولی برای اطمینان از اینکه آیا کمتر شدن سرعت رشد و تکوین جنین ها ناشی از تغییر در شرایط محیط کشت با افزودن TNF- $\alpha$  به آن است و یا اضافه کردن TNF- $\alpha$  باعث ظهور بیشتر گیرنده ها در سطح سلول های جنینی می شود و وضعیتی شبیه به رحم مادران حامله دیابتیک را به وجود می آورد باید در جنین هایی که در معرض TNF- $\alpha$  اگزوزون قرار گرفته اند، تحقیقاتی در سطح مولکولی صورت گیرد.

آغاز می شود و همان طور که در تحقیق حاضر مشاهده شد روند تکاملی جنین هایی که به محیط کشت آنها دوزهای متفاوت TNF- $\alpha$  افزوده شد، دچار تأخیر شد. مطالعه مشابهی بر روی جنین مورولا صورت نگرفته است که مشخص کند در دیگر گونه های موش، جنین مورولا در مقابل TNF- $\alpha$  چه پاسخی خواهد داشت.

در این پروژه گزارش سیر تکوینی به صورت روزانه انجام شد و در روزهای مختلف هم مقایسه شد. مزیت آن این است که علاوه بر تعیین میزان درصد هر یک از مراحل تکاملی در پایان کشت سیر تکوینی جنین ها را هم مشخص می کند. در گروه آزمون ۳ که بیشترین دوز (۵۰ng/ml) TNF- $\alpha$  به محیط آنها افزوده شده بود در طی روز اول درصد بالایی بلاستوسیت شدند (۷۷/۸ درصد) که حتی از گروه شاهد نیز بیشتر بود. اما این بلاستوسیت ها در آن روز توانایی خروج از زونا را نداشتند و در طی روزهای بعد تعداد زیادی دچار دژنراسیون شدند و درصد کمی (۲۸/۷ درصد) به مرحله خروج از زونا رسیدند. لذا مشخص شد که این دوز برای جنین های مورولا بسیار مهلک است و سیر تکاملی جنین ها را با مشکل روبرو می کند و معلوم هم نیست که حتی این تعداد کم جنین پس از انتقال قادر به لانه گزینی و ادامه حیات باشند. به هر حال میزان درصد بالای خروج از زونا در محیط کشت به عنوان یک معیار کیفیت جنین و قابلیت ادامه حیات آن محسوب می شود (۲۲).

در مطالعات انجام شده تنها Wuu و همکاران (۲۲) با دو دوز متفاوت از TNF- $\alpha$  (۵ و ۵۰ ng/ml) به بررسی تأثیرات آن بر تکامل بلاستوسیت ها در

## References:

- 1- Sharkey A. Cytokines and implantation. Rev Reprod 1998; 3: 52-61.

- 2- Hunt JS, Chen HL, Miller L. Tumor necrosis factors: Pivotal components of pregnancy. *Biol Reprod* 1996; 54: 554-62.
- 3- Wride MA, Sanders EJ. Potential roles for tumor necrosis factor  $\alpha$  during embryonic development. *Anat Embryol* 1995; 191: 1-10.
- 4- Vilecek J, Palombella VJ. TNF as a growth factor. In: Aggarwal BB and Vilecek J (eds) *Tumor necrosis factors: structure function and mechanism of action*. Dekker, New York 1992; pp: 269-87.
- 5- Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, et al. Recombinant tumor necrosis factor  $\alpha$ : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 1985; 230: 943-45.
- 6- Shao L-E, Frigon NL Jr, Sehy DW, et al. Regulation of production of activin A. *Exp Hematol* 1992; 20: 1235-42.
- 7- Campbell IK, Waring P, Novak U, et al. Production of leukemia inhibitory factor by human articular chondrocytes and cartilage in response to interleukin- 1 and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arthritis Rheum* 1993; 36: 790.
- 8- Hattori A, Tanaka E, Murase T, et al. Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 2577-82.
- 9- Adachi K, Belser P, Render H, et al. Enhancement of epidermal growth factor receptor expression on glioma cells by recombinant tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Cancer Immunol Immunother* 1992; 34: 370-76.
- 10- Schmiegel W, Roeder C, Schmielau J, et al. Tumor necrosis factor induces the expression of transforming growth factor  $\alpha$  and the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 863-67.
- 11- Kawase E, Yamamoto H, Hashimoto K, Nakatsuji N. Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Dev Biol* 1994; 161: 91-95.
- 12- Terranova PF, Hunter VJ, Roby KF, Hunt JS. Tumor necrosis factor  $\alpha$  in the female reproductive tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 325-42.
- 13- Kohchi C, Noguchi K, Tanabe Y, et al. Constitutive expression of TNF- $\alpha$  and  $\beta$  genes in mouse embryo. Roles of cytokines as regulator and effect on development. *Int J Biochem* 1994; 26: 111-19.
- 14- Taubeneck MW, Daston GP, Rogers JM, et al. Tumor necrosis factor-  $\alpha$  alters maternal and embryonic zinc metabolism and is developmentally toxic in mice. *J Nutr* 1995; 125: 908-19.
- 15- Pampfer S, Vanderheyden I, Wu Yn, et al. Possible role of TNF-  $\alpha$  in early embryopathy associated with maternal diabetes in the rat. *Diabetes* 1995; 44: 531-36.
- 16- Fein A, Kostina E, Savion S, et al. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pregnant uterus of diabetic mic: effect of maternal immunopotential. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46: 161-68.
- 17- Pampfer S, Wu YD, Vanderheyden I, De Hertogh R. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) receptors and selective effect of TNF- $\alpha$  on the inner cell mass in mouse blastocysts. *Endocrinology* 1994; 134: 206-12.
- 18- Ben-Yair E, Less A, Lev S, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  binding to human and mouse trophoblasts. *Cytokine* 1997; 9: 830-36.
- 19- Kohchi C, Tanabe Y, Noguchi K, et al. Induction of differentiation in embryonic stem cells by 26Kd membrane-bound tumor necrosis factor (TNF) and 17KD free TNF: In vivo. 1996; 10: 19-28.
- 20- Pampfer S, Vanderheyden I, McCracken Je, et al. Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and to high glucose or tumor necrosis factor  $\alpha$  in vitro. *Development* 1997; 124: 4827-36.
- 21- Wu YD, Pampfer S, Vanderheyden I, et al. Impact of tumor necrosis factor-  $\alpha$  on mouse embryonic stem cells. *Biol Reprod* 1998; 58: 1416-24.
- 22- Wu YD, Pampfer S, Becquet P, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  decreases the viability of mouse blastocysts in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 1999; 60: 479-83.
- 23- Kim CH, Chae He, Cheon YP, et al. The effect of epidermal growth factor on the preimplantation development, implantation and its receptor expression in mouse embryos. *J Obstet Gynaecol Res* 1999; 25(2): 87-93.