

فهرست مطالب

فصل اول

مقدمه..... ۲

فصل دوم

مروری بر پژوهش های انجام شده..... ۴

۱-۲- اویداکت..... ۵

۱-۱-۲- اپیتلیوم اویداکت..... ۶

۲-۱-۲- فعالیت بیوسنتزی اویداکت..... ۷

۱-۲-۱-۲- پروتئین های مایع مجرا..... ۸

۲-۲-۱-۲- پروتئین های مشتق شده از اویدوکت..... ۹

۳-۱-۲- گلیکوپروتئین های ترشحی اویداکتی وابسته به استروژن..... ۱۰

۱-۳-۱-۲- ممانعت کننده های پروتئاز..... ۱۱

۴-۱-۲- پروتئین های دیگر..... ۱۳

۱-۴-۱-۲- فاکتورهای رشد پپتیدی..... ۱۴

۲-۲- کشت سلول..... ۱۵

۱-۲-۲- تفاوت محیط کشت آزمایشگاهی با شرایط بدن جاندار..... ۱۵

۲-۲-۲- انواع سیستم های کشت..... ۱۶

۳-۲-۲- کشت اولیه سلول..... ۱۶

۴-۲-۲- لاین های سلولی..... ۱۷

۵-۲-۲- شرایط کشت سلول..... ۱۸

۶-۲-۲- محیط کشت سلول..... ۱۸

۱-۶-۲-۲- کربوهیدرات ها..... ۱۹

۲-۶-۲-۲- اسیدهای آمینه..... ۱۹

۳-۶-۲-۲- نمک ها..... ۱۹

۴-۶-۲-۲- ویتامین ها و هورمون ها..... ۱۹

| | |
|----|--|
| ۲۰ |۲-۲-۵- فنول قرمز..... |
| ۲۰ |۲-۲-۷- اجزاء مکمل محیط کشت..... |
| ۲۰ |۲-۲-۷-۱- سرم..... |
| ۲۱ |۲-۲-۷-۲- آنتی بیوتیک ها..... |
| ۲۱ |۲-۳- جداسازی و کشت سلولهای اپیتلیال اویداکت..... |
| ۲۵ |۲-۴- کاربرد های کشت همزمان..... |
| ۲۵ |۲-۴-۱- کشت همزمان سلول های اپیتلیال اویداکت با جنین ها..... |
| ۲۹ |۲-۴-۲- کشت همزمان اسپرماتوزوآ با سلول های اپیتلیال اویداکت..... |
| ۳۰ |۲-۵- فاکتور های رشد شبه انسولین..... |
| ۳۲ |۲-۵-۱- IGFBPs..... |
| ۳۳ |۲-۵-۲- اثرات IGF-I..... |
| ۳۶ |۲-۵-۳- اثرات IGF-II..... |
| ۳۶ |۲-۵-۴- تنظیم بیان IGFها..... |
| ۳۷ |۲-۵-۵- فاکتور رشد تغییر شکل دهنده آلفا(TGF α)..... |
| ۳۷ |۲-۶- گونادوتروپین ها..... |
| ۳۷ |۲-۶-۱- تنظیم ترشح گونادوتروپین ها..... |
| ۳۸ |۲-۶-۲- اعمال گونادوتروپینها..... |
| ۳۸ |۲-۶-۳- استرادیول ۱۷ بتا..... |
| ۳۹ |۲-۶-۴- گیرنده استروژن..... |
| ۴۰ |۲-۶-۵- سنتز هورمون های استرویدی..... |

فصل سوم

| | |
|----|--|
| ۴۲ |۳- مواد و روش ها..... |
| ۴۳ |۳-۱- مواد..... |
| ۴۳ |۳-۲- کیت ها..... |
| ۴۳ |۳-۳- آماده سازی محیط ها و محلول ها..... |
| ۴۵ |۳-۳- روش تحقیق..... |
| ۴۵ |۳-۳-۱- لوله اویداکت..... |
| ۴۵ |۳-۳-۲- جداسازی و کشت سلولهای اویداکت..... |
| ۴۵ |۳-۳-۳- تست زنده مانی سلول..... |

| | |
|---------|--|
| ۴۵..... | ۴-۳-۳- تیمارها..... |
| ۴۶..... | ۴-۳- استخراج RNA با استفاده از کیت روشه..... |
| ۴۷..... | ۵-۳- استخراج DNA..... |
| ۴۸..... | ۶-۳- سنجش DNA..... |
| ۴۹..... | ۱-۶-۳- سنجش کیفی DNA..... |
| ۴۹..... | ۷-۳- تهیه cDNA..... |
| ۵۰..... | ۸-۳- طراحی پرایمر..... |
| ۵۲..... | ۹-۳- واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)..... |
| ۵۲..... | ۱-۹-۳- مواد و محلول های لازم جهت انجام واکنش PCR..... |
| ۵۳..... | ۲-۹-۳- روش انجام واکنش PCR..... |
| ۵۳..... | ۳-۹-۳- الکتروفورز نمونه های PCR شده بر روی ژل آگارز..... |
| ۵۴..... | ۱۰-۳- بررسی سلول ها با میکوسکوپ الکترونی..... |

فصل چهارم

| | |
|---------|-------------------------|
| ۵۵..... | ۴- نتایج و بحث..... |
| ۵۶..... | 1-4- نتایج..... |
| ۶۳..... | ۲-۴- بحث..... |
| ۸۵..... | پیشنهادات..... |
| ۸۶..... | منابع مورد استفاده..... |

اول فصل

مقدمه

تولید جنین دامهای اهلی به روش آزمایشگاهی جهت تحقیق در امر اصلاح نژاد و دامپروری بسیار حائز اهمیت است (۱). از جنین های تولید شده می توان برای تحقیقات پایه در بیولوژی تکاملی و فیزیولوژی، روشهای نوین زیست فناوری از جمله انتقال هسته جهت شبیه سازی و تولید حیوانات تراریخته استفاده نمود. همچنین از این فناوری می توان برای حفظ گونه های در معرض خطر انقراض با انتقال جنین بین گونه ای استفاده نمود (۲).

جنین های تولید شده به روش آزمایشگاهی اغلب با مشکلاتی نظیر توقف یا عقب ماندگی رشد مواجه اند. این مشکلات ناشی از منشا تخمک و عمدتاً شرایط نامناسب محیط کشت قبل و بعد از لقاح هستند.

هم کشتی جنین ها با سلولهای سوماتیک با ایجاد شرایط طبیعی (۳) روشی برای بهبود محیط کشت مورد استفاده در لقاح آزمایشگاهی می باشد. از سلولهای مختلفی برای هم کشتی از جمله: سلولهای تروفوبلاست، گرانولوزا، فیبروبلاست، لوتئال، اندومتريال و اویداکت استفاده شده است (۴). به نظر نمی رسد بسیاری از فاکتورهای تغذیه کننده جنین که از سلولهای سوماتیک ترشح می شوند به بافت خاصی محدود باشند اما با این حال این مطلب پذیرفته شده است که سلولهایی که از بافت دستگاه تولید مثلی خصوصاً اویداکت گرفته می شوند، بهتر می توانند شرایط فیزیولوژیکی زمان پس از لقاح را ایجاد نمایند (۴). در نتیجه، کشت سلول های اپیتلیال اویداکت برای هم کشتی با جنین، مناسب تر از سلول های دیگر بافت های بدن به نظر می رسد.

سلول های سوماتیک به دو طریق اثر مثبت بر جنین دارند: ۱- بهبود منفی که عبارتست از: حذف ترکیبات سمی از محیط کشت (مثلاً هیپوگزانتین و یا نیکوتین آمید)، حفاظت در برابر استرس اکسیداتیو و یا تعدیل شرایط فیزیوشیمیایی محیط کشت (خصوصیات غذایی یا مقدار pH). ۲- بهبود

مثبت که عبارتست از: ترشح فاکتورهای تغذیه ای برای جنین. این فاکتورها ممکن است شامل پروتئین های خاص و فاکتورهای رشد متنوعی باشند از جمله: فاکتورهای رشد شبه انسولین I^۱ و فاکتور رشد ترانسفورم کننده $\alpha^۲$ (۵).

فاکتورهای رشد شبه انسولین ۱ و ۲ جزئی از سیستم IGF می باشند که این سیستم خود از دو لیگاند (IGF-I و II)، دو گیرنده ($IGF-IR^۳$ و $IGF-IIR^۴$) و شش پروتئین باند شونده (IGFBP-1 تا 6) تشکیل شده است (۶).

IGF-I و II باعث تحریک طیف وسیعی از اثرات میتوزنیک و آنابولیک می شوند (۷). فاکتور رشد شبه انسولین I با جلوگیری از مرگ سلول^۵ها، افزایش تعداد سلول^۶ها و متابولیزم آنها باعث رشد بهتر جنین ها در مرحله پیش از لانه گزینی می شود. نشان داده اند که اضافه نمودن IGF-I به محیط کشت نه تنها موجب افزایش تعداد جنین هایی که به مرحله بلاستوسیست می شود (۲۵٪) بلکه افزایش معنی دار تعداد سلول^۷های توده سلولی (۵۹٪) را هم نشان داد (۷).

در ضمن IGF-II در شرایط آزمایشگاهی موجب سنتز DNA و زنده مانی بیشتر سلول^۸ها می شود (۸).

فاکتور رشد ترانسفورم کننده آلفا ($TGF-\alpha$) عضوی از خانواده فاکتور رشد اپیدرمی می باشد. در این خانواده علاوه بر $TGF-\alpha$ ، فاکتورهای رشد دیگری نظیر فاکتور رشد اپیدرمی^۵ (EGF)، amphiregulin و neuregulin نیز حضور دارند. اثرات $TGF-\alpha^۶$ بر جنین های پیش از مرحله لانه گزینی شامل سنتز پروتئین در جنین موش، تحریک ترشح پروتئین به حفره بلاستوسل، افزایش سنتز پروتئین توسط سلول^۷های جدا شده توده داخلی سلولی (ICM) و تنظیم تولید پروتئین های خاص

^۱ - Insulin like growth factor I (IGF-I)

^۲ - Transforming growth factor- α (TGF- α)

^۳ - Insulin like growth factor I Receptor

^۴ - Insulin like growth factor II Receptor

^۵ - Epidermal growth factor

^۶ - Transforming growth factor

در بلاستوسیست موش می باشد. $TGF-\alpha$ همچنین به عنوان فاکتور زنده مانی در جنین های پیش از مرحله لانه گزینی عمل می کند. اضافه نمودن EGF یا $TGF-\alpha$ به محیط کشت باعث تحریک تولید بلاستوسیست در جنین های ۲ سلولی می شود (۹).

با توجه به تاثیر هورمون های FSH و LH بر بلوغ فیزیولوژیکی تخمک در شرایط آزمایشگاهی و نقش فاکتورهای رشد (۱۰)، هدف از این تحقیق بررسی اثر این هورمون ها و هورمون استرادیول ۱۷ بتا بر بیان ژن فاکتورهای رشد شبه انسولین I و II و $TGF-\alpha$ در سلول های اویداکت گاو در شرایط آزمایشگاهی می باشد. از نتایج این تحقیق شاید بتوان جهت بهبود محیط کشت برای رشد کمی و کیفی جنین استفاده نمود.

فصل دوم

مروری بر پژوهش

های انجام شده

مروری بر پژوهش های انجام شده

دستگاه تولید مثل دام از قسمت های تخمدان ها، اویداکت، رحم، گردن رحم و واژن تشکیل شده است که هر قسمت داری اهمیت ویژه ای از لحاظ تولید مثل می باشد. پژوهش حاضر با بخش اویداکت در ارتباط است لذا در ادامه، این قسمت با جزئیات بیشتر مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

۲-۱- اویداکت

اویداکت به سه قسمت مجزا شامل نواحی مختلف آناتومیکی و عملکردی اینفاندیبیلوم، امپولا و ایستموس تقسیم می شود (۵).

اینفاندیبیلوم قسمتی است که تخمک ها را از فولیکول های پاره شده دریافت می کند، آنها را به ماکروملکولهای اویداکتی معرفی می کند و به درون آمپولا هدایت می کند. لقاح و تسهیم اولیه جنینی در آمپولا، ناحیه ای با فعالیت های بیوسنتتیکی زیاد شامل سنتز ماکروملکولها، تولید و ترشح مایع، رخ می دهد. ایستموس که امکان دارد به عنوان یک ذخیره کننده اسپرم عمل کند، انتقال اسپرم به آمپولا و همچنین انتقال جنین به درون رحم را انجام می دهد. به نظر می رسد این اعمال مرتبط با تفاوت های آناتومیکی مشاهده شده باشند. تفاوت های ناحیه ای فعالیت بیوشیمیایی این قطعات در گونه آزمایش شده نشان می دهد که مولکولهای ترشحی ویژه تولید شده ممکن است مرتبط با نقش هر قطعه باشند (۵).

دو نظریه راجع به ترشح و تجمع پروتئین در حفره اویداکت وجود دارد. نخست: اویداکت منبع غیر فعالی از پروتئین را که به روش تراوش از سرم می گیرد، فراهم می کند (۱). اجزای عمده این تراوش پروتئین های سرم (آلبومین، ترنسفرین و ایمونوگلوبین ها) هستند اما دارای آنزیم ها و مولکول های پروتئینی دیگر از جمله سیتوکین ها، فاکتورهای رشد و پروتئین های ناقل نیز هستند. دوم: اویداکت به عنوان یک بافت پویا و فعال بیولوژیکی که در طی

سیکل استروس و قاعدگی ماکرومولکول ها را سنتز و به درون مجرا آزاد می‌کند، دیده می‌شود. مطالعات اخیر یکسری برهمکنش ها را بین گامت- اویدوکت (۳-۱۱) و جنین-اویدوکت (۱۲) را پیشنهاد می‌کنند که نشان دهنده برخی تنظیمات این وقایع است (۵).

۲-۱-۱- اپیتلیوم اویداکت

اپیتلیوم اویداکت برای فرآیندهای مختلف تولید مثلی اهمیت دارد. در طول چرخه فحلی تحت تاثیر هورمون های درون ریز تغییرات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی قابل توجهی دارد (۲۱).

این تغییرات ریز محیط ضروری برای بلوغ نهایی گامت ها، ظرفیت پذیری اسپرم ها، انتقال گامت ها و جنین، لقاح و رشد اولیه جنین را فراهم می‌کند (۱). این اعمال پیچیده بستگی به فعالیت های سلول های اپیتلیال مژه دار و ترشحاتی اویداکت دارد (۱). اپیتلیوم اویداکت دارای سلول های مژه دار و ترشحاتی است (۳). سلول های مژه دار در انتقال اووسیت ها، اسپرم ها و جنین های اولیه نقش دارد، در حالیکه ترشحات سلول های ترشحاتی ریز محیط بهینه اویداکت را فراهم می‌سازد (۱۳). نشان داده شده است که در طول چرخه فحلی تغییرات زیادی در تعداد سلول های مژه دار و ترشحاتی وجود دارد (۱۴). در طول چرخه فحلی به جای بوجود آمدن جمعیت جدید سلولی، سلول های اپیتلیوم عملکردشان را تغییر می‌دهند (۱۵). مطالعات ترانسکریپتوم نیز تغییرات زیاد وابسته به چرخه فحلی را در الگوهای بیان ژن سلول های اپیتلیال اویداکت گاو شناسایی کرده اند (۳). بیشتر ژن های بیش تنظیم شده در فاز لوتئال/دای استروس در تنظیم رونویسی و تکثیر سلولی نقش دارند، در حالیکه

اکثر ژن های بیش تنظیم شده در فاز فولیکولی / استروس در ترشح و تغییر پروتئین نقش داشتند (۱۶).

۲-۱-۲- فعالیت بیوسنتزی اویداکت

مطالعات متعددی در گوسفند، خوک، بز و گاو (۱۸،۱۷) نشان می دهد که اویداکت یک بافت فعال بیولوژیکی است که ماکرومولکول ها را سنتز و آزاد می کند. به نظر می رسد این فعالیت بیوسنتزی که معمولاً به عنوان ترکیب پیش سازهای نشاندار، به ماکرومولکول های سنتز شده و ترشحی تعریف می شود، مرتبط با وضعیت هورمونی حیوان باشد و میزان مستقیم فعالیت سنتزی اویداکت و برآورد غیر مستقیم پروتئین های آن باشد.

فعالیت بیوسنتزی اویداکت بیشتر تحت تاثیر استروژن است تا پروژسترون. فعالیت ترشحی مشاهده شده در اویداکت خوک (۱۹)، گوسفند (۲۰) و گاو (۲۱،۲۲،۲۳) در طی سیکل استروس و در انسان در میانه های سیکل بطور معنی داری بیشتر از دیگر روزهای سیکل است. بنابراین، این افزایش در فعالیت بیوسنتتیکی بازتاب فعالیت قطعات مختلف عملکردی معین در طی سیکل استروس و اوایل آبستنی است. تغییری در فعالیت ایستموس با توجه به تغییرات روزهای سیکل مشاهده نشده است. این اطلاعات یک ارتباط موقتی فعالیت بیوسنتتیکی بین افزایش پروتئینهای ترشحی با افزایش غلظت استروژن جریان پلازما را نشان می دهد.

در اینفاندیلوم و آمپولای خوک (۱۵) در زمان استروس در مقایسه با دیگر روزهای چرخه یا روزهای اول آبستنی سنتز و ترشح ماکرومولکول ها افزایش یافت. ولی سنتز در ایستموس هیچ تغییری نکرد. نتیجه می شود که یک گرادیانته در فعالیت سنتتیکی قطعات عملکردی به صورت ایستموس > اینفاندیلوم > امپولا مشاهده می شود. مطالعات مشابه در گوسفند نشان داده که فعالیت بیوسنتزی

توسط آمپولا در تیمار با استروژن نسبت به تیمار با دیگر هورمونها بیشتر از ایستموس است. این مطالعات نشان می دهد که بیوسنتز ماکروملکولهای ترشحي توسط اويدوكت در اثر استروژن افزايش مي يابد. بنابراین به نظر می رسد تنظيم فعاليت سنتتیک بیشتر در قسمت های عملکردی آمپولا و ایستموس یعنی مکانهای گرفتن تخمک، لقاح و تسهیم اولیه جنین باشد. این نتایج پیشنهاد می کند که بیان متفاوتی از پروتئینها بین سه قسمت عملکردی بطور بالقوه ای مرتبط با عملکرد انفرادیشان است.

۲-۱-۲-۱- پروتئین های مایع مجرا

غلظت، محتوی و کل پروتئین مایع مجرای اويدكتی در سیستم های پستاندار با استفاده از تکنیک های مختلفی اندازه گیری شده است. به طور کلی غلظت پروتئین در میانه سیکل خیلی کم است و در باقیمانده سیکل قاعدگی در انسان افزایش می یابد. با این وجود در خوک و خرگوش غلظت پروتئین در طی سیکل استروس بدون تغییر باقی می ماند. در اوایل آبستنی در خوک کل پروتئین مایع اويدوكتی بطور معنی داری در روزهای استروس، قبل از تخمک گذاری، در زمان تخمک گذاری و لقاح در مقایسه با دیگر روزها بیشتر است و این نشان دهنده تفاوت های سیکلی در کل پروتئین است.

آنالیز SDS-PAGE یک بعدی و دو بعدی پروتئین های نشات گرفته از مایع اويداكتی یک الگوی پروتئینی را نشان و نشان دهنده این است که بیشتر از صدها پروتئین موجود در مایع اويداكت خوک از سرم نشات گرفته اند. اخیراً یک پروتئین شبیه هاپلوگلوبولین در مایع اويداكتی گاو شناخته شده است. ممانعت کننده ها و آنزیم های متعددی که بعضی از سرم و برخی دیگر از ترشحات ویژه ای نشات می گیرند در مایع اويداكتی چندین گونه شناخته شده است. با انجام آزمایشات بیشتر، پروتئین های غیر سرمی بعضی از آنهايي که منحصر به

اویداکت هستند را می توان با جداسازی Electrophoretic مشاهده شوند. گلیکوپروتئین های اویدوکتی وابسته به استروژن خوک (POSP-E1-3) در اوایل سیکل استروس و در طی دوره افزایش استروژن، افزایش تولید مایع وکل محتوی پروتئین افزایش یافته مشاهده می شوند.

۲-۲-۱-۲- پروتئین های مشتق شده از اویدوکت

اغلب پروتئین های سنتز شده *denovo* توسط اویداکت خوک شامل بیشتر گلیکو پروتئین های ترشحی اویدوکتی (OSP) یک خانواده از پروتئین ها که نشان داده شده وابسته به استروژن و مخصوص اویداکت هستند، می باشد که به شکل (POSP-E1-3) هستند. چهار پروتئین سنتز و ترشح شده توسط اویدوکت خوک بشکل C3b مکمل، ایمنوگلوبولین A، پری پروکلژن و کلاستین تعیین شده اند و دیگر پروتئین های سنتز شده شامل فاکتورهای رشد، سیتوکین ها و پروتئین های انتقال هستند.

۳-۱-۲-۱-۳- گلیکوپروتئین های ترشحی اویداکتی وابسته به استروژن

مولکولهایی هستند که به طور نسبی وزن مولکولی بالایی دارند و دامنه ای از ۷۰ تا ۱۳۰ کیلو دالتون دارند و در این بین همستر یک استثناء بوده که مولکولهای آن بالاتر از ۱۶۰ کیلو دالتون وزن دارند. این مولکولهای OSP تحت شرایط هورمونی سنتز و ترشح می شوند. نشان داده شده است که OSP ها به طور موقتی با افزایش سطوح استروژن در زمان چرخه استروس و آبستنی در خوک، گاو، گوسفند، میمون ارتباط دارند. به نظر می رسد حضور این گلیکوپروتئین ها در زمان تخمک گذاری، لقاح و نمو اولیه جنینی هنگامی که جنین در مراحل اولیه کلیواژ است بیشترین مقدار است و زمانی که پروژسترون افزایش می یابد کاهش می یابد. در همستر تازه متولد شده تیمار با استروژن OSP ها را افزایش داد در حالیکه اثری برای پروژسترون مشاهده نشد. بنابراین وابستگی این پروتئینها به استروژن در طی سیکل استروس و قاعدگی و یا اوایل آبستنی محکمتر است. بیان ناحیه ای OSP ها ممکن

است مرتبط با عملکرد قطعات اویدوکتی ویژه ی سنتز کننده این پروتئین ها باشد. OSP ها به طور اولیه توسط اینفاندیلوم و آمپولا در خوک، در آمپولای همستر و آمپولا و اینفاندیلوم گوسفند و موش بیان می شوند. در حالی که سطوح پایین OSP ها توسط ایستموس در خوک تولید می شود و در میمون، موش، خوک و گوسفند OSP ها سنتز نمی شوند. گاو OSP ها را توسط آمپولا هم سنتز و هم ترشح می کند.

۲-۱-۳-۱ - ممانعت کننده های پروتئاز

TIMP-1

پروتئین عمده دیگری که توسط اویداکت در کشت explant سنتز و آزاد می شود، به عنوان TIMP-1 شناسایی شد (۲۴). TIMP ها ممانعت کننده های مخصوص متالوپروتئینازهای ماتریکس از جمله کلاژنازها، استروملیسین ها (۲۵) و ژلاتینازها هستند. TIMP-1 همچنین به عنوان تنظیم کننده چند عمل سلولی در انواع مختلف سلول ها شناسایی شده است (۵). این اعمال دربرگیرنده تحریک رشد (۲۶،۲۷)، نمو جنینی (۲۹) و همچنین نقشی در نگهداری و نوسازی ماتریکس خارج سلولی (۳۰) می باشد. با این وجود درباره بیان TIMP-1 در اویداکت در زمان چرخه فحلی یا قاعدگی و اوایل آبستنی اطلاعات کمی وجود دارد (۱۹). TIMP-1 به عنوان تنظیم کننده نوسازی بافت، تولید استروژن یا نمایشگر رشد در تخمدان توصیف می شود (۳۱). مطالعات روی اندومتريوم رحمی نقشی برای نگهداری و تنظیم لانه گزینی و تشکیل جفت در موش و گوسفند پیشنهاد می کنند (۳۲،۲۵). به علاوه در انسان، TIMP ها در تنظیم یکپارچه شدن اندومتريوم هنگام نوسازی شدید اندومتريوم در زمان چرخه قاعدگی، نقش دارند (۳۲). تحقیق اولیه ای روی اویداکت گاو نشان داد که TIMP-1 در این بافت تولید می شود و همچنین ممکن است باعث افزایش رشد جنینی در محیط

آزمایشگاه شود (۳۳). اما آزمایش دیگری نشان داد که TIMP-1 نقشی در رشد جنین ندارد (۳۴). اگرچه نقش TIMP-1 در اوبدکت، روی گامت ها و جنین نامعلوم است اما مطالعه ای (۳۵،۲۷) نشان داد که حضور TIMP-1 در زمان بلوغ اووسیت های خوک در محیط آزمایشگاهی، قابلیت اووسیت ها برای رسیدن به مرحله بلاستوسیست را افزایش داد ولی هیچ اثری بر لقاح ذکر نشد. TIMP-1 ممکن است برای اووسیت ها جهت رسیدن به حداکثر توانایی برای نمو اولیه جنینی لازم باشند. بنابراین نقش های بالقوه TIMP-1 در اوبدکت عبارتند از: بهبود نرخ کلیواژ جنینی، به تاخیر انداختن هچینگ و جلوگیری از تخریب جنین، تحریک نمو و تنظیم نوسازی ماتریکس خارج سلولی در اوبدکت و جنین (۵).

PAI-1

این ممانعت کننده پروتئاز عضوی از خانواده سرپین از ممانعت کننده های پروتئاز سرین بوده و از ممانعت کننده های اولیه فعال کننده پلاسمینوژن یوروکیناز (uPA) و فعال کننده پلاسمینوژن tissue- است (۵). این ممانعت کننده پروتئاز خارج سلولی در کنترل فعالیت هایی از قبیل نوسازی ماتریکس خارج سلولی، فیبرینولایسیس^۱، مهاجرت سلولی و جابجایی تومور نقش دارد (۳۶). عمل دیگر PAI-1 تنظیم فعالیت متالوپروتئینازهای پروماتریکس است که قسمتی از واکنش های پی در پی اطراف سلول است که منجر به تخریب ماتریکس خارج سلولی می شود (۳۷).

همانند TIMP-1، اطلاعات کمی درباره PAI-1 و نقش آن در ریز محیط اوبدکت وجود دارد (۵). در اوبدکت گاو بیان mRNA PAI-1 بیان کم و ثابتی داشت و وابسته به چرخه نبود (۳۸،۳۹،۴۰). در اوبدکت خوک، سنتز پروتئین PAI-1 در تمام قسمت های اوبدکت: اینفاندیبولوم، آمپولا و ایستموس تشخیص داده شد.

1- fibrinolysis

بررسی بیان پروتئین PAI-1 در خوک تازه آبستن، پیشنهاد می کند PAI-1 به طور موقت وابسته به تغییرات هورمونی محیط بوده و پس از استروس افزایش می یابد (۴۱). تست ELISA برای اندازه گیری سطوح پروتئین PAI-1 در مایع اویداکتی نشان داد که حداکثر مقدار PAI-1 در روز دوم پس از آبستنی دیده می شود و سپس تا روز دوازده کاهش می یابد. علاوه براین مطالعاتی روی خوک های تخمدان برداری شده که با روش جایگزینی هورمون^۱ تیمار شدند، نشان داد که استروژن مانع بیان پروتئین PAI-1 می شود اما اضافه نمودن پروژسترون این ممانعت را از بین می برد. بنابراین سطوح پروتئین PAI-1 در مایع اویداکتی به نظر می رسد با ساخت پروتئین PAI-1 همبستگی داشته باشد (42,43,44).

مطالعات میکروسکوپی الکترونی immunogold، ارتباط PAI-1 با اپیتلیوم اویداکت، اووسیت ها و جنین های مراحل اولیه کلیواژ را اثبات نمود (۴۵). PAI-1 در تمام اویداکت مکان یابی شد و می توان دریافت که هم در سلول های مزه دار و هم در سلول های غیر مزه دار مرتبط با قسمتی از غشا است که به سمت حفره اویداکت قرار دارد. مکان یابی پروتئین PAI-1 در اووسیت ها و جنین های اولیه خوک نشان داد که PAI-1 مرتبط با لایه بیرونی زونا پلوسیدای اووسیت ها و تمام زونا پلوسیداز جنین های ۲ تا ۴ سلولی و ۸ تا ۱۶ سلولی است (۴۶،۴۷).

فعال کننده ها و ممانعت کننده های پلاسمینوژن در تخمدان (۴۸،۴۹) هنگام لانه گزینی (۵۰،۴۰،۵۱،۵۲،۵۳) و شکل گیری جنین (۳۶) به خوبی شناخته شده اند اما در اویداکت چنین کاری انجام نشده است. چون ریز محیط اویداکت دارای پروتئین های فعال مثل uPA و متالوپروتئینازها هستند، فعالیت های پروتئولیتیک مرتبط با جنین در حال نمو و خود اویداکت احتمالاً نیاز به تنظیم دقیق با ممانعت کننده های انتخابی مثل PAI-1 دارند (۵).

بنابراین PAI-1 ممکن است در حفظ زوناپلوسیدا، بلاستومر و بافت اویداکتی نقش داشته باشد (۵۴،۵۵).

۲-۱-۴- پروتئین های دیگر

نشان داده شده است ۴ پروتئین دیگر: C3b مکمل، زنجیره سنگین ایمونوگلوبین A، ناحیه کربوکسی انتهایی پروپوکلاژن^۱ (۴۳) و کلاسترین^۲ (۴۴،۴۵،۴۶،۴۷،۴۸،۴۹) که توسط مطالعات الکترونیک مشخص شده اند نیز توسط بافت اویداکت جدا شده، سنتز شده و به محیط کشت آزاد می شود (۶۰،۶۱،۶۲). ۲ پروتئین ایمونوگلوبین A (زنجیره های سبک و سنگین) و کلاسترین همچنین به عنوان اجزای مایع اویداکتی از حیوانات فحل شناسایی شده اند. به نظر می رسد این پروتئین ها شبیه OSP، TIMP-1 و PAI-1 در خوک به طور متفاوتی در بخش های مختلف بافت اویداکت بیان می شوند. به نظر می رسد C3b مکمل و ایمونوگلوبین A عمدتاً توسط بافت اینفاندیبولوم و به میزان کمتر در آمپولا سنتز می شود. ساخت این پروتئین ها در ایستموس به روش الکتروفورز مشاهده نشد. از طرف دیگر کلاسترین توسط همه بخش های اویداکت ساخته می شود اما به مقدار قابل ملاحظه ای در اینفاندیبولوم و آمپولا نسبت به ایستموس بیشتر ساخته می شود. به نظر نمی رسد کربوکسی انتهایی پروپوکلاژن که ممکن است یک محصول عمل آوری ساخت ماتریکس خارج سلولی است، در ۳ قسمت اویداکت متفاوت باشد (۶۳،۶۴،۶۵).

^۱ - propocollagen
^۲ - clusterin

پروتئین متصل به رتینول که کار انتقال رتینول را انجام می‌دهد، به عنوان جزء فرعی محیط کشت بهینه شده با اویداکت در کشت بافت گاو، گوسفند و خوک مشاهده شد (۶۶). علاوه بر این حضور mRNA پروتئین متصل به رتینول در اویداکت خوک در زمان استروس مشاهده شد (۶۷،۶۸،۶۹).

۲-۱-۴-۱- فاکتورهای رشد پپتیدی

شواهد بسیاری وجود دارد مبنی بر اینکه تعداد زیادی فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها در مایع اویداکتی حضور دارند. واضح است که در بسیاری از گونه‌ها گامت‌ها و جنین‌های اوایل مرحله کلیواژ در ریز محیط اویداکت مستقر می‌شوند و در معرض فاکتورهای تنظیمی و محرک رشد زیادی قرار می‌گیرند. این فاکتورها ممکن است به طور بالقوه به روش اتوکترین یا پاراکترین عمل اویداکت (۷۰،۷۱،۷۲) و یا رشد نمو جنین (۷۳،۷۴) را تنظیم یا تعدیل نمایند.

منشاء فاکتورهای رشد پپتیدی در اویداکت پستانداران به احتمال زیاد سنتز این مواد توسط اپیتلیوم ترش‌حی اویداکت و نیز ترشحات سرم است. مطالعات زیادی فاکتورهای رشد پپتیدی را در اویداکت خوک هنگام تخمک‌گذاری، لقاح و رشد اولیه جنین در مرحله کلیواژ شناسایی کرده‌اند (۷۵). فاکتور رشد اپیدرمی EGF، فاکتور رشد ترانسفورم کننده آلفا ($TGF-\alpha$) و فاکتور رشد شبه انسولین I ($IGF-I$) در خوک جفتگیری کرده و خوک تازه آبستن، روزهای صفر تا دوازده توسط روش radioimmunoassay اندازه‌گیری شد. غلظت $TGF-\alpha$ در روز صفر به طور معنی‌داری نسبت به روزهای دیگر بارداری بیشتر بود در حالیکه غلظت $IGF-I$ در روزهای صفر و دو نسبت به روزهای دیگر بارداری بیشتر بود (۷۶،۷۷،۷۸،۷۹). غلظت EGF در طول این زمان تغییری نداشت. حضور پروتئین‌های ۱ تا ۴ باند شونده به IGF که محلشان در اویداکت در زمان بارداری مکان یابی شد ممکن است

اشاره به این مطلب داشته باشند که این پروتئین‌ها فعالیت IGF را در اویداکت تعدیل می‌نمایند (۸۰، ۸۱).

به طور خلاصه بیان اینکه چه فاکتورهای رشدی و در چه مرحله یا مراحل برای اویداکت ونمو جنین پیش از لانه‌گزینی مهم هستند، مشکل است (۵). اطلاعات محدودی پیشنهاد می‌کنند احتمالاً بعضی فاکتورهای رشد (فاکتور رشد محرک کلنی - ۱، IGF، فاکتور رشد فیبروبلاست، $TGF-\alpha$ و EGF) کلیواژ و رشد جنینی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۸۲). حضور این فاکتورهای رشد ممکن است رشد بیشتر جنین‌ها در محیط آزمایشگاهی، وقتی در حضور سلول‌ها یا بافت‌های اویداکتی کشت می‌شوند را توضیح دهد (۸۳، ۸۴).

۲-۲- کشت سلول

در شروع قرن بیستم هریسون و کارل برای اولین بار از کشت بافت برای مطالعه رفتار سلول‌ها در شرایط خارج از بدن حیوان استفاده کردند. در ابتدای ظهور این روش از کشت قطعات بافتی و مهاجرت سلول‌های آنها به سمت خارج از بافت استفاده می‌شد، به این دلیل در آن زمان به این تکنیک کشت بافت گفته می‌شد (۸۵، ۸۶). کشت سلول به این طریق به مدت ۵۰ سال ادامه یافت (۷۷). اندرز و همکاران با استفاده از سلول‌های جدا شده نشان دادند ویروس بیماری فلج اطفال را می‌توان در شرایط آزمایشگاهی و در غیاب بافت عصبی رشد داد. پیشرفت‌های دیگر در تکنولوژی کشت از جمله استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، بهبود محیط‌های کشت و موجب شده است امروزه کشت سلول در بسیاری از آزمایشگاه‌ها به امری عادی تبدیل شود.

۲-۲-۱- تفاوت محیط کشت آزمایشگاهی با شرایط بدن جاندار

یکی از مهمترین تغییرات برای سلول‌های کشت شده انتقال از یک محیط سه بعدی به یک محیط دو بعدی است که موجب تفاوت های رفتاری بسیاری با سلول‌های کشت نشده دارد (۸۷، ۸۸، ۸۹). در محیط کشت آزمایشگاهی ارتباطات سلول-سلول و سلول-ماتریکس سلولی کاهش می یابد، سلول‌ها پهن و دارای حرکت می شوند و در بسیاری از موارد تکثیر می یابند. در این شرایط سلول‌هایی با قدرت تکثیر کم و یا سلول‌های بدون قدرت تکثیر به تدریج پس از چند نسل از بین می روند و ممکن است در یک لاین سلولی تنها ۲ نوع سلول یافت شود (۹۰).

محیط کشت آزمایشگاهی همچنین فاقد چندین جزء سیستمیک درگیر در تنظیم هوموستاتیک بدن و به خصوص اجزای سیستم های درون ریز و عصبی هستند. در نبود این اجزاء متابولیسم با ثبات تر می‌شود اما نمی تواند نماینده خوبی برای بافت منشا باشد. به این دلیل اضافه نمودن برخی هورمون‌ها به محیط کشت سلول مفید است (۹۱).

متابولیسم انرژی در محیط آزمایشگاه عمدتاً توسط چرخه گلیکولیز انجام می‌شود، اگرچه چرخه اسید سیتریک نیز نقش کوچکی در متابولیسم انرژی این سلول‌ها دارد (۹۲، ۹۳، ۹۴).

۲-۲-۲- انواع سیستم های کشت

با توجه به نوع سلول‌ها ۲ نوع کشت سلول وجود دارد. در سیستم کشت تک لایه، سلول‌ها ابتدا باید به سطحی چسبیده و سپس رشد و تکثیر یابند. این سلول‌ها، سلول‌های وابسته به بستر نامیده می شوند. بیشتر سلول‌های عادی به جز سلول‌های عادی از این نوع هستند.