ارزیابی تکوین جنین های قبل از لانه‌گزینی موش نژاد NMRI در محیط های کشت مختلف

عبدالحسین شاهوردی .M.Sc[1]، منصوره موحدین .Ph.D[1*]، مجتبی رضازاده ولوجردی .Ph.D[2,1]، سعید کاظمی آشتیانی .Ph.D[2]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
۲. پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح
پست الکترونیک: Email: movahedm@hotmail.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۳/۵، پذیرش مقاله: ۸۵/۱۰/۹

هدف: تعیین محیط کشت مناسب برای تکوین موش نژاد NMRI

مواد و روش‌ها: تکوین جنین‌های مرحله پیش‌هسته موش نژاد NMRI به دنبال هورمون درمانی با گنادوتروپین حاصل از مادیان (PMSG) و گنادوتروپین کوریونی (HCG) به مدت ۵ روز در محیط‌های کشت T_6، KSOM، CZB، M_{16} و محیط‌های متوالی $G\text{-}1^{TM}$ ver3 و $G\text{-}2^{TM}$ ver3 بررسی شد.

یافته‌ها: نرخ تشکیل جنین ۲۴ ساعت پس از لقاح در گروه‌های آزمایشی T_6، KSOM ، CZB، M_{16} و محیط‌های متوالی $G\text{-}1^{TM}$ ver3 و $G\text{-}2^{TM}$ ver3 به ترتیب ۸۳/۵، ۹۷/۴، ۱۰۰، ۹۰/۵ و ۹۰/۹ درصد بود که بالاترین تعداد در گروه CZB و سپس KSOM مشاهده شد و نسبت به گروه‌های T_6 ,M_{16} و محیط‌های متوالی $G\text{-}1^{TM}$ ver3 و $G\text{-}2^{TM}$ ver3 اختلاف معنی‌داری نشان دادند. در گروه CZB ۹۶/۳ درصد جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیدند که نسبت به سایر گروه‌ها بالاترین درصد بود و اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر نشان داد. میزان تشکیل بلاستوسیست در گروه‌های T_6، M_{16}، KSOM و محیط‌های متوالی $G\text{-}1^{TM}$ ver3 و $G\text{-}2^{TM}$ ver3 به ترتیب ۸۰/۲ درصد، ۸۲/۱ درصد، ۷۷/۶ درصد و ۸۷/۵ درصد بود. بالاترین میزان بلاستوسیست در حال خروج از زونا‌پلوسیدا در گروه محیط‌های متوالی $G\text{-}1^{TM}$ ver3 و $G\text{-}2^{TM}$ ver3 (۷۶/۱ درصد) و پس از آن در گروه KSOM (۶۶/۴ درصد) و کمترین آن گروه M_{16} (۶۰/۳ درصد) دیده شده است. همچنین میزان جنین‌های دژنره شده ۵ روز پس از کشت در گروه محیط‌های متوالی $G\text{-}1^{TM}$ ver3 و $G\text{-}2^{TM}$ ver3 کمترین میزان در مقایسه با سایر گروه نشان می‌دهد که اختلاف آن با گروه T_6 (۵۱/۶ درصد) معنی‌دار است ($p<0/01$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد محیط‌های کشت، KSOM، CZB و محیط‌های متوالی $G\text{-}1^{TM}$ ver3 و $G\text{-}2^{TM}$ ver3 محیط‌های مناسبی برای تکوین جنین‌های پیش از لانه‌گزینی موش نژاد NMRI هستند. به نظر می‌رسد تفاوت تکوین جنین‌های موش در محیط‌های مختلف ناشی از تفاوت غلظت ترکیبات و مکمل‌های محیط (آمینواسیدها) باشد.

کلیدواژگان: جنین موش، تکوین ، کشت جنین

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۵، صفحات ۲۳۷-۲۳۲

مقدمه

سیستم‌های کشت آزمایشگاهی در تکوین جنین از نظر درمان ناباروری و مطالعات پایه به منظور شناخت مکانیسم‌های تکوین جنین از اهمیت بسزایی برخوردار است. جهت تحقق این ایده، محیط های کشت مختلفی طراحی شده است. اولین تلاش‌ها برای کشت جنین‌های پیش از لانه گزینی به اواسط دهه ۱۹۵۰ برمی‌گردد. در این تلاش، دسترسی به جنین‌های هشت سلولی موشی با استفاده از محلول کربس-رینگر-بی‌کربنات به همراه گلوکز و سرم جنین گاوی محقق گردید (۱، ۲). به دنبال آن مشاهده شده کاهش غلظت کلسیم از ۲/۵ میلی‌متر به ۱/۷ میلی‌متر و تغییر اسمولاریته، PH، اسیدهای آمینه و یا منابع انرژی نظیر افزودن لاکتات، لپتین، گلیسی-ال گلوتامین و یا پیروات، بقا و تکوین جنین‌های موشی را بهبود می‌دهد (۹-۳).

این مطالعات منجر به طراحی محیط کشت (Brinster Medium for Ovum Culture: BMOC) برای کشت تخمک شد (۴). محیط‌های کشت دیگری بر اساس BMOC طراحی و ارائه شده است که می‌توان به محیط کشت تغییر یافته Witten و محیط M_{16} که هنوز هم به طور وسیعی استفاده می‌شود اشاره کرد (۱۰). نوع دیگری از محیط M_{16} که به جای قسمتی از بافر بی‌کربنات، بافر HEPES برای نگهداری دقیق pH جایگزین شده است بعدا برای جمع‌آوری جنین‌ها و آزمایش‌هایی از قبیل میکرواینجکشن که جنین‌ها برای دوره طولانی مدت در خارج از انکوباتور برای دست‌کاری قرار می‌گیرد استفاده شد. تکوین جنین موش در آزمایشگاه تا مرحله بلاستوسیست در محیط‌های کشت جنینی مرسوم از قبیل M_{16} فقط محدود به نژادهای هم‌خون موش از قبیل C_3H و هیبرهای $C57BL/10J\times SJL,B_6D_2F_1(B_6AF_1)F_1$ است (۱۱).

از سیستم‌های کشت دیگری نظیر کشت هم‌زمان جنین با سلول‌های حاصل از دستگاه تولید مثل و یا رده‌های سلولی دیگر نیز استفاده شده است (۱۲، ۱۳). ولی سیستم‌های کشت همزمان به دلیل وقت‌گیر بودن و هزینه بالا چندان مقرون به صرفه نیست . از سوی دیگر اخیرا استفاده از محیط‌های کشت متوالی نیز برای حصول تکوین بیشتر مطرح شده است

(۱۴). در تمام مطالعات انجام شده در نظر گرفتن نکاتی چند در کشت

جنین موش به عنوان مدلی در تحقیقات جنین پستانداران ضروری است. ساده بودن محیط و در عین سادگی عملکرد مطلوب با هزینه کم و قابلیت رشد بالای جنین از جمله این نکات است. محیط کشت بسته به نژاد موش متفاوت است و دستیابی به محیطی مناسب برای هر نژاد ضروری به نظر می‌رسد (۱۵). برای مثال افزودن اتیلن‌دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) سبب افزایش رشد بلاستوسیست‌های موش نژاد ICF و C57BL/6 می‌گردد. اما در نژاد BALB/C اثر کمتری دارد (۱۶) و بر نژادهای دیگر نظیر ddy، Thy 1، AKRIN اثر ندارد و بر نژاد DW/a موثر است (۱۷). همچنین در بعضی نژادهای موش هم‌خون (inbried) و ناهم‌خون (Outbried) جنین در مرحله دو سلولی در محیط آزمایشگاهی متوقف می‌شود (۱۸).

نتایج کسب شده در مطالعه پنووک و همکاران نیز نشان داده است هنگامی که ترکیبی از فاکتورهای رشد [(Fibroblast Growth Factor: FGF4)، (TGF آلفا :Transforming Growth Factor) و TGF بتا] در محیط کشت اضافه می‌شود؛ تاثیر چشمگیر و معنی‌داری در رشد جنین‌های C57BL/6 دارد (۱۹).

با توجه به ترکیب مواد مختلف در محیط‌های کشت ارائه شده رایج و آثار ممانعت کنندگی و یا پیش‌برنده این مواد در تکوین، مطالعه بیشتر اثر محیط‌های کشت مختلف بر هر نژاد در هر آزمایشگاه ضروری می‌نماید. بنابراین در این مطالعه روند تکوین جنین‌های حاصل از کشت آزمایشگاهی موش ناهم‌خون نژاد NMRI در محیط‌های کشت T_6، KSOM، CZB، M_{16} و محیط‌های متوالی G-1^{TM}ver3 و G-2^{TM}ver3 ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

موش‌های نر و ماده نژاد NMRI (تهیه شده از انیستیتوپاستور ایران) در شرایط ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. موش‌های ماده با تزریق درون صفاقی ۷/۵ IU (Pregnancy Mares Serum Gonadotropin: PMSG) در ساعت ۱۳ تحریک تخمک‌گذاری و پس از ۴۸ ساعت به آنها ۷/۵IU (Human Chorionic Gonadotropin: HCG) تزریق و همزمان با موش نر کوپل شد. ۲۰ ساعت بعد پلاک واژینال چک شد و موش‌های با پلاک واژینال مثبت ۳۰ ساعت پس از تزریق HCG به روش قطع نخاع کشته و اویداکت آنها به صورت استریل (حتی‌المقدور) خارج شد. پس از فلاش، جنین‌های مرحله پرونوکلئوس (2PN) به محیط‌های تکوین که از قبل آماده و پیش از قطره‌گذاری با میزان مناسب سرم (طبق جدول یک) آمیخته بودند، منتقل شد (۲۰).

تهیه محیط کشت

طبق جدول یک محیط‌های کشت مورد نظر ساخته شده (محیط‌های متوالی G-1^{TM}ver3 و G-2^{TM}ver3 از شرکت Vitrolife، Sweden تهیه شد و به میزان ۱۰ درصد rHA مربوط به همان شرکت به آن افزوده شد) و با عبور از صافی ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند. تمام محیط‌های مزبور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و حداکثر به مدت یک هفته نگهداری شدند (۲۱).

بررسی و تکوین جنین

در هر مرحله از آزمایش حدود ۸ تا ۱۰ جنین دارای پیش‌هسته (2PN) به قطرات ۲۰ میکرولیتری محیط‌های کشت T_6، KSOM، CZB، M_{16} منتقل شدند و پس از انتقال به انکوباتور به مدت پنج روز کشت داده شدند. در گروه پنجم، جنین‌ها ابتدا به مدت ۴۸ ساعت در محیط G-1^{TM}ver3 و سپس به مدت ۷۲ ساعت در محیط G-2^{TM}ver3 کشت داده شدند. وضعیت جنین‌ها تا رسیدن به مرحله بلاستوسیست توسط میکروسکوپ معکوس بررسی و ثبت شد.

روش آماری

نتایج حاصل با آزمون آماری χ^2 و تست دقیق فیشر برای مقایسه ارتباط گروه‌ها بررسی شد. تکرار آزمایش در گروه‌ها ده بار صورت گرفت.

طرح تحقیقاتی از نظر اخلاق پزشکی در کمیته اخلاق پژوهشکده رویان مطرح و مورد تایید قرار گرفت.

یافته‌ها

در این مطالعه مجموعا ۴۵۹ جنین در مرحله پرونوکلئوس (2PN) از اویداکت موش‌های سوری نژاد NMRI فلاش شدند و به طور تصادفی در پنج گروه آزمایشی T_6، CZB، M_{16} و KSOM و محیط‌های متوالی G2، G1 قرا رگرفتند که به ترتیب به هر گروه تعداد ۹۱، ۱۱۶، ۸۰، ۸۴ و ۸۸ جنین تعلق یافت و سپس مراحل تکوین جنین‌ها در هر گروه طی ۲۴ ساعت و به مدت پنج روز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول دو قابل مقایسه است.

به طور کلی از ۹۱ جنینی که در محیط T_6 کشت داده شدند ۸۳/۵ درصد آنها پس از ۲۴ ساعت به مرحله دو سلولی رسید که از این تعداد در روز چهارم ۸۰/۲ درصد به مرحله بلاستوسیست و ۴۸/۸ درصد در روز پنجم به مرحله بلاستوسیست در حال خروج از زونا رسیدند.

از ۱۱۶ جنینی که در محیط KSOM کشت داده شدند تعداد ۱۱۳ جنین (۹۷/۴ درصد) پس از ۲۴ ساعت به مرحله دوسلولی رسیدند و در نهایت ۷۷/۶ درصد و ۶۶/۴ درصد آنها به ترتیب در روزهای چهارم و پنجم به مرحله بلاستوسیست و بلاستوسیست در حال خروج از زونا رسیدند.

۱۰۰ درصد جنین‌های 2PN که در محیط CZB کشت داده شدند پس از ۲۴ ساعت به مرحله دوسلولی رسیدند و از این تعداد در روز چهارم ۹۶/۳ درصد آنها به مرحله بلاستوسیست و ۶۰/۳ درصد آنها به مرحله خروج از زونا رسیدند.

از ۸۴ جنینی که در محیط M_{16} کشت داده شدند ۹۰/۵ درصد آنها پس از ۲۴ ساعت به مرحله دو سلولی رسیدند و در نهایت ۸۲/۱ و ۴۵/۲ درصد آنها به ترتیب در روزهای چهارم و پنجم به مرحله بلاستوسیست و بلاستوسیست در حال خروج از زونا رسیدند.

جدول ۱: ترکیبات محیط‌های کشت متفاوت براساس mM (میلی مولار) (۲۱)

	M_{16} a	CZB a	KSOM b	T_6 a
Nacl	۹۴/۶۲	۸۱/۶۲	۹۵	۸۰/۷۷
KCL	۴/۷۸	۴/۸۳	۲/۵	۱/۴۸
KH_2PO_4	۱/۱۹	۱/۱۸	۰/۳۵	–
$MgCL_2$	–	–	–	۰/۴۹
$MgSO_4, 7H_2O$	۱/۱۹	۱/۱۸	۰/۲	–
$Cacl_2, 2H_2O$	۱/۷۱	۱/۷۱	۱/۷۱	۱/۷۷
$NaHCO_3$	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵
Na-lactate	۲۳/۲۸	۳۱/۳۰	۱۰	۲۳/۲۹
Na pyryvate	۰/۳۳	۰/۲۷	۰/۲۰	۰/۲۷
Glucose	۵/۵۶	۵/۵۶	۰/۲	۵/۵
Glutamine	–	۱	۱	–
EDTA	–	۰/۱۱	۰/۰۱	۰/۰۲
$NaH_2PO_4, 2H_2O$	–	–	–	۰/۴
BSA*	۴	۵	۱	۴

* مقادیر به صورت میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.
کلیه محیط‌های جدول حاوی۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین G و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر استرپتومایسین هستند.
a: حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر فنل رد (Phenol Red) هستند.
b:حاوی ۰/۵X MEM اسیدآمینه‌های غیرضروری (MEM NEAA) و حاوی ۰/۵X MEM اسیدآمینه‌های ضروری (MEM EAA) است.

در نهایت از ۸۸ جنینی که در محیط متوالی G2، G1 کشت شدند حدود ۹۰/۹ درصد آنها به مرحله دوسلولی و ۸۷/۵ و ۷۶/۱ درصد آنها به ترتیب پس از ۴ و ۵ روز بعد از کشت به مرحله بلاستوسیست در حال خروج از زونا رسیدند.

در مقایسه تعداد جنین‌های 2PN که در محیط‌های CZB و KSOM به مرحله دو سلولی رسیده‌اند نسبت به سایر محیط‌ها اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهند.

همچنین در هیچ یک از محیط‌ها ۲۴ ساعت پس از کشت جنین دژنره در محیط‌های کشت دیده نشد.

در محیط KSOM بیشترین تعداد جنین‌ها (۷۳/۳ درصد) نسبت به سایر محیط‌ها به دنبال ۴۸ ساعت کشت به مرحله چهارسلولی رسیدند که اختلاف آن با گروه‌های T_6 ($p<0.01$)، CZB ($p<0.001$) و محیط‌های متوالی G2 و G1 ($p<0.01$) معنی‌دار است.

۷۲ ساعت پس از کشت در محیط‌های CZB کمترین تعداد جنین‌ها (۴۰ درصد) به مرحله چهارسلولی رسید که اختلاف آن با گروه‌های KSOM (۵۷/۸ درصد) معنی‌دار است.

هرچند در گروه T6(۵۰/۵ درصد) و در گروه G2 و G1 (۵۳/۴ درصد) نیز تعداد جنین‌هایی که به مرحله مورولا می‌رسند، زیاد است. ۹۶ ساعت پس از کشت ۹۶/۳ درصد جنین‌های گروه CZB به مرحله بلاستوسیست رسیدند که نسبت به سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد.

جدول ۲: مقایسه مراحل تکوین جنین‌های حاصل از کشت مرحله 2PN در گروه‌های مختلف آزمایشی

گروه‌های آزمایشی	2PN	۲۴ ساعت پس از لقاح	۴۸ ساعت پس از لقاح		۷۲ ساعت پس از لقاح		۹۶ ساعت پس از لقاح	۱۲۰ ساعت پس از لقاح
		2 Cell (%)	4-8 Cell (%)	M (%)	M (%)	B (%)	B (%)	H.B (%)
T_6	۹۱	۷۶ (۸۳/۵)	۴۲ (۴۶/۲)	۴۳ (۴۷/۳)	۴۶ (۵۰/۵)	۳۲ (۳۵/۲)	۷۳ (۸۰/۲)	۴۴ (۸۴/۴)
KSOM	۱۱۶	۱۱۳ (۹۷/۴) d e	۸۵ (۷۳/۳) a** c** e*	۱۸ a** (۱۵/۵) c** d* e**	۶۷ (۵۷/۸) c	۳۲ (۲۷/۶)	۹۰ (۷۷/۶)	۷۷ (۶۶/۴) a* d*
CZB	۸۰	۸۰ (۱۰۰) a** d* e*	۳۴ (۴۲/۵) d	۴۵ (۵۶/۳) d*	۳۲ (۴۰)	۴۸ (۶۰) a* b** d	۷۷ (۹۶/۳) a* b** e	۴۹ (۶۰/۳) d e
M_{16}	۸۴	۷۶ (۹۰/۵)	۵۲ (۶۱/۹) a	۲۷ (۳۲/۱)	۳۹ (۴۶/۴)	۳۶ (۴۲/۹) b	۶۹ (۸۲/۱)	۳۸ (۴۵/۲)
محیط‌های متوالی G-1™ver3 و G-2™ver3	۸۸	۸۰ (۹۰/۹)	۴۵ (۵۱/۱)	۴۰ (۴۵/۵)	۴۷ (۵۳/۴)	۴۱ (۴۶/۶) b*	۷۷ (۸۷/۵)	۶۷ (۷۶/۱)

M: Morulla, B: Blastocyst, H.B: Hatching blastocyst
a: Significant at 0.05 with T6 b: Significant at 0.05 with KSOM
c: Significant at 0.05 with CZB d: significant at 0.05 with M16
e: significant at 0.05 with G1, G2 (*p<0.01-**p<0.001)

از لحاظ میزان بلاستوسیست در حال خروج از زونا، محیط کشت G1 و G2 بیشترین تعداد جنین‌ها را به خود اختصاص می‌دهد (۷۶/۱ درصد) که از لحاظ آماری با گروه‌های T_6($p<0.001$)، CZB($p<0.001$) و M16($p<0.001$) اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد.

گروه KSOM نیز با گروه‌های T_6 و M_{16} اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد ($p<0.001$) . کمترین میزان جنین‌های در حال خروج از زونا در محیط کشت M_{16} دیده می‌شود (۴۵/۲ درصد) که با گروه‌های KSOM ($p<0.01$) و CZB($p<0.01$) و G1, G2($p<0.01$) اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد.

در روز پنجم کشت ۵۴/۸ درصد جنین‌ها در گروه M_{16} و ۲۳/۹ درصد در گروه G1,G2 دژنره شدند که به ترتیب بیشترین و کمترین میزان دژنره شدن جنین‌ها را به خود اختصاص می‌دهند و از لحاظ آماری بین گروه T_6 و KSOM اختلاف وجود دارد ($p<0.01$).

بحث

در این مطالعه تاثیر محیط‌های کشت ساده مختلف بر میزان تکوین جنین‌های موش نژاد NMRI مورد بررسی قرار گرفت.

مقایسه محیط‌های کشت مزبور پس از ۱۲۰ ساعت نشان داد که بهترین محیط کشت آزمایشگاهی به کار رفته برای تکوین جنین‌های موش تا مرحله دو سلولی و بلاستوسیست CZB است. هر چند جنین‌هایی که در محیط KSOM کشت داده شدند پتانسیل تکوینی خوبی را تا مرحله دو سلولی و در محیط‌های متوالی G-1^{TM}ver3 و G-2^{TM}ver3 پتانسیل خوبی تا مرحله بلاستوسیست در حال خروج از زونا نسبت به محیط‌های دیگر نشان دادند و میزان کمتری از جنین‌ها در محیط KSOM به مرحله بلاستوسیست رسیدند. از طرف دیگر، جنین‌های موش نژاد NMRI در محیط G1 به G2 به مرحله بلاستوسیست در حال خروج رسیدند.

به نظر می‌رسد تفاوت تکوین جنین‌های موش در محیط‌های مزبور ناشی از تفاوت غلظت ترکیبات آنها باشد. همان‌طورکه از جدول یک برمی‌آید اختلاف زیادی بین ترکیبات این محیط‌ها وجود دارد به گونه‌ای که غلظت موادی نظیر K^+، Cl^-، Mg^{2+} پیروات در آنها با هم تفاوت دارد. احتمالا رابطه مستقیمی بین میزان K^+ و Cl^- و تکوین نامناسب جنین‌ها وجود دارد (۲۲). میزان بالای Cl^- آنتی‌پورت Cl^-/HCO_3 موجود درجنین‌های دو سلولی را تغییر می‌دهد و این می‌تواند در کاهش pH موثر باشد (۲۳). از سوی دیگر K^+، Cl^- به صورت سینرژیسم عمل می‌کنند. به گونه‌ای که اگر Cl^- زیاد و K^+ کم باشد اثر مضری دیده نمی‌شود (۲۴، ۲۵).

همچنین ثابت شده گلوتامین برای تکوین جنین در طی ۴۸ ساعت اول کشت مفید است (۱۷) و این می‌تواند عاملی برای تکوین بهتر جنین‌ها در محیط‌های CZB و KSOM نسبت به محیط دیگر در مرحله دو سلولی باشد.

کیفیت اثر گلوتامین محیط کشت KSOM و CZB به غلظت NaCl موجود در محیط بستگی دارد. به طوری که وقتی غلظت NaCl محیط کم (۷۵ میلی‌متر) است گلوتامین از تکوین جنین‌های موش ممانعت می‌کند. در حالی که در غلظت‌های زیاد (۹۵ میلی‌متر)، گلوتامین برای تکوین جنین‌ها مفید است و در غلظت‌های دیگر ۸۵ میلی‌متر تاثیری بر تکوین جنین ندارد (۲۶).

همچنین در طی ۴۸ ساعت نخست کشت، گلوکز تاثیر مضری روی تکوین جنین‌های موش دارد (۲۲). و جنین‌ها پیروات را در طی مراحل اولیه تکوین به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند (۲۷). در حالی که گلوکز برای تشکیل بلاستوسیست‌ها مورد نیاز است (۲۸) و مهمترین سوبسترای انرژی در مرحله بلاستوسیست به حساب می‌آید (۲۷). تاثیر ممانعت کنندگی گلوکز بر تکوین جنین‌های موش در محیط‌های CZB (۲۲) و M_{16} (۲۵) گزارش شده است. ولی در این تحقیق تاثیر ممانعت کنندگی با توجه به ترکیب CZB و گونه موشی مورد استفاده (جدول یک) مشاهده نشد.

همچنین گزارش شده است که تکوین جنین دو سلولی موش به مرحله بلاستوسیست نیاز به آمینواسیدهای خارجی دارد (۱، ۲۹).

زمانی که محیط کشت با آمینواسیدهای مخصوص پشتیبانی شود تکوین جنین نژادهای مختلف موش بهبود می‌یابد (۱۱، ۳۰). جنین‌ها در مرحله اول کلیواژ نیاز به اسیدآمینه‌های غیرضروری (۳۱) و در مراحل آخر نیاز به اسیدآمینه‌های ضروری دارند (۳۲). اضافه کردن آمینواسیدها به محیط KSOM، بلاستوسیست را قادر به سنتز mRNA چندین پروتیین در سطح *in vivo* می‌کند (۳۳).

دو محیط پی‌درپی محیط‌های متوالی G-1^{TM}ver3 و G-2^{TM}ver3 برای کشت تخمک‌های انسان به مرحله بلاستوسیست به کار می‌رود (۳۴). همچنین امروزه برای کشت جنین‌های موش معمولی و همچنین جنین‌های به دست آمده از انتقال هسته سوماتیک نیز کاربرد دارند (۳۵، ۳۶). در این تحقیق محیط G1 تکوین را تا مرحله ۸ سلولی پشتیبانی کرد و با انتقال به محیط G2 بیشترین بلاستوسیست در حال خروج از زونا به دست آورده شد که در مقایسه با گروه‌های T_6, CZB, M_{16} معنی‌دار بود ($p<0.01$) و نتایج آن با یافته‌های کسب شده در انسان هم‌سو بود. به نظر می‌رسد تفاوت تکوین جنین‌های موش در محیط‌های مختلف ناشی از تفاوت غلظت ترکیبات و مکمل‌های محیط‌ها (آمینواسیدها) است.

نتایج این مطالعه به طور کلی نشان داد محیط کشت CZB محیطی مشابه بدن را برای تکوین جنین‌های موش نژاد NMRI تا مرحله دو سلولی ایجاد می‌کند و نتایج این بررسی با توجه به ترکیبات محیط CZB با مطالعات بینستر (۳)، مهتا (۳۰) و لن (۳۱) هم‌سو است. محیط‌های متوالی G-1^{TM}ver3 و G-2^{TM}ver3 نیز شرایط مناسبی برای خروج بلاستوسیت از زونا ایجاد می‌کنند. محیط‌های M_{16}، CZB و T_6 نیز از وضعیت مناسبی برخوردار بودند و نتایج آن با نتایج مطالعه بهاروند و رضازاده (۱۳، ۲۰، ۳۷) که تاثیر گلوکز و فسفات را بر تکوین جنین‌ها در سه محیط T_6 و CZB و M_{16} و همچنین نقش ماکرومولکول‌ها و اثر محیط‌های کشت همزمان بررسی کرده بودند هم‌سو بود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد محیط‌های کشت، KSOM، CZB و محیط‌های متوالی G-1^{TM}ver3 و G-2^{TM}ver3 محیط‌های مناسبی برای تکوین جنین‌های پیش از لانه‌گزینی موش نژاد NMRI هستند.

References

1. Bi-Ke ZHU, Simon K, Walker, Simon Maddocks. Optimization of in vitro culture conditions in B6CBF1 mouse embryos. Reprod Nature Dev 2004; 44: 219-231
2. Pool TB. An update on embryo culture for human assisted reproductive technology: media, performance, and safety, Semin Reprod Med, 2005; 23(4): 309-318
3. Brinster RL. Lactate dehydrogenase activity in the preimplanted mouse embryo. Biochim. Biophys. Acta 1965; 110: 439-441
4. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy souree. J. Exp. Zool 1965; 158: 59-68
5. Booth PJ, Humpherson PG, Watson TJ, Leese HJ. Amino acid depletion and appearance during porcine preimplantation embryo development in vitro, Reprod, 2005; 130(5): 655-668
6. Deng X, Wang S, Huang WJ, Liu QZ, Xie WB, Zhang QL, Fang WY, Liu TF, Han C, Du SS, Wu LS, Ding YQ, Yao KT. Effects of different concentrations of amino acids in the culture medium on preimplantation mouse embryo development in vitro, Di Yi Jun Yi Da Xue Bao, 2005; 25(3): 241-245
7. Chen Q, Li SW, Tang HF, Zhang JH, Yin HL. Effects of leptin on development of mouse preimplantation embryos in vitro, Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban, 2004; 35(6): 806-808
8. Biggers JD, McGinnis LK, Lawitts JA. Enhanced effect of glycyl-L-glutamine on mouse preimplantation embryos in vitro, Reprod Biomed Onnline, 2004; 9(1): 59-69
9. Rezk Y, Huff C, Rizk B. Effect of glutamine on preimplantation mouse embryo development in vitro, Am J Obster Gynecol, 2004; 190(5): 1450-1454
10. Whittingham DG. Culture of mouse ova. J. Reprod. Fertil. Suppl 1971; 14: 7-12
11. Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizating capacity of human spermatozoa. J. Reprod. Fertil 1982; 66: 161-168
12. Baharvand H, Valojerd MR, Ashtiani SK. Co-Culture of mouse embryos with ampullary and isthmic epithelial cell of hamster oviduct. MEFS J; 1198; 3(Suppl 3): 53-57
13. Baharvand H, Rezazadeh M. The comparison of six different media macromolecule-supplements on the in vitro development and cleavage rate of on-cell mouse embryos. Yakhteh (The Cell) Medical Journal, 2000; 3: 17-24
14. Wang Y, Puscheck EE, Lewis JJ, Trostinskaia AB, Wang F, Rappolee DA. Increases in phosphorylation of SAPK/JNK and p38MAPK correlate negatively with mouse embryo development after culture in different media, Fertil Steril, 2005; 1: 1144-1154
15. Scott L and Whittingham DG. Influence of genetic background and media components on the development of mouse embryos in vitro. Mol Reprod Dev. 1996; 43: 336-346
16. Abramczuk J, Soher D and Koprowski H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one cell embryos in chemically defined medium.Dev. Biol 1977; 61: 378-383
17. Lawits JA and Biggers JD. Joint effects of sodium chloride, glutamine and glucose in mouse preimplantation embryo culture media, Mol Reprod Dev 1992; 31: 189-194
18. Suzuki O, Asano T, Yamamoto Y, Takano K and Koura M. Development in vitro of preimplantation embryos from 55 mouse strains. Reprod. Fertile. Dev 1996; 8: 975-980
19. Penkov LI, Platonov ES, Dimitrov BD, Mironova OV, Koniukhov BV. Effects of growth factors FGF4, TGFalpha, and TGFbeta on the development of parthenogenetic embryos of C57BL/6 mice, Ontogenez, 2005; 36(2): 145-150
20. Baharvand H, Valojerdi MR. Effects of glucose and phosphate on the development of one-cell NMRI mouse embryos in M16, CZB and T6 media Physiology and Pharmacology 1999; 3: 45-57
21. Nagy A, Gertsenstein M, Vitersten K, Behringer R. Manipulating the mouse embryo A Laboratory Manual, 2003; 161-208
22. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. Reprod Fertil. 1989; 86: 679-688
23. Baltz JM. Intracellular PH regulation in the early embryo, Biaassays 1993; 8:523-53
24. Uranga JA, Arechaga J. Comparative analysis of in vitro development of outbred mouse embryos cultured in

krebs-ringer or tyrode- derived Media, Reprod Nutr Dev 1997; 37: 41-49
25. Lawitts JA, Biggers JD. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium, Biol Reprod 1991; 45: 245-251
26. Summers MC, McGinnis LK, Lawittz JA, Biggers JD. Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. Hum Reprod 2005; 20(5): 1364-71
27. Martin KL, Leese HJ. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. Mol Reprod Dev 1995; 40: 4: 436-443
28. Chatot CL, Lewis JL, Torres I, Ziomek CA. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. Biol Reprod 1990; 42: 432-440
29. Brinster RL. Uptake and incorporation of amino acids by the preimplantation mouse embryo. Reprod Fertil 1971; 27: 329-338
30. Mehta TS, Kiessling AA. Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylonedio aminetetra acetic acid with or with out amino acids of serum. Biol Reprod 1990; 43: 600-606
31. Lane M, Gardner DK. Non essential amino acids and glutamine decrease the time if the first cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. Assist Reprod Genet, 1997; 14: 398-403
32. Lane M, Gardner DK. Effect of essential amino acids on mouse embryo viability and ammonium production. Assist Reprod Genet 2001; 18: 519-525
33. Biggers J, Mcginnis L, Raffin M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. Biol of Reprod 2000; 63:281-293
34. Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM, Tiglias J, Wood C, Trounson AO. Blastocyst development and birth after in vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. Hum Reprod 1995; 10: 3243-3247
35. Munsie MJ, Michalska AE, Obrien CM, Trounson AO, Pera MF, Mountford PS. Isolation of pluripotent embryonic stem cell from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. Curv Biol. 2000; 10: 989-992
36. Baharvand H, Rezazadeh M. Comparison of "in-house" prepared R1 and R2 (Royan 1,2) and commercially equivalents G1.2 and G2.3 sequential culture media on mouse in vitro development. Hakim; Fall 2001; 4(3): 181-192
37. Baharvand H, Rezazadeh M, Altarihi MT. Comparison of mouse embryo development by co-culture with ampullary and isthmic epithelial cell of hamster oviduct and the effect of injected gonadotrophins. Yakhteh (The Cell) Medical Journal, 1999; 1: 7-13