مقایسه تأثیر شش ماکرومولکول افزودنی مختلف به محیط کشت بر میزان تکوین و تسهیم جنینهای تک‌سلولی موش

حسین بهاروند M.Sc.☆♦، مجتبی رضازاده ولوجردی Ph.D.★

☆ جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران، پژوهشکده رویان

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

چکیده

* **هدف:** بررسی تأثیر انواعی از ماکرومولکولهای افزودنی به محیط کشت بر میزان تکوین و تسهیم جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش و انتخاب ماکرومولکول(های) مناسب افزودنی

* **مواد و روشها:** جنینهای تک‌سلولی موش نژاد NMRI در محیط کشت T6 که حاوی یکی از ماکرومولکولهای زیر بود کشت شدند: سرم آلبومین گاوی، (۴ mg/ml، BSA: Bovine Serum Albumine)، آلبومینار -۵ (۱۰ درصد)، هیالورونیک اسید (۰/۵ mg/ml، HA: Hyaluronic Acid)، سرم جنین گاوی (۱۰ درصد، FCS: Fetal Calf Serum)، مایع فولیکولی انسانی (۱۰ درصد، HFF: Human Follicular Fluid)، پلی ونیل الکل (۰/۱mg/ml، PVA: Polyvinyl Alcohol). تمام گروههای دارای Ethylinediamine Tetraacetic Acid (EDTA) با غلظت ۰/۰۲ میلی مولار بودند. طی ۵ روز کشت، هر ۲۴ ساعت، میزان تکوین جنینها بررسی شد در نهایت تعداد بلاستومر بلاستوسیستها شمارش شد.

مقایسه تکوین و تسهیم بلاستوسیستها به‌ترتیب با آزمون مربع کای و توکی ـ کرامر انجام شد.

* **یافته‌ها:** مقایسه میزان تکوین و تسهیم جنینها پس از ۱۲۰ ساعت کشت نشان داد که گروههای دارای BSA، HA، PVA و HFF درصد بلاستوسیست و تعداد بلاستومر بیشتری نسبت به گروههای دارای آلبومینار -۵، FCS یا گروه بدون ماکرومولکول هستند [مقایسه تکوین بلاستوسیستها ($P<0.0001$) و مقایسه تعداد بلاستومرها ($P<0.05$)]. این در حالی بود که میزان تکوین و تسهیم جنینها در گروههای دارای BSA، HA، PVA و HFF اختلاف معنی‌داری را نشان نداد [بلاستوسیستها (۶۷-۶۳٪) و تعداد بلاستومرها (۷±۱۳۱) تا (۷±۱۲۰)].

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به داده‌های حاصله، میزان تکوین و تسهیم جنینها در BSA، HA، HFF و PVA بیش از FCS، آلبومینار -۵ و گروه بدون ماکرومولکول بود و HA می‌تواند به‌عنوان یک ماکرومولکول فیزیولوژیک که در سیر تولیدمثلی نیز وجود دارد در ساخت محیطهای دارای ترکیب مشخص به کار رود.

کل واژگان: هیالورونیک اسید، پلی ونیل الکل، مایع فولیکولی انسانی، تکوین پیش از لانه‌گزینی، جنین موش

مقدمه

ایجاد یک سیستم کشت قابل اعتماد برای کشت جنین جانوران و انسان، از نظر پژوهشهای کاربردی و بنیادی بسیار حائز اهمیت است. محیطهای رایج کشت جنین شامل محیطهای ساده یا پیچیده هستند که افزودنیهای مختلفی از جمله ماکرومولکولها به آنها اضافه می‌شود. وجود این ماکرومولکولها در محیط کشت از یک سو، سبب تسهیل در دستکاری گامتها و جنینها می‌شود، به‌طوری‌که در غیاب آنها، جنینها و گامتها به پلیت یا پیپت می‌چسبند و از سوی دیگر سبب بهبود تکوین جنینها در محیط کشت می‌گردند.

ماکرومولکولهای رایج در کشت جنین شامل سرم، سرم آلبومین گاوی (BSA)، سرم آلبومین انسانی (به‌صورت HSA یا آلبومینار - ۵)، سرم جنین گاوی (FCS) و پلی‌وینیل الکل (PVA) است.

اگرچه چگونگی تأثیر دقیق این ماکرومولکولها بر تکوین جنینها مشخص نیست ولی ممکن است که حذف کننده بعضی مواد امبریوتوکسیک یا تأمین کننده فاکتورهای مفیدی نظیر سوبستراهای انرژی، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و فاکتورهای رشد باشند و یا شرایط فیزیکوشیمیایی محیط را تغییر دهند (۱، ۲). در عین حال بعضی از آنها نیز می‌توانند توکسیک باشند (۵-۳). مثلاً سرمی که به‌طور معمول به‌کار می‌رود بسیار متغیر است و اگرچه دارای فاکتورهای محرک تکوین جنین است اما از سوی دیگر دارای فاکتورهایی است که اثر عکس بر تکوین جنین دارند. در واقع سرم یک مایع پاتولوژیک بوده که حاصل انعقاد خون است (۵) به‌طوری‌که معتقدند سرم سبب القاء تغییرات شیمیایی می‌شود که احتمالاً اثرهای زیانباری بر تکوین جنین دارد (۱، ۵). همچنین نشان داده شده است که آلبومینار - ۵ و BSA به‌لحاظ شیمیایی بسیار متغیر هستند و ترکیب آنها بسته به میزان مولکولهای کوچک متصل به آنها، متفاوت است (۱). بدین ترتیب ماکرومولکولهای مصنوعی دیگری نظیر پلی‌ـ پلی‌وینیل الکل جایگزین سرم و آلبومین در محیطهای کشت دارای ترکیب مشخص شده‌اند (۱، ۶). اخیراً جایگزین دیگر ماکرومولکولها، گلیکوز آمینوگلیکانها (GAGs)[1] هستند که در مسیر تناسلی ماده وجود دارند (۷). GAGs زنجیره‌های پلی‌ساکاریدهای پلی‌آنیونیک هستند که طولهای مختلفی دارند و دارای واحد دی‌ساکاریدی تکرار شونده هگزوآمینی هستند. به‌جز هیالورونیک اسید، سایر GAGs به‌صورت کووالانسی به یک پروتئین متصل می‌شوند و پروتئوگلیکانها را می‌سازند (۸، ۹). هیالورونیک اسید (HA) به‌عنوان یکی از GAGs می‌تواند از تکوین جنین حمایت کند (۱۰-۸). به‌طوری‌که اخیراً گزارش شده است که وجود HA در محیط Whitten، از تکوین جنینهای تک و دو سلولی خوک تا بلاستوسیست حمایت می‌کند (۹).

بدین ترتیب، در این مطالعه به‌منظور ارزیابی جایگزین مناسب برای سرم یا آلبومین و در نتیجه افزایش قابلیت اعتماد به نتایج حاصله، انواعی از ماکرومولکولها برای تکوین و تسهیم جنین در محیط آزمایشگاهی بررسی شدند.

مواد و روشها

◈ حیوانات

موشهای نر و ماده نامحخون NMRI (Outbred) (تهیه شده از انستیتوپاستور ایران) تحت شرایط نوری مشخص (۱۴ ساعت روشنایی از ساعت ۶ صبح) نگهداری شدند. به‌منظور تحریک تخمدان[2]، ۷/۵IU hMG[3] (ارگانون) در ساعت ۱۲-۱۱ صبح به‌صورت درون صفاقی، به موشهای ماده تزریق شد. پس از ۴۸ ساعت برای انجام تعدد تخمک‌گذاری[4]، میزان ۷/۵ IU hCG[5] (ارگانون)، باز هم به‌صورت درون صفاقی به هر کدام از آنها تزریق شد. به‌دنبال تزریق hCG، یک یا دو موش ماده با یک موش نر در قفس‌های جداگانه قرار داده شد و صبح روز بعد برای مشاهده پلاک واژنی که نمایانگر عمل جفت‌گیری است، بررسی شدند.

◈ محیط کشت و افزودنیهای کشت

در ابتدا محیط کشت T6 با استفاده از مواد شرکت سیگما تهیه شد (۱۱) (جدول ۱).

کمی قبل از کشت جنین، اتیلن‌دی‌آمین تتراستیک اسید (۰/۰۲ میلی مولار، EDTA) و افزودنیهای ماکرومولکولی زیر به‌طور جداگانه به آن اضافه شدند:

۱) سرم جنین گاوی (Gibco) با غلظت ۱۰ درصد

۲) آلبومینار - ۵ (سازمان فرآورده‌های خونی ایران) با غلظت ۱۰ درصد

۳) سرم آلبومین گاوی (A-۸۸۰۶، Sigma، فراکسیون V، فاقد اسیدهای چرب)، با غلظت ۴ mg/ml

۴) هیالورونیک اسید (H-۱۸۷۶، Sigma)، با غلظت ۰/۵ mg/ml

۵) پلی‌وینیل الکل (۱۰KD، P-۸۱۳۶، Sigma)، با غلظت ۰/۱ mg/ml

۶) مایع فولیکولی انسانی (HFF) با غلظت ۱۰ درصد که به روش زیر تهیه شد:

مایع فولیکولی حاصل از آسپیراسیون یک فولیکول بزرگ (۱۸mm) با ۳۰۰۰ rmp و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به مدت ۰/۵ ساعت در دمای ۵۶° سانتی‌گراد غیرفعال شد. سپس از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. این مایع از یک مایع فولیکولی بدون خون تهیه گردید.

۷) گروه کنترل که فاقد هرگونه منبع ماکرومولکولی یا پروتئینی بود.

1. Glycosaminoglycans
2. Ovarian hyperstimulation
3. human Menoposal Gonadotrophin
4. Superovulation
5. human Chorionic Gonadotrophin

جدول ۱: ترکیبات (میلی مولار) محیط کشت T6

ترکیبات	غلظت	ترکیبات	غلظت
Nacl	۸۰/۷۷	Na Pyruvate	۲۳/۲۹
Kcl	۱/۲۸	Glucose	۵/۵۵
NaH_2PO_4	۰/۳۹	*Penicillin G	۶۲/۸
$MgCl_2$	۰/۴۹	*Streptomycin	۵۰
$CaCl_2$	۱/۷۷	*phenol red	۰/۰۱
		$NaHCO_3$	۲۵

* مقادیر به‌صورت mg/ml است.

* بدست آوردن جنین

موشهای پلاک مثبت (دارای پلاک واژنی) بین ساعتهای ۱۳-۱۲ به‌طریق تخاعی کردن[1] کشته شده و پس از بیرون آوردن لوله‌های رحمی، توسط محیط T6 فلاش[2] شدند. به‌عبارت دیگر، محیط کشت از ناحیه شیپور به‌داخل لوله رحمی تزریق شد تا جنینها از سوی دیگر خارج شوند. به‌دنبال آن تمام جنینهای تک‌سلولی (مرحله پیش هسته‌ای) پس از شستشو در یک قطره جمع‌آوری شدند.

* کشت جنین

جنینهای تک‌سلولی به‌دست آمده در ظرفهای پتری (Falcon) در قطره‌های ۲۰ میکرولیتری محیط کشت T6 حاوی یک نوع ماکرومولکول شستشو داده شدند و سپس در قطره حاوی همان ماکرومولکول و در زیر روغن پارافین مایع (Merk ،d=۰/۸۸ g/ml) قرار داده شدند. ظرفهای حاوی محیطهای کشت ۵-۴ ساعت قبل از این عمل آماده شده و در انکوباتور تحت شرایط مرطوب و دمای ۳۷° سانتی‌گراد، گاز کربنیک ۵ درصد قرار گرفتند. تکوین جنینها به‌صورت هر ۲۴ ساعت یکبار و تا ۱۲۰ ساعت پس از کشت توسط میکروسکوپ اینورت مشاهده و ثبت شد.

* شمارش تعداد بلاستومر جنینها

به‌دنبال کشت جنینهای تک‌سلولی و گذشت ۱۲۰ ساعت، بلاستوسیست‌های حاصل از گروههای مختلف، به روش تغییر یافته Ebert و همکارانش (۱۲) رنگ‌آمیزی شده و تعداد بلاستومر آنها شمارش شد. در ابتدا جنینها توسط PBS[3] شسته شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید[4] (سیگما) به‌مدت ۳۰ دقیقه، باز هم توسط PBS شسته شدند. به‌منظور حذف سیتوپلاسم، جنینها به‌مدت ۳۰-۲۰ ثانیه در محلول Triton X-100 یک درصد قرار گرفتند و پس از شستشوی مجدد جنینها در PBS، روی لام حاوی گلیسرول گذاشته شده و توسط میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شدند.

یافته‌ها

میزان تکوین و تعداد بلاستومر جنینها در گروههای مختلف به‌ترتیب در جدولهای ۲ و ۳ آمده است. در ۲۴ ساعت اول کشت درصد کمتری از جنینهای تک‌سلولی در گروه فاقد ماکرومولکول به مرحله دو سلولی رسیدند ($P<0.01$ برای مقایسه با HFF و BSA و $P<0.05$ برای مقایسه با HA). ولی پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت جنینهای تک‌سلولی در گروههای مختلف، مشاهده شد که مجموع مورولاها و جنینهای ۸ سلولی در گروههای حاوی BSA، HA، HFF و PVA بیش از سایر گروهها بود ($P<0.001$) و در همین زمان میزان تکوین جنینهای FCS نسبت به گروههای آلبومینار -۵ و بدون ماکرومولکول کمتر است ($P<0.05$). مقایسه تکوین جنینها پس از ۷۲ ساعت کشت نیز نشان داد که مجموع مورولاها و بلاستوسیست‌ها در گروههای حاوی BSA، HA، HFF و PVA بیش از سایر گروهها است ($P<0.002$) ولی گروههای FCS و آلبومینار -۵ در مقایسه با گروه فاقد ماکرومولکول دارای تکوین بهتری هستند ($P\leq0.008$). در همین زمان، در تکوین جنینها بین گروههای BSA، HA، HFF و PVA

جدول ۲: تکوین جنینهای تک‌سلولی در ضمائم ماکرومولکولی مختلف

	۰ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	۱۲۰ ساعت	
گروه	۱ سلولی	۲ سلولی	۸+M سلولی	M+B	ExB+HB	ExB+HgB+HB	HgB+HdB
BSA	۱۱۰	۱۰۴(۹۵)	۶۱(۵۵)	۷۹(۷۲)	۶۷(۶۱)	۶۹(۶۳)	۵۵(۵۰)
آلبومینار -۵	۱۱۰	۹۷(۸۸)	۲۸(۲۵)	۵۱(۴۶)	۲۸(۲۵)	۳۴(۳۱)	۱۴(۱۳)
HA	۱۱۱	۱۰۴(۹۴)	۶۰(۵۴)	۸۳(۷۵)	۶۹(۶۲)	۷۳(۶۶)	۴۱(۳۷)
FCS	۱۰۴	۹۱(۸۸)	۱۲(۱۲)	۵۳(۵۱)	۱۹(۱۸)	۱۷(۱۶)	۶(۶)
HFF	۱۱۳	۱۰۷(۹۵)	۸۱(۷۲)	۹۱(۸۱)	۸۴(۷۴)	۷۲(۶۵)	۵۸(۵۱)
PVA	۱۱۰	۱۰۰(۹۱)	۶۲(۵۶)	۸۷(۷۹)	۷۲(۶۷)	۷۴(۶۷)	۲۹(۲۵)
بدون‌ماکرومولکول	۱۰۷	۸۸(۸۲)	۳۲(۳۰)	۳۰(۲۸)	۲۲(۲۱)	۲۳(۲۱)	۱۲(۱۱)

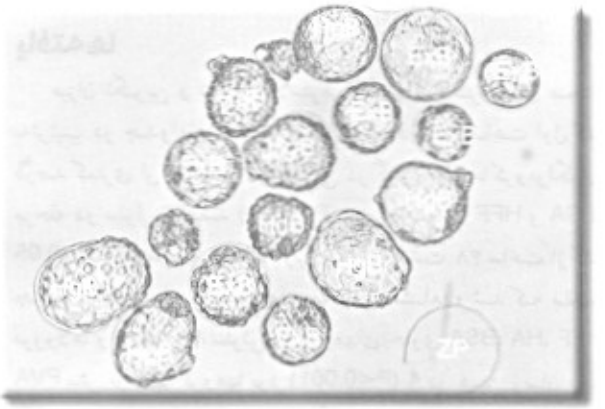
آزمایشات ۱۲ بار تکرار شد و تعداد جنینها در هر گروه ۲۰ ± ۱ بود. مقادیر داخل پرانتز نشانگر درصد است.

M= مورولا، B=بلاستوسیست

1. Cervical dislocation
2. Flush
3. Phosphate Buffered Saline
4. ethidium bromide

تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بازگذشت ۹۶ ساعت پس از کشت نیز میزان جنینهایی که به مرحله بلاستوسیست گسترش یافته (ExB)[1] یا هچینگ بلاستوسیست (HgB)[2] می‌رسند در گروههای BSA و HA، HFF و PVA، بیش از گروههای دیگر بود ($P<0.0001$). ولی تفاوت معنی‌داری بین گروههای BSA، HA، HFF و PVA مشاهده نشد.

به همین ترتیب مجموع کل بلاستوسیست‌ها اعم ازبلاستوسیست‌های گسترش یافته (ExB)، هچینگ بلاستوسیست (HgB)، و بلاستوسیست‌های هچ شده (HdB)[3] (شکل ۱) در گروههای BSA، HA، HFF و PVA پس از ۱۲۰ ساعت تفاوتی نداشت.



شکل ۱: تصویری از بلاستوسیست‌های حاصل از ۱۲۰ ساعت کشت جنینهای تکسلولی
ZP: زونپلوسیدای یک بلاستوسیست هچ شده

همچنین در میزان هچینگ بلاستوسیتها یا بلاستوسیست‌های هچ شده (HgB+HdB) به جز مقایسه HFF و HA تفاوتی دیده نشد ($P<0.05$).

مقایسه تعداد بلاستومرها (جدول ۳) نشان داد که تعداد بلاستومرهای این جنینها در گروههای مختلف BSA، HA، HFF و PVA تفاوت معنی‌داری ندارد، ولی تعداد بلاستومر جنینهای این گروهها از FCS، آلبومینار -۵ و گروه بدون ماکرومولکول بیشتر است ($P<0.05$).

جدول ۳: تعداد بلاستومر بلاستوسیست‌ها پس از ۱۲۰ ساعت کشت جنینهای تکسلولی در گروههای حاوی ماکرومولکولهای مختلف

گروه	تعداد بلاستوسیست‌ها	تعداد بلاستومرها*
BSA	۲۴	۱۳۱±۷
آلبومینار-۵	۱۵	۸۸±۸[a,c,d]
HA	۲۲	۱۲۰±۷
FCS	۸	۶۴±۷[a,b,c,d]
HFF	۲۳	۱۲۸±۷
PVA	۲۶	۱۲۲±۶
بدون ماکرومولکول	۷	۷۰±۷[a,b,c,d]

* تعداد بلاستومرها بصورت (SEM±میانگین) نشان داده شده‌اند
در مقایسه با a:BSA، b:HA، c:HFF و d:PVA با حداقل احتمال $P<0.05$ معنی‌دار است

● بررسی آماری

مقایسه میزان تکوین جنینها با استفاده از آزمونهای مربع کای و فیشر انجام شد و مقایسه تعداد بلاستومرها با استفاده از آزمونهای ANOVA یک‌طرفه، Bartlett و آزمون مقایسه چندگانه Tukey-Kramer انجام شد.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن منابع ماکرومولکولی سرم آلبومین گاوی (۴ mg/ml)، فراکسیون V و قفاد اسیدهای چرب)، پلی‌وینیل الکل (۰/۱ mg/ml)، مایع فولیکولی انسانی (۱۰ درصد) و هیالورونیک اسید (۰/۵ mg/ml) به محیط ساده T6 حاوی ۰/۰۲ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک اسید (EDTA)، سبب افزایش توان تکوین و تسهیم جنینهای تک‌سلولی کشت شده موش نژاد NMRI، نسبت به گروههای حاوی سرم جنین گاوی (۱۰ درصد)، آلبومینار -۵ (۱۰ درصد) و بدون ماکرومولکول می‌شود.

این در حالی است که Trounson و Caro (۱۳) نشان دادند که در حضور FCS، BSA یا عدم حضور هر منبع پروتئینی (بدون ماکرومولکول) در تکوین جنینهای دو سلولی موش تا بلاستوسیست تفاوتی مشاهده نمی‌شود. در مطالعات دیگری نیز در حضور سرم BSA یا عدم حضور هر ماکرومولکول دیگر، درصد بلاستوسیست و تعداد بلاستومر مشابهی گزارش شده است (۱۰، ۱۴). درحالی‌که در این مطالعه مشاهده شد که در عدم حضور هر ماکرومولکول یا وجود FCS و یا آلبومینار -۵، تکوین جنینها دچار اختلال می‌شود که شاید این موضوع به اختلاف در نوع محیطهای کشت مورد استفاده، ظرف[4] ماکرومولکول و یا نژاد یاگونه جانوری و مرحله تکوینی[5] مورد استفاده برگردد. چندین تحقیق روی تکوین جنین انسان در محیط آزمایشگاهی تا بلاستوسیست، نشان داده است که جنین انسان نیازی به سرم ندارد و باردارهای موفق از انتقال جنینهای کشت شده در محیط بدون سرم به‌دست می‌آید (۱۵، ۱۶). با این حال استفاده از سرم برای کشت جنین در بسیاری از برنامه‌های IVF[6] (باروری آزمایشگاهی) جانوری مشاهده می‌شود(۱۷). شاید دلیل اصرار زیادی که بر استفاده از سرم وجود دارد آن باشد که سرم هر آنچه را که در ساخت محیط کشت درنظرگرفته نشده است را جبران می‌کند و تا اندازه‌ای نقش محافظتی را ایفاء می‌نماید (۱). برخی عقیده دارند از آنجا که سرم یک محصول بیولوژیک است و به‌طور طبیعی ایجاد می‌شود به جنین صدمه‌ای نمی‌زند. اما در مقابل نظریهٔ دیگری بیان می‌کند که سرم یک مایع پاتولوژیک است که با انعقاد خون ایجاد می‌شود (۵) و می‌تواند بر فراساختار میتوکندریها (۱۸، ۱۹) و متابولیسم جنین (۲۰) اثر منفی بگذارد و سبب تولد بچه‌های غیرطبیعی شود (۱۹). FCS به‌خصوص

1. Expanded Blastocyst
2. Hatching Blastocyst
3. Hatched Blastocyst
4. Batch
5. Developmental stage
6. In Vitro Fertilization

در سیستمهای هم‌کشتی[1] استفاده می‌شود. مطمئناً بیشتر سلولهای سوماتیک در محیطهای حاوی سرم رشد می‌کنند و ممکن است حتی نیازمند اضافه کردن سرم باشند. منتها تجربه سه دهه گذشته بر تکوین جنین نشان داده است که جنین پیش از لانه‌گزینی با سلولهای سوماتیک تفاوتهای زیادی دارد (۱). از سوی دیگر؛ سرمهای تجارتی اغلب، از نظر کیفیت متنوع‌اند و نتایجی که ممکن است در یک آزمایشگاه از رشد جنینها به‌دست آید در جای دیگر تکرارپذیر نباشد. جزئیات مشکلات استفاده از محیطهای حاوی سرم بر جنین توسط Maurer (۵) بیان شده است.

برای جلوگیری از زیانهای سرم، از آلبومین سرم استفاده شد، که در تحقیق حاضر با به‌کارگیری BSA و آلبومینار -۵ مقایسه‌ای انجام شد و نتایج خوبی از تکوین و تسهیم جنینها در BSA مشاهده گردید. در ساخت BSA و آلبومینار -۵، بسیاری از ترکیبات با وزن مولکولی کم که می‌توانند برای جنین مضر باشند، حذف می‌شوند و آلبومین باقی می‌ماند. لازم به ذکر است که یک نقش مهم آلبومین حذف و جاروب کردن[2] یونها و مولکولهای کوچک است (۱). به‌طوری‌که آلبومین اگرچه دارای تمایل کمی است اما ظرفیت بالایی در اتصال به مولکولهای کوچکی نظیر استروئیدها، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب و کلسترول دارد (۵). بنابراین ممکن است آلبومین تهیه شده مواد مفید و مضری را به محیط وارد کند. به‌طوری‌که مشاهده شد BSA برای تکوین و تسهیم جنینها مفید است ولی افزودن آلبومینار -۵ برای جنینها سودی ندارد. اختلاف در خواص تحریک کنندگی یا ممانعت‌کنندگی تکوین جنین در BSA یا آلبومینار -۵ نشان می‌دهد که این آثار به مقدار سایر مواد موجود در آنها بستگی دارد، زیرا ماهیت مولکول آلبومین موجود در آنها چندان متفاوت نیست (۱).

البته کیفیت هر ظرف BSA یا آلبومینار -۵ با هم تفاوت دارد، به‌طوری‌که ظرفهای مختلف ممکن است سبب تحریک و یا ممانعت از تکوین جنین شوند (۲۱، ۲۲). از طرفی Biggers و همکارانش (۶) نیز بیان کردند که با توجه به جنین تنوعی ممکن است نتایج حاصل از BSA در آزمایشگاهشان فراگیر نباشد و در آزمایشگاه دیگر نتایج دیگری گزارش شود. علاوه بر ظرف BSA، نوع BSA مورد استفاده نیز مهم است (۲۳)، به‌طوری‌که می‌تواند سبب بهبود و یا عدم تکوین جنینها شود. زیرا اغلب BSAهای تجاری فراکسیون خام لیوفیلیزه[3] سرم هستند و با روشهایی مانند کریستالیزاسیون یا حذف اسیدهای چرب، یک آلبومین خالص به‌دست نمی‌آید ولی با حذف اسیدهای چرب، تفاوت کشت جنینها در ظرفهای مختلف کاهش می‌یابد (۱). همچنین نشان داده شده است که وجود اسید چرب پالمیتیک و اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه مانند لینولئیک[4] از تکوین جنینهای موش جلوگیری می‌کنند (۲۴). در این مطالعه نیز ممکن است علاوه بر دلایل فوق، به‌کارگیری BSA فراکسیون V فاقد اسیدهای چرب، سبب تکوین و تسهیم بهتر جنینها نسبت به فراکسیون خام آلبومینار -۵ شده باشد. اما به‌هرحال احتمال انتقال بیماری از این محصولات به جنین وجود دارد (۲۵).

اخیراً ماکرومولکولی به‌نام SSS[5] که غنی از گلبولینها است به‌عنوان جایگزین سرم یا سرم آلبومین مطرح شده است. با استفاده از این ماکرومولکول، درصد مناسبی از جنینها در قیاس با سرم آلبومین انسانی (HSA) یا BSA به بلاستوسیست رسیده‌اند (۲۶). درحالی که در تحقیقی دیگر تفاوتی بین تکوین و لقاح، جنینها و گامتها در SSS و HSA مشاهده نشده است (۲۷).

به‌کارگیری مایع فولیکولی انسانی (HFF) به‌عنوان راه‌حل دیگر، نکته جالب توجهی است؛ به‌طوری‌که جنینها در محیط حاوی ۱۰ درصد HFF از سرعت تکوین سریعتری برخوردار بودند.

مکانیسم دقیق عملکرد HFF بر جنین مشخص نیست زیرا دارای ترکیبات فراوانی است و ممکن است فاکتورهای رشد موجود در آن، سبب افزایش تکوین و تسریع تکوین جنین پستانداران شود. این فاکتورها شامل فاکتور رشد شبه انسولینی I, II (IGF-I, II)[6]، فاکتور رشد ترانسفورمینگ α و β (α و β TGF)[7]، فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF)[8] و فاکتورهای میتوژنی است (۲۸، ۲۹). از طرفی در موش نشان داده شده است که گیرنده IGF-II از مرحله دوسلولی وجود دارد (۳۰) و عملکرد آن در نهایت تأمین کنندهٔ تعداد بلاستومرها و درصد جنینهایی است که به بلاستوسیست می‌رسند. همچنین احتمال دارد که اثر مفید HFF نسبت به سرم به‌دلیل فقدان بعضی فاکتورهای آپوپتوتیک در HFF (۲۹) یا وجود پروتئوگلیکانها یا گلیکوزآمینوگلیکانها (۳۱، ۳۲) باشد.

با همهٔ احوال HFF دارای ترکیبات فراوانی نظیر ویتامینها، پروتئینها، هورمونها و ترکیبات ناشناخته دیگر است و اگرچه در این مطالعه از مایع فولیکولی فولیکول بالغ، دارای تخمک بالغ و قطری حدود ۱۸ میلی‌متر استفاده شد ولی در واقع یک شاخص مناسب برای انتخاب یک مایع فولیکولی مناسب وجود ندارد به‌طوری‌که حتی تحت‌تأثیر گنادوتروپین‌های مختلف، مقادیر هورمونی آن تغییر می‌کند (۳۳). بدین ترتیب ممکن است نتایج حاصل از HFFهای مختلف حتی در یک آزمایشگاه تفاوت کند. البته این نکته را هم باید درنظر داشت که تهیهٔ HFF با افزایش کار آزمایشگاه و هزینه همراه است.

برای حل مسائل مذکور و حصول محیطهایی که به لحاظ شیمیایی دارای ترکیبات مشخصی هستند به استفاده از PVA که یک پلی‌مر مصنوعی است، روی آورده شده است. در آزمایشهای حاضر نتایج حاصل از میزان تکوین و تسهیم جنینها در محیطهای حاوی این ماکرو مولکول قابل توجه بود و با سایر ماکرومولکولهای طبیعی (HFF، HA، BSA) برابری می‌کرد. هم‌اکنون PVA به‌عنوان جایگزین مناسب در لقاح و تکوین جنینهای هامستر و موش مطرح است (۱، ۶، ۳۴). دیگران نیز با استفاده از PVA توانسته‌اند جنین موش صحرایی[9] و گاو را تا بلاستوسیست رشد داده و با انتقال جنینها، جنینهای طبیعی داشته باشند (۳۶، ۳۵).

1. Co-culture
2. scavengering
3. Lyophilized
4. Linolete
5. Synthetic Serum Substitute
6. Insulin Growth Factor
7. Transforming Growth Factor
8. Platelat Derive Growth Factor
9. Rat

البته Biggers و همکارانش (۶) با به‌کارگیری PVA به‌جای BSA در محیط KSOM همراه با اسیدهای آمینه یا بدون آنها مشاهده کردند که میزان هچینگ بلاستوسیست در گروه حاوی PVA نسبت به گروه BSA به‌طور معنی‌داری کمتر است، اما در مطالعه حاضر میزان هچینگ و بلاستوسیست‌های هچ شده و نیز میزان تسهیم آنها در روز پنجم کشت هر دو گروه، اختلاف معنی‌داری نداشت. اما علیرغم حصول نتایج خوب فوق از محیطهای حاوی PVA و عاری از پروتئین، با توجه به دلایل زیر می‌توان گفت که چرا تحت بعضی شرایط، آلبومین و یا منابع پروتئینی مفیدتر از PVA گزارش شده است:

۱) پروتئین‌هایی نظیر BSA می‌توانند با اندوسیتوز وارد جنین شده و منبع اسیدهای آمینه اضافی برای فرایندهای متابولیکی، آنابولیکی و سایر فرآیندها باشند (۳۷، ۳۸).

۲) پروتئینها به‌عنوان عامل حذف کننده بعضی یونها نظیر Ca^{2+} و Zn^{2+} عمل می‌کنند (۱، ۶). این یونها در محیط موجود بوده یا از روغن روی آن وارد محیطها می‌شوند (۱، ۳۹ و ۴۰).

اگرچه می‌توان با اضافه کردن کیلاتورهایی[1] مانند اتیلن‌دی آمین‌تراستیک اسید (EDTA) تا اندازه‌ای نقش آن پروتئینها را جبران کرد، ولی معتقدند که پروتئینها به‌غیر از نقشهای کیلاتوری نقشهای دیگری را نیز ایفاء می‌کنند (۶).

اما در نهایت گفته می‌شود که PVA یک ترکیب فیزیولوژیک نیست و ماهیت عملکرد آن ناشناخته است و اگرچه بلاستوسیست‌هایی از کشت جنین در آن به‌دست آمده است ولی ماهیت ترانسوژنیک آن ناشناخته است. در این راستا و با توجه به مشکلات حاصل از کاربرد سرم، سرم آلبومین، HFF و PVA، یک آلترناتیو فیزیولوژیک برای گلیکوز آمینوگلیکانها (GAGs) هستند. اخیراً با مطالعهٔ تأثیر انواع گلیکو پروتئینها بر لقاح و تکوین جنین خوک نتایج جالب توجهی گزارش شده و هیالورونیک اسید و کندروایتین سولفات دارای تأثیر بهتری نسبت به سایر GAGs (درماتان سولفات و هپارین) بوده است (۹). در این مطالعه نیز مشاهده شد که HA می‌تواند جایگزین مناسبی برای سایر ماکرومولکولها به‌لحاظ توان تکوین و تسهیم باشد. این ماکرومولکول که به‌طور طبیعی در مایع فولیکولی نیز وجود دارد توسط سلولهای کومولوس و گرانولوزا ترشح می‌شود (۴۱). بعد از تحریک گنادوتروپینها توسط این سلولها سنتز HA و سایر GAGs افزایش می‌یابد (۴۲). GAGs در مایع اویداکتی و رحمی نیز یافت می‌شوند (۷) و در زمان لانه‌گزینی میزان HA در رحم افزایش می‌یابد (۴۳). اگرچه HA یک GAG است اما برخلاف سایر GAGs به‌طور کووالانسی به پروتئین مرکزی متصل نیست و می‌تواند به‌صورت یک پلی‌ساکارید درنظر گرفته شود. بنابراین می‌تواند به‌طور مصنوعی سنتز گردد و به‌طور خالص جدا شود (۸). در یک مطالعه ابتدایی نشان داده شد که HA سبب افزایش میزان لانه‌گزینی نسبت به BSA می‌شود (۱۰). مکانیسمی که توسط آن HA سبب حمایت از تکوین جنینها می‌شود ناشناخته است، ولی نشان داده شده که اضافه کردن HA به فیبروبلاستهای کشت شده سبب سنتز DNA و به‌دنبال آن تقسیم سلولی می‌شود (۴۴، ۴۵). محققین معتقدند که اضافه کردن HA به محیط سبب بازسازی ماتریکس خارج سلولی فیبروبلاستها به یک ماتریکس غنی از HA می‌شود و این عمل سبب تکثیر سلولی می‌گردد (۴۴، ۴۵). در خوک هم نشان داده شده است که HA سبب شتاب بلاستومرها در تقسیم سلولی نمی‌شود ولی از تکوین آنها تا بلاستوسیست حمایت می‌کند (۹). همچنین اخیراً نشان داده شده است که HA می‌تواند جایگزین پلی ونیل پیرلیدون (PVP)[2] در انجام تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک (ICSI)[3] شود (۴۶).

در نهایت شاید بتوان گفت که HA می‌تواند جایگزین فیزیولوژیک مناسبی برای سایر ماکرومولکولهای مرسوم باشد و با ساخت آن و در نتیجه با ساخت محیطهایی که از نظر شیمیایی ترکیب مشخص[4] دارند می‌توان قابلیت اطمینان به ساخت این محیطها و نتایج حاصله را افزایش داد.

References

1. Bavister BD: Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Hum Reprod Update 1995; 1: 91-148
2. Brinster RL: Studies on the development of mouse embryos in vitro. III. The effect of fixed-nitrogen source. J Exp Zool 1965; 158: 69-78
3. Ogawa J, Ono T, Mars R: The effect of serum fractions on single cell mouse embryos in vitro. J in vitro Fert Embryo Transfer 1987; 4: 153-158
4. Padillo SL, Howe AM, Bolot JP: Effect of charcoal extracted serum as a growth medium supplement on in vitro development of mouse embryos. J in vitro Fert Embryo transfer 1988; 5: 286-289
5. Maurer HR: Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. In Freshney RI(ed), Animal cell culture: A practical Approach, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, 1992, pp 15-46
6. Biggers JD, Summers MC, McGinnis LK: Polyvenyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. Hum Reprod Update 1997; 3: 125-135
7. Lee CN, AXRL: Concentration and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. J Dairy Sci 1984; 64: 2006-2009
8. Gardner DK: Development of serum free media for

1. Chealator
2. Polyvinyl pyrolidone
3. Intracytoplasm Sperm Injection
4. Chemically defined media

the culutre and transfer of human blastocysts. Hum Reprod 1998; 13(suppl 4): 218-225
9. Kano K, Miyano T, Kato S: Effects of glycosaminoglycans on the development of in vitro-matured and fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage in vitro. Biol Reprod 1998; 58: 1226-1232
10. Gardner DK, Lane M, Rodriguez-Martinez H: Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycoaminoglycan hyaluronate for embryo culture. Hum Reprod 1997; 12 (Abstr. Book 1), 0-215
11. Whittingham DG: Culture of mouse ova. J Reprod Feril 1971; 14 (Suppl): 7-21
12. Ebert KM, Hammer RE, Papaioannou VE: A simple method for counting in the preimplantation mouse embryo. J Experientia 1985; 41: 1207-1209
13. Caro CM, Trounson A: The effect of protein on preimplantation mouse embryo development in vitro. J in vitro Fert Embryo Transfer 1984; 1: 183-187
14. Kruger TF, Stander FS, Smith K, Lombard CJ: The development of one-and two-cell mouse embryos in the absence of human serum. S Afr Med J 1986; 70: 542-543
15. Caro CM, Trounson A: Successful fertilization, embryo development and pregnancy in human in vitro fertilization (IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein. J in vitro Fert Embryo Transfer 1986; 3: 215-217
16. Menezo Y, Testart J, Perrone D: Serum is not necesseary in human in vitro fertilization, early embryo culture, and transfer. Fertil Steril 1984; 42: 750-755
17. Van Langendonckt A, Donna I, Schuurbiers N, Auquier P, Carolan C, Massip A, Dessy F: Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. J Reprod Fertil 1997; 109: 87-93
18. Dorland M, Caradner DK, Trounson A: Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. J Reprod Fertil (Abstract) 1994; 13: 70
19. Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA: Lamb birth weight follwoing transfer is affected by the culutre system used for pre-elongation development of embryos. Biol Reprod 1995; 53: 1385-1391
20. Gardner DK: Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. Cell Biol Int 1994; 18: 1163-1179
21. Thomassen DG: Variable responsiveness of rat tracheal epithelial cells to bovine serum albumin in serum-free culture. In vitro cell Dev Biol 1989; 89: 573-578
22. Batt PA, Gardner DK, Cameron AW: Oxygen concentration and protein source effect the development of preimplantation goat embryos in vitro. Reprod Fertil Dev 1991; 3: 601-607
23. McKiernan SH, Bavister BD: Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos. In vitro cell Dev Biol Anim 1992; 28A: 154-156
24. Nonogaki T, Noda Y, Goto Y, Kishi J, Mori T: Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids. J Assist Reprod Genet 1994; 482-488
25. Marsh RF: Symposium on risk assessment of the possible occurrence of bovine spongiform encephalopathy in the United States. J Am Vet Med Assoc 1994; 204: 70-73
26. Desai N, Kinzer D, Loeb A, Goldfarb J: Use of synthetic serum substitute and α-minimum essential medium for the extended culture of human embryos to the blastocyst stage. Hum Reprod 1997; 12: 328-335
27. Graham MC, Partridge AB, Lewis V, Phipps WR: A prospective comparison of synthetic serum substitute and human serum albumin in culture for in vitro fertilization-embryo transfer. Fertil Steril 1995; 64: 1036-1038
28. Bryant SM, Gale JA, Yanagihara DL, Campeeu JD, dizerega GS: Angiogenic, mitogenic and chemototic activity of human follicular fluid. Am J Obstet Gynecol 1988; 158: 1207-1214
29. Hemmings R, Lachapelle MH, Falcone T, Miron P, Ward L, Guyda H: Effect of follicular fulid supplementation on the in vitro development of human pre-embryos. Fertil Steril 1994; 62: 1018-1021
30. Rappolee DA, Sturm KS, Behrendtsen O, Schults GA, Pedersen RA, Werb Z: Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. Genes Dev 1992; 6: 939-952
31. Eriksen GV, Malmstrom A, Uldbjerg N: Human follicular fluid proteoglycans in relation to in vitro fertilization. Fertil Steril 1997; 68: 791-798
32. Suchanek E, Simunic V, Juretic D, Grizelj V: Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle stimuling hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. Fertil Steril

1994; 62: 347-352
33. Filicori M, Flamigni C, Cogningi GE, Falbo A, Arnone R, Capelli M, Pavani A, Mandini M, Calderoni P, Brondelli L: Different gonadotropin and leuprorelin ovulation induction regimens markedly effect follicular fluid hormone levels and folliculogenesis. Fertil Steril 1996; 65: 387-393
34. Bavister BD: Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. J Exp Zool 1981; 217: 45-51
35. Zhang X, Armstrong DT: Presence of amino acids and insulin in a chemically defined medium improves development of 8-cell rat embryo in vitro and subsequent implantation in vitro. Biol Reprod 1990; 42: 662-668
36. Pinyopummintr T, Bavister BD: In vitro-matured/ in fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein- free culture madia. Biol Reprod 1991; 45: 736-742
37. Pemble LB, Kaye PL: Whole protein uptake by mouse blastocysts. J Reprod Fertil 1986; 78: 149-157
38. Dunglison GF, Kaye PL: Insulin regulates protein metabolism in mouse blastocysts. Mol Reprod Dev 1993; 36: 42-48
39. Van Langendonckt A, Vansteenbrugge A, Donnay I, Van Soon A, Berg U, Semple E, Grisart B, Mermillod P, Brem G, Massip A, Dessy F: Three year results of in vitro production of bovine embryos in serum-poor bovine oviduct conditioned medium. An overview. Reprod Nutr Dev 1996; 36: 493-502
40. Erbanch GT, Bhatnagar P, Baltz JM, Biggers J: Zinc is a possible toxic contaminant of silicone oil in microdrop cultures of preimplantation mouse embryos. Hum Reprod 1995; 10: 3248-3254
41. Yanagishita M, Rodbard D,Hascall VC: Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. J Biol Chem 1979; 254: 911-920
42. Salustri A, Yanagishita M, Hascll VC: Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone- induced mucification. J Biol Chem 1989; 264: 13840-13847
43. Zona TMT, Pinhal MAS, Nader HB: Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. Cell Mol Biol 1995; 41: 97-106
44. Yoneda M, Yomagata M, Suzuki S, Kimata K: Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture. J Cell Sci 1988a; 90: 265-273
45. Yoneda M, Shimizu S, Nishi Y, Yamagata M, Suzuki S, Kimata K: Hyaluronic acid-dependent change in the extracellular matrix of mouse dermal fibroblasts that is conductive to cell proliferation. J Cell Sci 1988b; 90: 275-286
46. Barak Y, Menezo Y, Veiga A, Kogosowski A, Nevo Z: Hyaluronic acid-A physiological replacement for polyvinylpyrolydone (PVP) in intracytoplasm sperm injection (ICSI). Abstracts of the 2th Alph congress, Denmark, 1999, pp O23