مجلّه پزشکی کوثر
تابستان ۸۱، شماره ۷(۲)
صفحات ۱۲۸-۱۱۹
Archive of SID

عامل(های) مؤثر در کولاپس شدن بلاستوسیست در محیطهای کشت متوالی

حسین بهاروند .M.Sc ، **مجتبی رضازاده ولوجردی*** .Ph.D

آدرس مکاتبه: پژوهشکده رویان -گروه بالینی-پژوهشی جنین‌شناسی- تهران -ایران

** دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده پزشکی -گروه آناتومی*

خلاصه

امروزه محیطهای کشت متوالی بعنوان یک راه‌حل منطقی برای تکوین پیش از لانه‌گزینی جنینها براساس نیازهای جنینی و شرایط مسیر تولید مثلی ماده طرح‌ریزی شده‌اند. این محیطها در نوع و غلظت کربوهیدراتها و اسیدهای آمینه تفاوتهایی دارند. اما با بکارگیری این محیطها در کشت طولانی مدت جنین دیده می‌شود که بلاستوسیستهای هچینگ (HgB) و هچ شده (HdB)، کولاپس می‌شوند. بطوریکه بلاستوسل آنها از بین رفته و گاه هچینگ بلاستوسیست بداخل زوناپلوسیدا برمی‌گردد. لذا به منظور مطالعه شناخت عامل(های) شرکت کننده در این فرآیند، محیطهای پایه نمکی R_{S1} و R_{S2} شامل نمکها، کربوهیدراتها و گلوتامین تهیه شدند. در ضمن محیطهای $T_{6.1}$ و $T_{6.2}$ بعنوان محیطهای پایه نمکی متفاوت بر اساس محیط T6 در آزمایشگاه تهیه شدند، با این تفاوت که غلظت کربوهیدراتهای آنها مانند R_{S1} و R_{S2} بود. اسیدهای آمینه غیرضروری (NEAAs)، اسیدهای آمینه ضروری (EAAs)، ویتامینها (Vits)، آلبومین سرم گاوی (BSA ، ۴ mg/ml ، فراکسیون V ، فاقد اسیدهای چرب) (آزمایش II, III) یا آلبومین سرم انسانی (آلبومین -۲۰) (آزمایش I و IV) بر اساس آزمایش مورد نظر به محیطهای پایه نمکی اضافه شدند. جنینهای تک سلولی موش (نژاد ناهمخون NMRI) در این محیطها به شرح ذیل کشت شدند. آزمایش I : جنینهای تک‌سلولی موش در $G_{1.2}$ تجاری یا R_{S1}+NEAAs برای ۴۸ ساعت و سپس در سه روز دیگر در $G_{2.2}$ تجاری یا R_{S2}+NEAAs+EAAs+Vits کشت شدند. آزمایش II-۱: جنینهای تک‌سلولی در R_{S1} یا R_{S1}+NEAAs برای ۴۸ ساعت و سپس در برای R_{S2} و یا R_{S2}+NEAAs+EAAs به مدت سه روز دیگر کشت شدند (به ترتیب گروه ۱ و ۲). آزمایش II-۲: محیط فاز دوم آزمایش IL۱ (R_{S2}+NEAAs+EAAs) بعد از دو روز تعویض شد. آزمایش III: جنینهای تک‌سلولی در $T_{6.1}$+NEAAs به مدت ۴۸ ساعت و سپس در $T_{6.2}$+NEAAs+EAAs برای دو روز دیگر کشت شدند. آزمایش IV: جنینهای تک‌سلولی در R_{S1}+NEAAs برای ۴۸ ساعت و سپس در R_{S2}+NEAAs+EAAs برای سه روز دیگر کشت شدند. محیطهای آزمایشهای I تا II حاوی BSA و آزمایش IV حاوی آلبومین ۲۰ بود. نتایج آزمایش I نشان داد که درصد زیادی از HgB و HdB در روز پنجم کولاپس می‌شوند و در روز پنجم در گروه ۱ آزمایش IL۱ ، جنینی کولاپس نشد ولی تعدادی از بلاستوسیستها در گروه ۲ آزمایش II-۱ ، کولاپس گردیدند. در ضمن تعویض محیط در آزمایش IL۲ ، اثر بر کاهش کولاپس شدن بلاستوسیستها نداشت. نتایج آزمایش II نیز مانند گروه ۲، آزمایش L۱ بود. اما درصد زیادی از HgB و HdB در روز پنجم در آزمایش IV کولاپس گردیدند. بطورکلی نتایج این مطالعه نشان داد که ۱ آلبومین سرم انسانی (آلبومین-۲۰) مورد استفاده بطور عمده و تا اندازه کمی اسیدهای آمینه در کولاپس شدن بلاستوسیستها در محیطهای کشت متوالی مؤثرند و ۲ کولاپس شدن بلاستوسیستها مستقل از محیط پایه نمکی محیطهای کشت متوالی، و ویتامینها است و تعویض محیط این نقیصه را برطرف نمی‌کند.

واژه‌های کلیدی: محیطهای کشت متوالی، کولاپس شدن بلاستوسیست، اسیدهای آمینه، ماکرومولکول افزودنی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه استفاده از محیطهای کشت متوالی (Sequential Culture media) مانند $G_{1.2}$, $G_{2.2}$ Scandinavian IVF) Science, Sweden) برای تکوین جنینهای پستانداران در شرایط آزمایشگاهی رواج یافته است [۷-۱].

در این محیطها، جنینها در روزهای اولیه کشت (تا مرحله ۸ سلولی ـ مورولا) در محیط کشت حاوی اسیدهای آمینه غیرضروری ($G_{1.2}$ یا R_1) کشت می‌شوند و سپس برای تکوین بیشتر به محیط حاوی همه اسیدهای آمینه، منتقل می‌گردند. $G_{2.2}$ یا R_2 در واقع اصطلاح اسیدهای آمینه غیر ضروری و ضروری در اینجا به استفاده و نیازهای سلولهای سوماتیک برمی‌گردد [۹،۸] و بدلیل عدم شناخت کامل ما از نیازهای جنین قبل از لانه‌گزینی، این موضوع در مورد جنینها صدق نمی‌کند. بعبارت دیگر در حال حاضر مشخص نیست که کدام یک از اسیدهای آمینه برای جنین ضروری و کدام غیرضروریند. در کل حذف اسیدهای آمینه از محیطهای کشت، مشکلی را برای تکوین آنها ایجاد نمی‌کند. بطوریکه با کشت جنینها در محیطهای ساده‌ای نظیر T6، M16 و CZB، درصد زیادی از جنینها به مرحله بلاستوسیست می‌رسند [۱۰]. اما گفته می‌شود، وجود اسیدهای آمینه در محیط کشت سبب افزایش هچینگ بلاستوسیستها (بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا‌پلوسیدا) و توان زیستی (Viability) جنینها افزایش لانه‌گزینی و حفظ آن، پس از انتقال جنینها به رحم مادر می‌شود [۱۳-۱۱]. مطالعات اولیه ما نیز نشان داد که تکوین جنینهای تک‌سلولی موش به مرحله هچینگ بلاستوسیست در محیطهای کشت (R_1 یا $G_{1.2}$) و (R_2 یا $G_{2.2}$) که به ترتیب دارای اسیدهای آمینه غیر ضروری و همه اسیدهای آمینه هستند، طی چهار روز کشت، از محیط ساده T6 بطور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است [۸]. اما وقتی ما از محیطهای تجاری $G_{1.2}$ و $G_{2.2}$ برای تکوین جنینهای تک‌سلولی موش استفاده کردیم، از روز پنجم کشت به بعد مشاهده نمودیم که بلاستوسل بلاستوسیستها اندک‌اندک کوچکتر می‌شود و در نهایت از بین می‌رود، گاه بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا‌پلوسیدا (هچینگ بلاستوسیستها) به داخل زونا برمی‌گردند و ظاهر بلاستوسیست شبیه مورولای متراکم شده است. این رخدادها تحت عنوان کولاپس شدن بلاستوسیستها می‌باشند. در روز چهارم کشت بلاستوسیستها سالم هستند اما با یک روز کشت بیشتر در روز پنجم کولاپس می‌شوند اغلب بلاستوسیستهای کولاپس در ادامه رشد در روزهای دیگر دژنره می‌شوند و بنابراین این فرآیند در اغلب موارد برگشت‌ناپذیر است. این در حالی است که کولاپس شدن بلاستوسیست بندرت در محیط کشت ساده T6 در روز پنجم مشاهده می‌شود [۸]. لذا بمنظور شناخت عامل(های) مؤثر در کلاپس شدن بلاستوسیست این مطالعه انجام شد و در آن اثر اسیدهای آمینه، تعویض محیط کشت سرم افزودنی، محیط کشت پایه نمکی و ویتامینها در محیطهای کشت متوالی معادل $G_{1.2}$ و $G_{2.2}$ که در آزمایشگاه تهیه شدند، بر جنینهای موش بررسی گردید.

مواد و روشها

ساخت محیطهای کشت متوالی. محیطهای R_{S1} و R_{S2} که محیطهای نمکی و دارای کربوهیدرات هستند و در غلظت کربوهیدراتها متفاوتند بر اساس مطالعه قبلی ساخته شدند و سپس به آنها اسیدهای آمینه غیرضروری ایگل (NEAAs) یا اسیدهای آمینه ضروری (EAAs) و یا مجموع آنها (Gibco) اضافه شد [۸]. محیطهای $T_{6.1}$ و $T_{6.2}$ نیز که محیطهای تغییر یافته T6 هستند و غلظت کربوهیدراتی آنها به ترتیب شبیه R_{S1} و R_{S2} بودند نیز با توجه به جدول ۱ ساخته شدند. به محیط $T_{6.1}$ اسیدهای آمینه غیرضروری (NEAAs) اضافه شد و به محیط $T_{6.1}$ مجموع اسیدهای آمینه غیرضروری و ضروری اضافه گردید ($T_{6.2}$+EAAs+NEAAs).

تمام نمکها و اسیدهای آمینه از نوع کشت سلولی و جنینی بوده و از شرکت Sigma خریداری شده بودند. منبع ماکرومولکولی مورد استفاده نیز یا آلبومین سرم انسانی(HSA) Albumin 20%-KGCC, Green Cross Corporation,) Korea) بود که ۲۵۰ میکرولیتر آن با محیط به حجم ۱۰cc رسانده می‌شد یا آلبومین سرم گاوی فراکسیون V فاقد اسید چرب (Sigma) بود که با غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. پنی‌سیلین G و استرپتومایسین (Sigma) نیز به ترتیب

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. ترکیبات و غلظت محیطهای T6.1 و T6.2

ترکیب (میلی‌مولار)	T6.2	T6.2
کلرید سدیم	۸۰/۷۷	۸۰/۷۷
کلرید پتاسیم	۱/۴۸	۱/۴۸
فسفات هیدروژن سدیم	۰/۳۹	۰/۳۹
کلرید کلسیم	۱/۷۷	۱/۷۷
رِنات منیزیم	۰/۴۹	۰/۴۹
بی‌کربنات سدیم	۲۵	۲۵
پیروات سدیم	۰/۳۲	۰/۱۰
لاکتات سدیم	۱۰/۵	۵/۸۷
گلوکز	۰/۵۰	۳/۱۵
اتیلن‌دی‌آمین‌تراستیک‌اسید	۰/۰۱	-
پنی‌سیلین G	۶۳میلی‌گرم‌برلیتر	۶۳میلی‌گرم‌برلیتر
استرپتومایسین سولفات	۵۰میلی‌گرم‌برلیتر	۵۰میلی‌گرم‌برلیتر

با غلظتهای ۶۳ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیطها اضافه شد. همه محیطها فاقد معرف فنل رد بودند. محیطهای کشت با آب فاقد یون (Deionized) حاصل از دستگاه Millipore, Milli, RO-Milli Q موجود در پژوهشکده رویان تهیه شدند. پس از ساخت محیطهای کشت، اسمولاریته آنها با اندازه‌گیری کاهش نقطه انجماد توسط اسمومتر (Gonotec, Germany) مشخص شد و سپس با افزودن محلول کلریدسدیم به آن اسمولاریته بین ۲۶۵-۲۶۰ میلی‌اسمول تنظیم گردید.

جانوران. جنینها از موشهای ماده NMRI با سن ۱۲-۱۰ هفته بدست آمدند. به این ترتیب که تخمدان موشهای ماده، در ساعت ۱۲-۱۱ با تزریق iu ۹ هورمون منوپوز انسانی (HMG, Organon) تحریک شدند. پس از ۴۸ ساعت به همان موشها iu ۹ هورمون کوریونی انسانی (hCG, Organon) تزریق گردید و بصورت تکی و یا دوتایی درکنار یک موش نر قرار داده شدند. صبح روز بعد پلاک واژنی در موش ماده نمایانگر انجام جفت‌گیری بود.

تهیه جنینهای تک‌سلولی. ۲۵-۲۴ ساعت پس از تزریق hCG، اویداکت موشها از بدنشان بیرون آورده شده و با تزریق محیط کشت R_{S1} به داخل آنها (عمل فلاشینگ flashing)، جنینهای تک‌سلولی از سوی دیگر خارج گردیدند. سپس تمام جنینهای تک‌سلولی در یک قطره جمع شده و بطور تصادفی و به تعداد تقریباً برابر در قطره‌های حاوی محیط کشت توزیع شدند. تمام جنینها در قطره‌های ۲۰ میکرولیتری محیطهای کشت و در پتری‌دیشهای ۱۵×۶۰ میلی‌متر (Falcon) و زیر ۴-۳ میلی‌لیتر روغن معدنی سبک (Merk, d =۰/۸۸ g/ml) و دمای ۳۷° سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ در محیط کشت شدند.

آزمایشات. به منظور بررسی اثر اسیدهای آمینه، سرم افزودنی، محیط پایه نمکی و ویتامین‌ها، چهار آزمایش (I-IV) به شرح ذیل طرح‌ریزی می‌شدند.

آزمایش I: تکوین جنینهای تک‌سلولی موش در محیطهای کشت متوالی تجاری G1.2 و G2.2 و معادل‌های ساختگی آنها در آزمایشگاه. بمنظور ارزیابی قدرت تکوین جنینهای تک‌سلولی موش در محیطهای تجاری $G_{1.2}$ و $G_{2.2}$ (گروه I-۱) یا در محیطهای ساخته شده در آزمایشگاه (R_{S1}+NEAAs=G_1/R_1) و [(R_{S1}+NEAAs+EAAs=G_2)+Vits=R_2] (گروه I-۲) آزمایش I انجام شد. جنینهای تک‌سلولی موش ۴۸ h در $G_{1.2}$ یا R_1 کشت شدند و سپس به R_2 یا $G_{2.2}$ منتقل شده تا سه روز دیگر کشت یابند. سرم افزودنی به R_1 یا R_2، HSA بود.

آزمایش II: تأثیر اسیدهای آمینه و تعویض محیط کشت بر کولاپس شدن بلاستوسیستها. این آزمایش به منظور اثر اسیدهای آمینه و تعویض محیط بر کولاپس شدن بلاستوسیستها انجام شد. سرم افزودنی در این آزمایش BSA بود.

آزمایش II-۱: جنینهای تک‌سلولی در R_{S1} یا R_{S1}+NEAAs به مدت ۴۸ ساعت و سپس در R_{S2} یا R_{S2}+NEAAs+EAAs سه روز دیگر کشت شدند (به ترتیب گروه II-۱-۱ و II-۱-۲).

آزمایش II-۲: به منظور بررسی اثر تعویض محیط، گروه ۲ آزمایش II-۱ تکرار شد ولی محیط دوم آن (R_{S2}+NEAAs+EAAs) پس از ۴۸ ساعت تعویض شد و ۲۴ ساعت دیگر در محیط تعویض شده کشت یافتند.

آزمایش III: تأثیر نوع منبع ماکرومولکولی افزودنی بر فرآیند

www.SID.ir

Archive of SID

کولاپس شدن بلاستوسیستها. این آزمایش به منظور بررسی تأثیر سرم افزودنی بر کولاپس شدن بلاستوسیست انجام گردید. به همین منظور HSA جایگزین BSA درگروه ۲ آزمایش IL-۱ شد.

آزمایش IV : تأثیر محیط پایه نمکی بر فرآیند کولاپس شدن بلاستوسیستها. برای بررسی اثر محیط پایه نمکی بر کولاپس شدن بلاستوسیست این آزمایش طرح‌ریزی شد. در این آزمایش T6.1 و T6.2 به ترتیب جایگزین R_{21} و R_{S2} شدند و زیگوتها برای ۴۸ ساعت در T6.1+NEAAs و برای سه روز دیگر در T6.2+NEAAs+EAAs کشت شدند. منبع ماکرومولکولی مورد استفاده در این آزمایش BSA بود.

ارزیابی جنینها . ارزیابی جنینها به‌طور ۲۴ ساعته و به‌مدت ۵-۴ روز با میکروسکوپ اینورت (Wilovert, Hund) و بزرگنمایی ×۱۰ انجام شد. جنینها براساس موارد ذیل دسته‌بندی شدند: جنینهای ۸ سلولی؛ جنینهای ۸-۵ سلولی جز این دسته قرار می‌گرفتند، مورولا: جنینهای متراکم شده (compacted) که فاقد حفره بلاستوسل بودند، بلاستوسیست؛ جنینهایی که دارای حفره بلاستوسل بودند (اندازه حفره مهم نبود و این حفره می‌توانست کوچک و یا بزرگ باشد). بلاستوسیست متسع (ExB)، بلاستوسل کل جنین را اشغال کرده بود و اندازه جنین بزرگتر شده بود. هچینگ بلاستوسیست، بلاستوسیستهایی بودند که دارای بیرون‌زدگی واضحی از زونا پلوسیدا بودند. بلاستوسیستهای هچ شده؛ بلاستوسیستهایی بودند که به‌طور کامل از زونا پلوسیدا خارج شده بودند. بلاستوسیستهای کولاپس؛ بلاستوسیستهایی بودند که ساختار بلاستوسیستی آنها فرو ریخته بود، بلاستوسل از بین رفته و یا در حال از بین رفتن بود و سلولها در مرکز جمع شده بوند و یا هچینگ بلاستوسیستهایی بودند که علیرغم پاره‌کردن بخشی از زونا پلوسیدا به‌داخل زونا پلوسیدا برگشته بودند در کل بلاستوسیست به‌گونه‌ای می‌شود که ظاهری مورولا مانند (مورولای متراکم) می‌یابد این فرآیند در روز پنجم کشت مشاهده شد (شکل ۱ و ۲).

درصد تکوین جنینها به‌صورت تقسیم تعداد جنینهای آن مرحله خاص بر تعداد کل جنینهای تک‌سلولی به‌دست آمد و درصد بلاستوسیستهای کولاپس شده حاصل تعداد هچینگ بلاستوسیستها (HgB) و بلاستوسیستهای هچ شده (HdB) به تعداد کل HgB و HdB بود.

آزمون آماری. مقایسه تکوین جنینها با آزمونهای مربع کای و فیشر انجام شد.

نتایج

داده‌های تمام آزمایشات در جدول ۲ آمده است.

آزمایش I : جنینها در $G_{1.2}$ و $G_{2.2}$ (گروه ۱) یا: $(R_{S1}+NEAAs=R_1)$ $[R_{S2}+NEAAs+EAA=G2)+Vits=R_2]$ کشت شدند. بعد از ۴۸ ساعت به‌ترتیب درگروه L-۱ و L-۲ (۵۴٪ و ۵۹٪) و (۷۹٪ و ۷۵٪) از جنینها به مورولا یا مورولا + مرحله ۸ سلولی رسیدند. علاوه بر این درصد بلاستوسیست (B)، بلاستوسیست متسع (ExB) هچینگ بلاستوسیست (HgB) و بلاستوسیست‌های هچ شده (HdB) در روزهای بعد اختلاف معنی‌داری نداشت و به‌ترتیب ۶۵٪ و ۶۸٪ از جنینهای تک‌سلولی در روز پنجم درگروه L-۱ به HgB و HdB رسیدند. همچنین درصد زیادی از HgB و HdB در هر دو گروه کولاپس شدند (۶۷٪ در L-۱ و ۷۹٪ در L-۲).

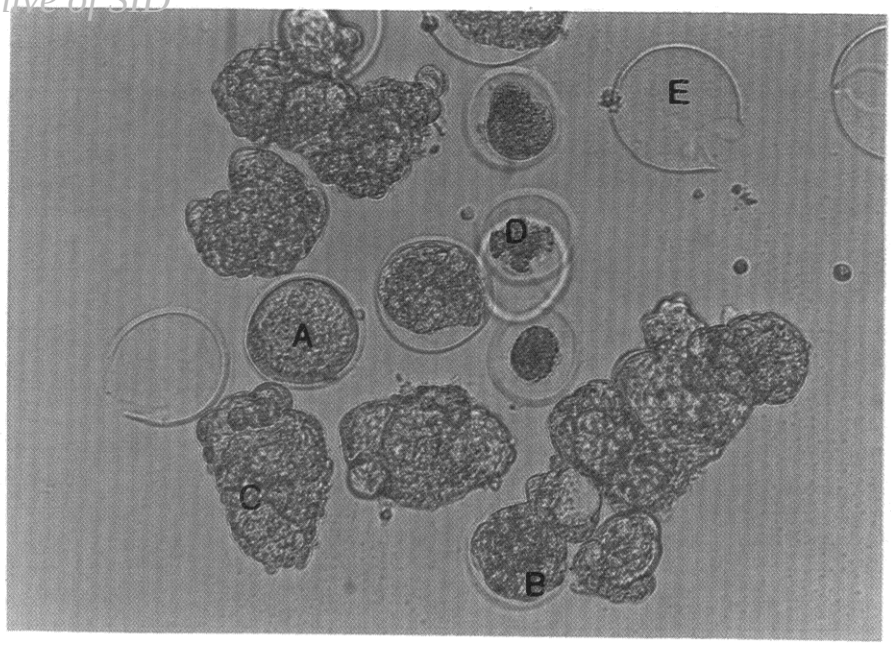
آزمایش ۱. II: تکوین جنینها طی روزهای مختلف در R_{S1} و R_{S2} (گروه IL-۱-۱) یا $R_{S1}+NEAAs$ و $R_{S2}+NEAAs+EAAs$ (گروه IL-۱-۲) اختلاف معنی‌داری نداشت. اما تعدادی از HgB و HdB درگروه IL-۱-۲ در روز پنجم کولاپس شدند (۱۵٪ در مقابل ۰٪، $P<0/05$).

۲. II: پس از تعویض محیط دوم $(R_{S2}+NEAAs+EAAs)$ مشکل کولاپس شدن بلاستوسیستها حل نشد و ۲۲٪ از HgB+HdB در روز پنجم کولاپس شدند. این میزان با درصد کولاپس گروه IL-۱-۲ اختلاف معنی‌داری نداشت.

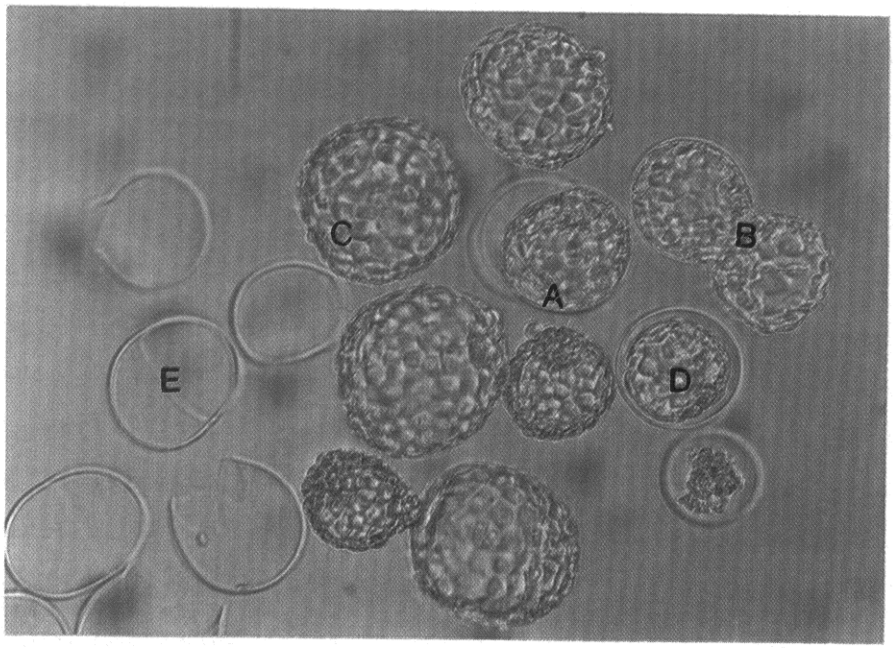
آزمایش III: میزان کولاپس شدن بلاستوسیستها با جایگزین

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: بلاستوسیست‌های کولاپس شده با ظاهر مورولا مانند حاصل از ۵ روز کشت جنینهای تک‌سلولی در محیطهای کشت متوالی R1 و R2 A) بلاستوسیست متسع کولاپس شده که بلاستوسل آن از بین رفته است و جنین داخل زوناپلوسیداست B) هچینگ بلاستوسیست کولاپس،C) بلاستوسیست، D) جنین دژنره، E) زوناپلوسیدا



شکل ۲: بلاستوسیست‌های سالم حاصل از ۵ روز کشت جنینهای تک‌سلولی A) بلاستوسیست متسع، B) هچینگ بلاستوسیست، C) بلاستوسیست هچ شده،) D) بلاستوسیست متسع در حال کولاپس، Eزوناپلوسیدا

کردن HSA به جای BSA افزایش قابل ملاحظه‌ای یافت (۶۷٪ در مقابل ۱۵٪، P<۰/۰۰۱). مقایسه این آزمایش با آزمایش IL-۲ که دارای ویتامین بود نشان داد که اختلاف دو گروه مزبور معنی‌دار نمی‌باشد (۶۷٪ در مقابل ۷۹٪ به ترتیب در گروههای III و IL-۲).

آزمایش IV: مقایسه تکوین جنینها طی ۵ روز کشت در گروه IL-۱-۲ و IVاختلاف معنی‌داری وجود ندارد و ۱۵٪ از HgB و HdB در آزمایش IVکولاپس شدند.

در این مطالعه، جنینهای تک‌سلولی موش در محیطهای تجاری $G_{1.2}$ و $G_{2.2}$ (Scandianavian IVF Science, Sweden) کشت شدند و مشاهده شد که درصد زیادی از بلاستوسیستهای هچ شده و هچینگ بلاستوسیستها در روز پنجم کولاپس شدند. این در حالی است که این فرآیند بندرت در محیط ساده T6 در روز پنجم مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. عامل(های) مؤثر در کولاپس شدن بلاستوسیست در محیطهای کشت متوالی.

آزمایش	تکرار	۰ساعت	۲۴ساعت	۴۸ساعت		۷۲ساعت		۹۶ساعت		۱۲۰ساعت	
		۱سلولی	دوسلولی	M	۸+M	B	M+B	HgB	E×B+HgB	HdB+HgB	C*
I-۱	۷	۷۱	۶۶	۳۸(۵۴)	۵۶(۷۹)	۳۶(۵۱)	۶۵(۹۲)	۴۳(۶۱)	۵۷(۸۰)	۴۶(۶۵)	۳۱(۶۷)
aI-۲	۷	۶۹	۶۵	۴۱(۵۹)	۵۲(۷۵)	۳۱(۴۵)	۶۴(۹۳)	۳۵(۵۱)	۵۶(۸۱)	۴۷(۶۸)	۳۷(۷۹)
bII-۱-۱	۵	۴۸	۴۸	۲۰(۴۲)	۳۰(۶۳)	۲۰(۴۲)	۴۳(۹۰)	۱۴(۲۹)	۴۱(۸۵)	۲۴(۵۰)	۰(۰)
bII-۱-۲	۱۰	۱۰۴	۱۰۴	۶۰(۵۸)	۸۰(۷۷)	۵۴(۵۲)	۹۲(۸۸)	۳۶(۳۵)	۸۵(۸۲)	۶۱(۵۹)	۹(۱۵)
bII-۲	۱۰	۹۸	۹۴	۵۲(۵۳)	۶۸(۶۹)	۴۹(۵۰)	۸۷(۸۹)	۳۵(۳۶)	۷۹(۸۱)	۶۳(۶۴)	۱۴(۲۲)
aIII	۷	۶۲	۶۰	۳۷(۶۰)	۴۳(۶۹)	۳۰(۴۸)	۵۲(۸۴)	۱۹(۳۱)	۴۵(۷۳)	۳۹(۶۳)	۲۶(۶۷)
bIV	۶	۶۴	۶۰	۳۱(۴۸)	۳۹(۶۱)	۳۱(۴۸)	۵۵(۸۶)	۳۱(۴۸)	۴۸(۷۵)	۴۱(۶۴)	۶(۱۵)

درصدها داخل پرانتز می‌باشند.

*C: هچینگ بلاستوسیستها و بلاستوسیستهای کولاپس شده، M: مورولا، B:بلاستوسیست، E×B: بلاستوسیست متسع، HgB: هچینگ بلاستوسیست، HdB: بلاستوسیست هچ شده، آزمایشها: I۱: G1.2ÄG2.2 تجاری، I۲: Rs1+NEAAsÄRs2+NEAAs+EAAs+Vits

I۱-۱: Rs1ÄRs2، I۱-۲: Rs1+NEAAsÄRs2+NEAAs+EAAs، I۲: تعویض محیط دوم آزمایش I۱-۲، II: مانند I۱-۲ ولی HSA جایگزین BSA شد IV: T6.1+NEAAsÄT6.2+NEAAs+EAAs، a: محیط دارای سرم HSA، b: محیط دارای سرم BSA

بحث

فرآیند کولاپس شدن بلاستوسیستها، در محیط آزمایشگاهی رخ می‌دهد. درحال حاضر مشخص نیست که این فرآیند طبیعی است و یا حاصل Artifact در محیط آزمایشگاهی می‌باشد. این Artifact می‌تواند نتیجه اعمال ذیل باشد: تغییر دما به هنگام مشاهده جنینها، جابجا کردن بلاستوسیستها با پیپت و انتقال آنها از قطره‌ای به قطره دیگر، بدنبال ذوب بلاستوسیستهای منجمد و یا حذف زوناپلوسیدا با آنزیم پروناز در مقابل دیده شده است که اگر بلاستوسیستها به دقت جابجا شوند و یا در شرایط مطلوب (Optimal) کشت شوند، کولاپس نمی‌شوند.

تعدادی از محققین در گزارشات خود، این فرآیند را به صورت برگشت‌پذیر گزارش کرده‌اند بطوریکه ظرف چند ساعت پس از کولاپس شدن، بلاستوسیست به حالت اولیه برمی‌گردد [۱۵،۱۴]. حتی با انتقال بلاستوسیستهای کولاپس در گاو مشاهده شده که میزان حاملگی با انتقال بلاستوسیستهای سالم برابر است. اما در این مطالعه مشاهده شد که این فرآیند در محیطهای کشت متوالی برگشت‌ناپذیر است. این در حالی است که جنینها در روز چهارم کشت سالم هستند و در مرحله بلاستوسیست می‌باشند اما با یک روز کشت بیشتر یعنی در روز پنجم کولاپس می‌شوند احتمالاً فرآیند کولاپس حاصل شکستن اتصالات محکم بین سلولهای تروفوبلاستی است. این شکست می‌تواند، در نتیجه فشار بلاستوسل در حال اتساع باشد. بطوریکه با افزودن سیتوکالازین و تخریب شبکه میکروفیلامنتهای اکتینی قشری (Cortical) و اتصالات محکم و حذف داور باز هم این فرآیند مشاهده می‌شود. بهرحال از عوامل مهم موجود در محیط کشت، ماکرومولکول افزودنی است که با توجه به نکات فوق در کولاپس شدن بلاستوسیست حائز اهمیت است [۱۶].

نتایج این مطالعه نشان داد که آلبومین سرم انسانی (HSA، آلبومین ـ۲۰) افزودنی به محیط کشت، مهمترین عامل در کولاپس شدن بلاستوسیست می‌باشد. به‌طوری‌که با جایگزین کردن آلبومین سرم گاوی (BSA، فاقد اسید چرب و فراکسیون V) به‌جای HSA در محیطهای کشت متوالی تهیه شده در آزمایشگاه، میزان کولاپس شدن بلاستوسیستها به نحو چشمگیری کاهش یافت. قابل ذکر است که منبع ماکرومولکولی

www.SID.ir

Archive of SID

$G_{1.2}$ و $G_{2.2}$ تجاری HSA می‌باشد. اگرچه نقش دقیق سرم در محیط کشت مشخص نیست ولی معتقدند که سرم عوامل سودمند محیطهای کشت نظیر سوبستراهای انرژی و فاکتورهای رشد را فراهم می‌کند. اما گزارش شده است که بعضی از منابع سرمی، سمی هستند و کیفیت آنها از ظرفی به ظرف دیگر متغیر است و از طرفی سرم دارای مولکولهای ناشناخته فراوانی می‌باشد [۱۷]. اگرچه خالص‌سازی سرم و حصول آلبومین آن می‌تواند مفید باشد ولی باید دقت داشت که آلبومین به‌عنوان جاروب کننده (Scavenger) یونها و مولکول‌های کوچک می‌باشد و از طرفی دارای تمایل کم (Low-affinity) ولی ظرفیت بالا (High Capacity) برای این ترکیبات و سایر ترکیبات با وزن مولکولی کم و مولکول‌هایی نظیر استروییدها، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب و کلسترول است. بنابراین ممکن است که آلبومین سرم، موادی را به محیط کشت وارد کند که می‌توانند مفید یا مضر باشد. حتی با کریستالیزاسیون و پردازش‌های دیگر، نمی‌توان یک آلبومین خالص بدست آورد [۱۸]. اختلاف در نسبت کولاپس شدن جنینها در محیطهای حاوی HSA یا BSA می‌تواند حاصل همین مقادیر متفاوت ناخالصی‌ها در آنها باشد، اگرچه در هر دو آلبومین وجود داشت. از طرفی بر BSA مورد استفاده در این مطالعه پردازش‌های بیشتری نسبت به HSA انجام شده بود و به احتمال زیاد طی این پردازش‌ها آلاینده‌های غیربیولوژیک آن به مقدار زیاد حذف شده بودند. BSA مورد استفاده فاقد اسید چرب بود. نشان داده شده است که اسید چرب پالمیتیک و اسیدهای چرب غیراشباعی مانند لینولئیک، از تکوین جنین موش ممانعت می‌کنند [۱۹]. همچنین گزارش شده است که BSA فراکسیون V فاقد اسید چرب نسبت به BSA فراکسیون V خام از جنینهای حاصل از باروری آزمایشگاهی (IVF) هامستر بهتر حمایت می‌کنند [۲۰].

همچنین در این مطالعه دیده شد که عامل دیگر مؤثر بر کولاپس شدن بلاستوسیستها اسیدهای آمینه می‌باشند که البته اهمیت آنها در این فرآیند بسیار کم اهمیت‌تر از منبع سرمی افزودنی بود. این تأثیر مستقل از محیط کشت پایه (R_S یا T6) بود. اسیدهای آمینه بمنظور افزایش درصد تشکیل بلاستوسیست، هچینگ بلاستوسیست و افزایش توان لانه‌گزینی آنها پس از انتقالشان به رحم مورد استفاده قرار می‌گیرند [۸،۱۳-۱۱]. در حال حاضر نقش دقیق اسیدهای آمینه بر تکوین جنین ناشناخته است ولی در این زمینه مکانیسمهای مختلفی نظیر تغذیه، سنتز پروتئین، تولید انرژی، تنظیم اسمز، کیلاسیون (Chelation) یونهای فلزی و حتی تنظیم pH درون سلولی پیشنهاد شده است [۷،۲۴-۲۱].

همچنین نتایج مطالعه اخیر نشان داد که برهم‌کنش اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری می‌توانند صرف‌نظر از محیط پایه‌علمی (R_S یا T6) یا منبع ماکرومولکولی (آلبومین سرم انسانی یا آلبومین سرم گاوی) در فرآیند کولاپس شدن بلاستوسیستها دخالت داشته باشند. مطالعه تکوین جنین‌های هامستر نیز نشان داده است که تکوین و یا تعداد متوسط بلاستومر جنین‌ها در حضور اسیدآمینه لوسین، تیروزین، والین، ایزولوسین، فینل آلانین، آرژنین، میتونین، سیستئین و تریپتومان متوقف می‌شود و یا کاهش می‌یابد [۲۵]. این اسیدهای آمینه همگی جز اسیدهای آمینه ضروری ایگل می‌باشند [۹]. در مقابل اسیدهای آمینه، آسپاراژین، آسپاراتیک اسید، سرین، گلوتامیک اسید، هیستدین، لیزین، پرولین و سیستئین محرک تکوین جنینهای هامستر می‌باشند [۲۵]. بنابراین همه اسیدهای آمینه تحریک کننده تکوین جنینها نمی‌باشند و حتی بعضی ممانعت کننده تکوین جنین می‌باشند [۲۷-۲۵]. از طرفی نشان داده شده است که اسیدهای آمینه ضروری ایگل در محیط کشت می‌توانند برای تکوین جنینها سمی باشند. این موضوع در جنینهای موش [۲۸]، هامستر [۲۷]، گوسفند [۲۹] و گاو [۳۱،۳۰] نشان داده شده است. اما به‌کارگیری اسیدهای آمینه غیرضروری ایگل ×۱ و اضافه کردن اسیدهای آمینه ضروری ×۰/۵ تشکیل بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیستها را افزایش می‌دهد [۱۲،۳۱]. بنابراین بسیاری از اسیدهای آمینه ضروری ایگل در غلظتهای بیش از مقداری هستند که جنین در شرایط *in vivo* در معرض آنها است که نتیجه آن اثر منفی بر جنین است. مثلاً تکوین زیگوت هامستر به بلاستوسیست در حضور اسیدهای آمینه ضروری سیستین و لیزین در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار متوقف می‌شود، در

www.SID.ir

Archive of SID

حالی که در حضور همان اسیدهای آمینه و در غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار، تکوین جنینها تحریک می‌گردد [۲۷]. بنابراین یک توجیه برای اثر مضر اسیدهای آمینه ضروری آن است که یک یا چند تای آنها ممکن است که در غلظت ایگل مضر باشند و بنابراین اثرات مفید سایر اسیدهای آمینه پوشانده (Mask) شود. در حمایت از این فرضیه، گفته می‌شود که اثر مهاری ویتامینهای MEM (Minimal Essential Medium) بر تکوین جنین موش در محیط کشت در غیاب اسیدهای آمینه به یک ویتامین به نام نیکوتین آمید برمی گردد. اما از اثرات تحریکی یک ویتامین دیگر بنام ریبوفلاوین در حضور نیکوتین آمید ممانعت می‌شود [۳۲]. حتی اگر بعضی اسیدهای آمینه سمی هم نباشند، ولی ممکن است که برای یک مکانیسم انتقالی با هم رقابت کنند و جذب سایر اسیدهای آمینه موردنیاز جنین را متوقف کنند و بدین ترتیب سبب ممانعت از تکوین جنین شوند [۳۴،۳۳]. مثلاً سیستم انتقال دهنده آسپارتات و گلوتامات یکی می‌باشد [۳۵].

همچنین نشان داده شده است که محتوای اسید آمینه‌ای بلاستوسیستها بطور قابل ملاحظه‌ای در حضور سایر اسیدهای آمینه موجود در محیط در حدود غلظتهایی که در اویداکت وجود دارد تا ۴۰٪ کاهش می‌یابد [۳۶،۳۵]. البته لازم به ذکر است که این اثر تنها تا اندازه‌ای به رقابت برای انتقال برمی‌گردد. برای مثال تارین و گلوتامات هر کدام توسط سیستمهای وابسته به +Na جداگانه، یعنی به ترتیب توسط سیستمهای β X^-_{AG} به داخل جنین منتقل می‌شوند و این سیستمها گلوتامین، گلیسین یا آلانین را انتقال نمی‌دهند [۳۸،۳۷]. بنابراین علاوه‌بر رقابت برای انتقال، ظاهراً جنینهای قبل از لانه‌گزینی صرف‌نظر از وجود یک یا چند اسید آمینه در محیط کشت باید مکانیسمهای دیگری برای محدودیت در دستیابی ماگزیمم به محتوای اسید آمینه‌ای‌شان داشته باشند. به همین ترتیب، کاهش محتوای تارین بلاستوسیستها در حضور گلیسین، آلانین یا گلوتامات نمی‌تواند به سادگی به تبادل اسیدهای آمینه برگردد زیرا تارین توسط فرآیند مستقل از +Na و آلانین و گلوتامات بداخل جنین منتقل می‌گردد [۳۸]. شاید انباشته شدن زیادی بعضی اسیدهای آمینه منجر به فقدان (loss) اسید آمینه دیگری نظیر تارین شود [۳۹]. بالعکس در حضور گلوتامین محیط کشت، گلوتامات در بلاستوسیستها انباشته می‌شود که شاید دلیل آن این باشد که گلوتامین بطور مستقیم توسط گلومامیناز به گلوتامات تبدیل می‌شود. به همین ترتیب گلوتامین در بلاستوسیستهای در حال تکوین در حضور گلوتامات در جنین انباشته می‌شود که شاید دلیل آن، این است گلوتامات بطور مستقیم به گلوتامین تبدیل می‌شود. اگرچه این را هم باید در نظر داشت که گلوتامین بطور خودبه‌خود در محیط کشت به گلوتامات شکسته می‌شود و این می‌تواند منجر به افزایش جذب گلوتامات در جنین شود[۳۵].

مقایسه محتوای بلاستوسیستهای ۴ و ۵ روزه حاصل از *in vivo* و بلاستوسیستهای حاصل از *in vitro* نشان می‌دهد که محتوای اسیدهای آمینه بطور طبیعی کاهش می‌یابد [۳۵] و احتمال دارد این عمل توسط ترشحات رحم و با بلوکه کردن یا تعدیل (Modulation) سیستمهای انتقالی و در نزدیکی زمان لانه‌گزینی انجام شود [۴۱،۴۰]. اما در شرایط آزمایشگاهی نبود این عامل یا عوامل رحمی سبب انباشته شدن بعضی از اسیدهای آمینه در بلاستوسیستها می‌گردد و محتوای کلی اسیدهای آمینه و جنینها را تا ۴۰٪ تحت شرایط کشت کاهش می‌دهد.

یک احتمال دیگر در فرآیند کولاپس شدن جنینها، افزایش میزان آمونیوم حاصل حذف گروه آمینی (Deamination) اسیدهای آمینه است. میزان یون آمونیوم در محیط کشت حاوی ۲۰ اسید آمینه و جنین پس از ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه در سانتی‌گراد به ۰/۲۳۹ میلی‌مولار می‌رسد و این مقدار آمونیوم بیشتر از مقدار موجود در محیط کشت و شرایطی است که تنها اسیدهای آمینه غیرضروری وجود دارند، ۰/۱۱۲ میلی‌مولار [۲۸]. حضور این مقدار آمونیوم در محیط کشت تکوین به بلاستوسیست و توان زیستی آنها را پس از انتقال کاهش می‌دهد [۴۲].

در جهت غلبه بر این مسئله و حل معضل کولاپس شدن بلاستوسیستها محیطهای کشت R_{s1}+NEAAs+EAAs پس از ۴۸ ساعت کشت، تعویض شدند [گروه ۴] ولی باز هم روز بعد کشت درصد زیادی از بلاستوسیستها کولاپس شدند. به

www.SID.ir

Archive of SID

عبارتی یونهای آمونیوم موجود در محیطهای کشت دراین زمینه یا موثر نیستند و یا تأثیر چندانی ندارند. در مطالعه دیگری نیز ما مشاهده نمودیم که تعویض محیط کشت بر تکوین جنینها اثری ندارد [۴۳]. در مورد کشت جنینهای هامستر نیز دیده شده که عدم تعویض محیط کشت بر تکوین جنینها اثری ندارد [۴۴]. ولی در مقابل گزارش شده است با تعویض محیط می‌توان تکوین بلاستوسیستها و توان زیستی جنینهای موشی را پس از انتقال افزایش داد [۴۵].

مطالعه تکوین جنینها در محیطهای R_{S2}+EAAS+NEAAs (همین مطالعه) و دارای ویتامینهای MEM (Minimal Essential Medium) در مطالعه قبلی [۸] نشان داد که حتی با افزودن این ویتامینها، تعداد زیادی از بلاستوسیستها کولاپس می‌شوند.

اگرچه ویتامینها بعنوان کوآنزیم و یا پیشتاز کوآنزیمها هستند و برای انجام بسیاری از واکنشهای متابولیکی می‌باشند و یا حتی بعضی از آنها نظیر کولین و اینوزیتول جز ترکیبات فسفوگلیسریدهای غشاء هستند ولی نتوانستند که در حل مشکل کولاپس شدن بلاستوسیستها کمکی نمایند. به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که فرآیند کولاپس شدن بلاستوسیستها در محیطهای R_1, R_2 و $G_{1.2}$، $G_{2.2}$ تجاری مستقل از نوع محیط کشت پایه (T6 یا R_S)، حضور یا عدم حضور ویتامینهای MEM، تعویض محیط است و به نظر می‌آیند که منبع ماکرومولکولی (سرم) افزودنی به محیط کشت به طور عمده و تا اندازه کمی هم اسیدهای آمینه در کولاپس شدن بلاستوسیستها مؤثر باشند.

تشکر و قدردانی. این مطالعه بخشی از طرح «ساخت محیطهای کشت متوالی و انتقال بلاستوسیست» مصوب شورای علمی پژوهشکده رویان و دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی است. بدین‌وسیله نویسندگان برخود فرض می‌دانند تشکر فراوان خود را از همکاری بی‌دریغ ریاست محترم پژوهشکده، جناب آقای دکتر سعید کاظمی و معاونت محترم پژوهشی پژوهشکده جناب آقای عبدالحسین شاهوردی ابراز دارند.

منابع

1. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, and Schoolcraft WB (2000). Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertil Steril; 73: 1155-58.

2. Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, and Wood C (1998). Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following *in vitro* fertilization and embryo transfer. Fertil Steril; 70:1022-29.

3. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, and Wood C (1998). Evalution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. Hum Reprod; 13: 169-177.

4. Bavister BD (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artificats. Hum Reprod Update; 1: 91-148.

5. Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, and Meldrum DR (1999). Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two *in vitro* fertilization programs. Fertil Steril; 72: 604-609.

6. Krisher RL, Lane M, and Bavister BD (1999). Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. Biol Reprod; 60: 1345-52.

7. Gardner DK, and Lane M (1997). Culture and selection of viable blastocysts: a feasible propostition for human IVF? Hum Reprod Update; 3: 367-82.

۸. بهاروند ح، رضازاده ولوجردی م. مقایسه تکوین جنینهای موش در محیطهای کشت متوالی ساخته شده. R1 و R2 (رویان ۱و۲) و معادلهای تجاری G1.2 G2.2 مجله علمی- پژوهشی حکیم، در دست چاپ.

9. Eagle H (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science; 130: 432-37.

۱۰. بهاروند ح، رضازاده ولوجردی م (۱۳۷۸). تأثیر گلوکز و فسفات بر تکوین جنینهای تک‌سلولی موش نژاد NMRI در سه محیط کشت M16، CZB و T6. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، جلد ۳، شماره ۱، صفحات ۵۷-۴۵.

11. Zhang X, and Armstrong DT (1990). Presence of acids and insulin in a chemically defined amino medium improves development of 8-cell rat embryos *in vitro* and subsequent implantation *in vivo* Biol Reprod; 42: 662-68.

12. Liu Z, and Foote R (1997). Effects of amino acids and α-amanitin on bovine embryo development in a simple protein-free medium. Mol Reprod Develop; 46: 278-85.

13. Mehta TS, and Kiessling AA (1993). The developmental potential of mouse embryos conceived in Ham's F-10 medium containing ethylenediamine tetra actic acid. Fertil Steril; 60: 1088-93.

14. Cole RJ (1967). Cinematographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blasotcyst. J Embryol Exp Morphol; 17: 481-90.

15. Massip A (1982). The behavior of cow blastocyst *in vitro*: cinematographic and morphometric analysis. J Anat. 134: 399-405.

16. Massip A (2001). Pulsatile activity and hatching of *in vitro* produced cow blastocysts: effects of serum supplementation. European J Morph; 39: 73-79.

17. Maurer HR (1992). Towards serum - free, chemically defined media for mammalian cell culture. In Freshney RI (ed), Animal

www.SID.ir

Archive of SID

cell culture: A practical approach. 2nd edn Oxford University Press. Oxford, pp,15-46.

18. Bavister BD (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Hum Reprod Update; 1: 91-148.

19. Nonogaki T, Noda Y, Goto Y, Kishi J, and Mori T (1994). Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids. J Assit Reprod Genet, pp,281-488.

20. Juetten J, and Bavister BD (1983). The effects of amino acids, cumulus cells, and bovine serum albumin on *in vitro* fertilization and first cleavage of hamster eggs. J Exp Zool; 227: 487-90.

21. Edwards LJ, Williams DA, and Gardner DK (1998). Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. Hum Reprod; 13: 3441-48.

22. Lane M, and Gardner DK (1997). Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. J Assist Reprod Genet; 14: 398-403.

23. Gardner DK, and Lane M (1996). Alleviation of the "2-cell-block" and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: Role of amino acids, EDTA and physical parameters. Hum Reprod; 11: 2703-12.

24. Rosen Krans CF, Davis DL, and Milliken G (1989). Pig blastocyst developement *in vitro* is affected by amino acids. J Anim Sci; 67: 1503-508.

25. Mckiernan SH, Clayton MK, and Bavister BD (1995). Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster 1-cell embryos *in vitro*. Mol reprod Dev; 42: 188-199.

26. Bavister BD, and Arlotto T (1990). Influence of single amino acids on the development of hamster one-cell embryos *in vitro*. Mol Reprod Dev; 25: 45-51.

27. Bavister BD, and McKiornan SH (1993): Regulation of hamster embryo development *in vitro* by amino acids. In Bavister BD (ed): "Preimplantation Embryo Development". New York: Springer-Verlag, pp, 57-72.

28. Gardner DK, and Lane M (1993). Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culutre. Biol Reprod; 48: 377-85.

29. Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, and Tervit HR (1991). Development of sheep embryos *in vitro*: Comparison between different protein sources and in cubation vessels. Proc Aust Soc Reprod Biol; 23: 62. Abst.

30. Keskintepe L, Burnley CA, and Brackett BG (1995). Production of viable blastocyst stage indefined *in vitro* conditions. Biol reprod; 52: 1410-17.

31. Liu Z, and Foote RH (1995). Effects of amino acids on development of IVM/IVF bovine embryos in a simple protein free medium. Hum Reprod; 10: 2985-91.

32. Tasi F, and Gavdner DK (1994). Nicotinamide, an component of copplex culture media, inhibits mouse embryo deveopment *in vitro* and reduces subscquent developmental potential after transfer. Fertil Steril; 61: 376-82.

33. Van Winkle LJ, and Campione AL (1990). Functional changes in cation-preferring amino acid transport during development of preimplantation mouse conceptuses. Biochim Biophsy, Acta; 1028: 165-173.

34. Carney EW, and Bavister BD (1987). Stimulatory and inhibitory effects of amino acids on the development of hamster eight cell embryos *in vitro*. J In Vitro Fertil Embryo Transfer; 4: 162-67.

35. Van Winkle LJ, and Dickinson HR (1995). Differences in amino acid content of preimplantation mouse embryos that develop *in vitro* versus in vivo: *in vitro* effects of five amino acids that are abundant in oviductal secretions. Biol Reprod; 52: 96-104.

36. Sellens MH, Stein S, and Sherman ML (1981). Protein and free amino acid content in preimplantation mouse embryos and in blastocysts under various culuture conditions. J Reprod Fertil; 61: 307-315.

37. Van Winkle LJ, Mann DF, Weimer BD, and Campione AC (1991). Na+-depedent transport fo anionic amino acids by preimplantation mouse blastocyst. Biochim Biophsy Acta; 1068: 231-36.

38. Van Winkle LJ, Patel M, Wasserlauf HG, Dickinson HR, and Campione AL (1994). Osmotic regulation of taurine transport via system b and novel processes in mouse preimplantation conceptuses. Biochim Biophys Acta; 1191: 244-55.

39. Kaye PL, Schultz GA, Johnson MH, Pratt HPM, and Church RB (1982). Amino Acid transport and excharge in preimplantation mouse embryos. J Reprod Fertil; 65: 367-80.

40. Van Winkle LJ, Campione AL, and Farrington BH (1990). Development of system BO,+ and a broad-scope Na+ dependent transporter of zwitterionic amino acids in preimplantation mouse conceptuses. Biochim Biophys Acta; 1625: 225-33.

41. Van Winkle LJ, and Campione AL (1987). Development of amino acid transport system Bo,+ in mouse blastocyst. Biochim Biophys Acta 1987; 925: 164-174.

42. Lane M, and Gardner DK (1994). Increase in post-implantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions, J Reprod Fertil; 102: 305-312.

۴۳. بهاروند ح، رضازاده ولوجردی م (۱۳۷۹). تأثیر محیطهای کشت متوالی حاوی غلظتهای مختلف گلوکز و فسفات بر تکوین جنینهای تک‌سلولی موش، مجله پزشکی کوثر، شماره ۵ قسمت ۱، صفحات ۹-۱

44. Mckiernan SH, and Bavister BD (1994). Timing of development in a critical parameter for predicting successful embryogenesis. Hum Reprod; 9: 2123-29.

45. Gardner DK, Lane M, Spitzer A, and Batt PA (1994). Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes clutre to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulated development. Bil Reprod; 50: 390-400.

www.SID.ir