نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۳۹۹؛ ۱۴(۱):۶۵-۷۲.

تنظیم روشی کارآمد برای کشت انفرادی جنین‌های گوسفند در مقایسه با روش مرسوم کشت گروهی

نجمه داودیان[1*]، ابراهیم احمدی[1]

۱. استادیار، پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

دریافت: ۱۶ بهمن‌ماه ۹۷ **پذیرش:** ۲۸ مهرماه ۹۸

چکیده

کشت ازمایشگاهی زیگوت‌ها و جنین‌های لقاح یافته در آزمایشگاه یکی از مراحل اصلی تولید جنین آزمایشگاهی است که تأثیر عمده‌ای بر کمیت و کیفیت جنین‌ها دارد. کشت انفرادی رویان در چندین زمینه پژوهشی و عملی اهمیت خاصی دارد. مطالعه حاضر با هدف تنظیم روشی مناسب برای کشت انفرادی جنین‌های گوسفند انجام شد. تخمدان گوسفندان در کشتارگاه جمع‌آوری شدند و پس از طی مراحل بلوغ تخمک و لقاح آزمایشگاهی، زیگوت‌های احتمالی به صورت دسته‌های ۶ تایی در قطره‌های ۲۰ میکرولیتری و انفرادی در قطره‌های ۱۰ و ۲۰ میکرولیتری محیط کشت قرار داده شدند. در آزمایش دیگر تأثیر ۵ یا ۱۰ درصد سرم (FBS) اضافه شده در روز سوم به قطرات ۱۰ میکرولیتری حاوی یک جنین بر تکامل جنین‌های گوسفند، ارزیابی شد. تعویض محیط تا روز ۷ انجام نشد. تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که میزان تسهیم زیگوت‌ها در روز سوم، تعداد کلی بلاستوسیست‌ها، تعداد بلاستوسیست‌های اولیه، متسع و تفریخ شده در روز ۶ در هر دو آزمایش تفاوت معنی‌داری میان گروه‌های مورد مطالعه نداشت؛ ولی در روز ۷ تعداد کلی بلاستوسیست‌ها در کشت انفرادی در قطرات ۱۰ میکرولیتری بیش از کشت گروهی بود و در آزمایش دوم، در گروه ۱۰ درصد سرم در مقایسه با ۵ درصد سرم، تعداد کلی بلاستوسیست‌ها به طور معنی‌دار بیشتر و تعداد بلاستوسیست‌های اولیه به طور معنی‌دار کمتر بود. در مجموع چنین به نظر می‌رسد کشت انفرادی جنین‌های گوسفند در قطرات ۱۰ میکرولیتری بدون نیاز به تعویض و تازه‌سازی محیط کشت تا روز ۷ و فقط با اضافه کردن ۱۰ درصد سرم در روز ۳ نتایج قابل قبولی از نظر میزان تشکیل بلاستوسیست دارد.

واژه‌های کلیدی: جنین، گوسفند، روش کشت، انفرادی.

مقدمه

تولید آزمایشگاهی جنین، قابلیت‌های بالقوه فراوانی در درمان انواع ناباروری‌ها، حفظ گونه‌های در معرض انقراض، حفاظت از قابلیت ژنتیکی دام‌های پرارزش، حفظ تنوع ژنتیکی دام‌های اهلی و پژوهش‌های بنیادی مرتبط با تکوین و رشد جنین دارد (۴). با وجود سپری شدن نزدیک به ۴۰ سال از تولد اولین نوزاد ناشی از انتقال جنین‌های تولید شده در آزمایشگاه (۲۶) هنوز پژوهش در مورد جنبه‌های مختلف فناوری تولید آزمایشگاهی جنین در گونه‌های مختلف ادامه دارد. یکی از مراحل اصلی تولید جنین آزمایشگاهی مرحله کشت آزمایشگاهی زیگوت‌ها و جنین‌های لقاح یافته در آزمایشگاه است که مشخصاً تأثیر عمده‌ای بر کمیت و کیفیت جنین‌ها دارد (۲۵). همانند بسیاری از گونه‌های اهلی، مطالعات در خصوص جنین‌های گوسفند نیز نشان داده است که رشد گروهی جنین‌ها در مقایسه با رشد انفرادی آن‌ها نتایج بهتری به همراه دارد (۸) که احتمالاً به دلیل تجمع فاکتورهای اتوکرین و پاراکرین جنین‌هاست که اثرات مثبتی روی جنین‌های مجاور دارد (۹ و ۱۴)؛ لیکن کشت انفرادی تخمک و رویان در چندین زمینه‌ی تحقیقاتی و عملی اهمیت خاصی دارد.

پژوهش در زمینه متابولیسم تخمک و رویان مستلزم کشت آن‌ها به صورت انفرادی است تا بتوان تغییرات به وجود آمده توسط هر کدام از آن‌ها را در متابولیت‌های محیط کشت پی‌گیری کرده و ارتباط آن را با تکامل و

www.SID.ir

* پست الکترونیکی نویسنده مسؤول: davoodian.najmeh@sku.ac.ir

کیفیت جنین بررسی کرد، همچنین از این طریق احتمالاً معیارهای غیر تهاجمی مناسب برای درجه‌بندی جنین‌ها به دست خواهد آمد. متابولیت‌ها در رشد و فعالیت نرمال سلولی نقش داشته و بازتاب دقیقی از پاسخ سلول به تأثیر تغییرات ژنتیکی و محیطی هستند (۶ و ۲۱). این روش قادر است تغییرات جزئی در غلظت داخل سلولی متابولیت‌ها در یک بازه زمانی را مشخص کند (۲۴). اطلاعات حاصل از روش متابولومیک برای ارزیابی اختلافات تکاملی رویان‌ها و میزان موفقیت روش تولید آزمایشگاهی رویان در انسان (۱و ۱۵)، موش (۱۰) و گاو (۱۳و ۱۹) استفاده شده است.

کاربرد دیگر کشت انفرادی تخمک‌ها و جنین‌ه ا در مواردی است که تخمک‌ها از یک دام مشخص اخذ شده و در فرآیند تولید آزمایشگاهی جنین وارد می‌شوند. در این موارد به‌ویژه در مورد نشخوارکنندگان کوچک تعداد تخمک اخذ شده از یک دام غالباً اندک است. از این رو به دلیل اهمیت مشخص بودن والدین جنین‌ها، کشت انفرادی یـ ا در تعداد کمتر از استاندارد کشت گروهی تخمک‌ها و جنین‌ها (۱۰- ۱۵ تخمک در هر قطره یا ۵-۶ جنین در هر قطره) ضرورت دارد؛ لیکن نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داده است که تراکم جنین‌ها یا نسبت تعداد جنین به حجم محیط کشت در کمیت و کیفیت جنین-های کشت شده در آزمایشگاه تأثیرگذار است و نیز کشت انفرادی جنین‌ها یا افزایش حجم قطرات محیط کشت می‌تواند تأثیرات منفی عمده‌ای بر قابلیت تکاملی جنین‌ها داشته باشد (۷).

با توجه به مطالب گفته شده و با توجه به این که تاکنون روش مناسبی برای کشت انفرادی جنین‌های گوسفند تنظیم نشده است، در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا به یک روش مناسب برای کشت انفرادی جنین‌های گوسفند با هدف استفاده در مطالعات متابولومیک یا دیگر زمینه‌های ذکر شده برسیم.

مواد و روش کار

تخمدان گوسفندان در کشتارگاه جمع‌آوری شد و در محلول سالین نرمال در دمای ۳۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه، فولیکول‌های با قطر ۶-۲ میلی‌متر با پمپ مکنده آسپیره شدند و تخمک-هایی حداقل سه لایه سلول کوموا وس متراکم در اطراف داشتند و سیتوپلاسم آن‌ها به صورت یک‌نواخت دانه‌دار بود، انتخاب شده و در قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی (محیط کشت Medium199 بافر شده با بیکربنات و دارای ۰/۳۳ میلی‌مول سدیم پیرووات، ۰/۰۵ واحد در میلی‌لیتر FSH و ۱۰ درصد FBS) در زیر روغن معدنی در آنکوباتور با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن در اتمسفر مرطوب، کشت داده شدند.

پ س از ۲۴-۲۲ ساعت، تخمک‌ها به قطرات F-TALP (Tyrode's albumin lactate pyruvate) (۱۱۴ میلی‌مول کلرید سدیم، ۳/۲ میلی‌مول کلرید پتاسیم، ۲۵ میلی‌مول بیکربنات سدیم، ۰/۴ میلی‌مول $NaH_2PO_4.H_2O$، ۲/۸ میلی‌مول لاکتات سدیم، ۲ میلی‌مول $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۵ میلی‌مول $MgCl_2.6H_2O$، ۰/۳۳ میلی‌مول پیرووات سدیم، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین جی، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA) انتقال داده شدند و تا زمان اضافه کردن اسپرم در انکوباتور با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی-اکسیدکربن و رطوبت حداکثر نگه‌داری شدند. ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم (منجمد-ذوب شده) روی ۱ میلی‌لیتر هیستوپرپ قرار داده شد و ۵ دقیقه در دور ۳۰۰ سانتریفوژ شد. پلت حاصل پس از همگن‌سازی با محیط sperm-TALP با غلظت نهایی ۱×۱۰^{۶} سلول اسپرم متحرک در میلی‌لیتر به قطرات حاوی تخمک‌ها اضافه گردید. حدود ۲۴ تا ۲۶ ساعت پس از اضافه کردن اسپرم، زیگوت‌های احتمالی در محیط IVC-SOF (synthetic oviductal fluid) (۱۰۷/۷ میلی‌مول کلرید سدیم، ۷/۱۶ میلی‌مول کلرید پتاسیم، ۲۵ میلی‌مول بیکربنات سدیم، ۱/۱۹ میلی‌مول KH2PO4، ۳/۳ میلی-مول لاکتات سدیم، ۱/۷۸ میلی‌مول CaCl2.2H2O، ۰/۵ میلی‌مول MgCl2.6H2O، ۱/۵ میلی‌مول گلوکز، ۰/۳۳ میلی‌مول سدیم پیرووات، ۲ درصد محلول آمینواسیدی BME، ۱ درصد محلول آمینواسیدی ME M، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین جی، ۱۰۰

www.SID.ir
نشریه علوم دامگاهی دامپزشکی ایران

میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA) منتقل و در انکوباتور دارای ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۶ درصد اکسیژن در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد با حداکثر رطوبت نگه‌داری شدند. حجم قطرات کشت و نیز تعداد زیگوت در هر قطره براساس گروه‌بندی-های طراحی آزمایش بود. ۴۸ ساعت بعد با توجه به گروه-بندی جنین‌ها، ۱۰ یا ۵ درصد سرم جنین گاو (FBS) به قطرات حاوی جنین‌ها اضافه شد. میزان تسهیم در روز ۳ و میزان تشکیل بلاستوسیست در روزهای ۶ و ۷ کشت جنین محاسبه شد (روزصفر= روز لقاح).

پژوهش حاضر با هدف تنظیم یک روش کارآمد برای کشت انفرادی جنین‌های گوسفند در قالب دو آزمایش انجام شد. در آزمایش اول به منظور بررسی تأثیر تعداد زیگوت‌های کشت داده شده در هر قطره و همچنین حجم قطرات محیط کشت بر تکامل جنین‌های گوسفند، در مجموع تعداد ۵۹۶ تخمک بالغ شده و بارور شده در ۶ تکرار آزمایش شدند؛ پس از لقاح، جنین‌های احتمالی به صورت تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند:

گروه ۱: جنین‌ها به صورت دسته‌های ۶ تایی در قطره‌های ۲۰ میکرولیتری محیط کشت، قرار داده شدند.

گروه ۲: جنین‌ها به صورت انفرادی در قطره‌های ۲۰ میکرولیتری محیط کشت، قرار داده شدند.

گروه ۳: جنین‌ها به صورت انفرادی در قطره‌های ۱۰ میکرولیتری محیط کشت، قرار داده شدند.

در این آزمایش در روز سوم پس از شروع کشت جنین‌ها، سرم به میزان ۱۰ درصد به قطرات کشت اضافه شد.

در آزمایش دوم با هدف بررسی تأثیر میزان سرم اضافه شده در روز سوم به قطرات ۱۰ میکرولیتری حاوی یک جنین بر تکامل جنین‌های گوسفند، در مجموع تعداد ۱۷۶ تخمک بالغ شده و بارور شده در ۴ تکرار آزمایش شدند؛ پس از لقاح، جنین‌های احتمالی به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند:

گروه ۱۰٪: جنین‌ها به صورت انفرادی در قطره‌های ۱۰ میکرولیتری محیط کشت، قرار داده شدند و در روز سوم به قطره‌های محیط کشت ۱۰ درصد سرم اضافه شد.

گروه ۵٪: جنین‌ها به صورت انفرادی در قطره‌های ۱۰ میکرولیتری محیط کشت قرار داده شدند و در روز سوم به قطره‌های محیط کشت، ۵ درصد سرم اضافه شد.

تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار IBM SPSS ویرایش ۲۲ و با روش آماری مربع کای یا تست دقیق فیشر (هر جا که مناسب بود) انجام شد. اختلاف در سطح $P<0/05$ معنی-دار تلقی گردید.

نتایج

نتایج آزمایش اول در جدول ۱ درج شده است. میزان تسهیم زیگوت‌ها در روز سوم میان گروه‌ها تفاوت معنی-داری نداشت. تعداد کلی بلاستوسیت‌ها، تعداد بلاستوسیست‌های اولیه، متسع و تفریخ شده در روز ۶ اختلاف معنی‌دار نداشت. تعداد کلی بلاستوسیست‌ها در روز ۷ بین گروه اول با دوم و بین گروه دوم با سوم اختلاف معنی‌دار نداشت ولی تعداد کلی بلاستوسیست‌ها بین گروه اول با سوم در روز ۷ اختلاف معنی‌دار نشان داد (به ترتیب، ۳۵/۲ درصد در مقابل ۵۰/۵ درصد) ($P<0/05$). تعداد بلاستوسیست‌های اولیه، متسع و تفریخ شده در روز ۷ بین سه گروه اختلاف معنی‌دار نداشت.

www.SID.ir

جدول ۱- تأثیر حجم قطره و تعداد زیگوت‌های کشت شده در هر قطره بر تکامل جنینی در گوسفند

گروه‌ها	تعداد تخمک	تعداد تسهیم شده (٪)	بلاستوسیست روز ۶			بلاستوسیست روز ۷			
			تعداد کلی (٪)	تعداد بلاستوسیست اولیه (٪)	تعداد بلاستوسیست متسع (٪)	تعداد کلی (٪)	تعداد بلاستوسیست اولیه (٪)	تعداد بلاستوسیست متسع (٪)	تعداد بلاستوسیست تفریخ شده (٪)
۱	۳۲۷	۱۹۵ (۵۹/۶)	۸۸ (۲۶/۹)	۳۳ (۳۷/۵)	۵۵ (۶۲/۵)	۱۱۵[a] (۳۵/۲)	۲۸ (۲۴/۳)	۴۸ (۴۱/۷)	۳۹ (۳۳/۹)
۲	۶۷	۴۱ (۶۱/۲)	۱۹ (۲۸/۴)	۹ (۴۷/۴)	۱۰ (۵۲/۶)	۳۱[ab] (۴۶/۳)	۹ (۲۹/۰)	۱۵ (۴۸/۴)	۷ (۲۲/۶)
۳	۲۰۲	۱۳۱ (۶۴/۹)	۶۴ (۳۱/۷)	۲۲ (۳۴/۴)	۴۲ (۶۵/۶)	۱۰۲[b] (۵۰/۵)	۱۹ (۱۸/۶)	۴۷ (۴۶/۱)	۳۶ (۳۵/۳)

[ab] نمایانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون است.

گروه ۱: جنین‌ها به صورت دسته‌های ۶ تایی در قطره‌های ۲۰ میکرولیتری محیط کشت قرار داده شدند.

گروه ۲: جنین‌ها به صورت انفرادی در قطره‌های ۲۰ میکرولیتری محیط کشت قرار داده شدند.

گروه ۳: جنین‌ها به صورت انفرادی در قطره‌های ۱۰ میکرولیتری محیط کشت قرار داده شدند.

نتایج آزمایش دوم در جدول۲ درج شده است. میزان تسهیم زیگوت‌ها در روز سوم، تعداد کلی بلاستوسیست‌ها، تعداد بلاستوسیست‌های اولیه، متسع و تفریخ شده در روز ۶، بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت. تعداد کلی بلاستوسیست‌ها و تعداد بلاستوسیست‌های اولیه در روز ۷ میان دو گروه ۱۰٪ و ۵٪ اختلاف معنی‌دار داشت (به ترتیب، ۵۷ درصد در مقابل ۳۴/۶ درصد و ۱۶/۹ درصد در مقابل ۴۴/۴ درصد، P<۰/۰۵).

جدول ۲- تأثیر میزان سرم اضافه شده در روز سوم به قطرات ۱۰ میکرولیتری حاوی یک جنین بر تکامل جنین‌های گوسفند

گروه‌ها	تعداد تخمک	تعداد جنین تسهیم شده (٪)	بلاستوسیست روز ۶			بلاستوسیست روز ۷			
			تعداد کلی (٪)	تعداد بلاستوسیست اولیه (٪)	تعداد بلاستوسیست متسع (٪)	تعداد کلی (٪)	تعداد بلاستوسیست اولیه (٪)	تعداد بلاستوسیست متسع (٪)	تعداد بلاستوسیست تفریخ شده (٪)
۱۰٪	۱۱۴	۷۲ (۶۳/۲)	۳۷ (۳۲/۵)	۱۱ (۲۹/۷)	۲۶ (۷۰/۳)	۶۵[a] (۵۷/۰)	۱۱[a] (۱۶/۹)	۳۲ (۴۹/۲)	۲۲ (۳۳/۸)
۵٪	۵۲	۳۰ (۵۷/۷)	۱۰ (۱۹/۲)	۶ (۶۰/۰)	۴ (۴۰/۰)	۱۸[b] (۳۴/۶)	۸[b] (۴۴/۴)	۸ (۴۴/۴)	۲ (۱۱/۲)

[ab] نمایانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون است.

گروه ۱۰٪: جنین‌ها به صورت انفرادی در قطره‌های ۱۰ میکرولیتری محیط کشت قرار داده شدند و در روز سوم به قطره‌های محیط کشت، ۱۰ درصد سرم اضافه شد.

گروه ۵٪: جنین‌ها به صورت انفرادی در قطره‌های ۱۰ میکرولیتری محیط کشت قرار داده شدند و در روز سوم به قطره‌های محیط کشت، ۵ درصد سرم اضافه شد.

www.SID.ir
نشریه علوم دامگاهی دامپزشکی ایران

بحث

پژوهش حاضر با هدف تنظیم یک روش کارآمد برای کشت انفرادی جنین گوسفند با حداقل دستکاری جنین‌ها در طی مراحل رشد انجام شد. نتایج نشان داد که کشت جنین به مدت ۷ روز در محیط SOF بدون تعویض محیط و به صورت کشت انفرادی جنین در قطرات ۱۰ میکرولیتری محیط کشت و نیز اضافه کردن ۱۰ درصد سرم در روز سوم، در مقایسه با کشت گروهی جنین‌ها و یا اضافه کردن ۵ درصد سرم به محیط کشت، میزان بلاستوسیست بهتری دارد.

پیش از این پژوهش‌هایی در زمینه مقایسه کشت انفرادی رویان گاو در مقایسه با کشت گروهی انجام شده بود. نتایج برخی از مطالعات نشان‌دهنده تأثیر منفی کشت انفرادی بر تکامل جنین‌ها (۵ و ۱۱) و نتایج برخی دیگر نشان‌دهنده عدم تفاوت این روش با روش کشت گروهی است (۳ و ۱۹). در شرایط درون‌تنی، جنین در درحال رشد پستانداران ارتباطات اتوکرین، پاراکرین و اندوکرین پیچیده‌ای با لوله تولیدمثلی دارد (۱۷) و متقابلاً لوله رحمی و سلول‌های پوششی رحم قادر به فراهم کردن شرایط حمایتی مناسب برای رشد و بقای جنین هستند (۲و ۲۳). در شرایط رشد برون‌تنی یا آزمایشگاهی، بسیاری از مطالعات بر اهمیت ارتباطات اتوکرین و پاراکرین میان جنین‌ها به عنوان جایگزین ارتباطات پیچیده درون‌تنی تاکید کرده‌اند (۱۶و ۱۸). نشان داده شده است که جنین-های گاو در کشت گروهی به دلیل تولید فاکتور رشد مشتق از پلاکت اثر تحریکی بر رشد همدیگر دارند (۲۷) و همین کمبود در رشد انفرادی به عنوان دلیلی برای کاهش

در طی فرایند رشد آزمایشگاهی رویان به منظور تأمین فاکتورهای رشد و انرژی، سرم جنین گاو (FBS) به صورت روتین به محیط اضافه می‌شود و بسیاری از مطالعات، استفاده از سرم در فرایند IVC را ضروری می-دانند. حذف سرم از محیط کشت رویان گوسفند با اختلال در روند تکاملی جنین همراه بوده است؛ البته نشان داده شده است که حضور سرم در طی روند کشت جنین دارای تأثیر دو مرحله‌ای است به صورتی که حضور آن در ۳ روز ابتدایی کشت رویان گوسفند موجب اختلالات تکاملی و کند شدن روند رشد رویان می‌شود (۲۲)؛ ولی در مراحل میزان تولید و تفریخ بلاستوسیست عنوان در این روش یاد شده است. در مطالعه حاضر بر خلاف مطالب یاد شده میزان بلاستوسیست روز ۷ در گروه کشت جنین به صورت انفرادی در قطره ۱۰ میکرولیتری به صورت معنی‌داری از گروه کشت تجمعی در قطره ۲۰ میکرولیتری بهتر بود و نتایج گروه کشت انفرادی در قطره ۲۰ میکرولیتری مابین این دو گروه قرار داشت (جدول ۱). در طی کشت گروهی با توجه به افزایش تعداد جنین‌ها در هر قطره احتمالاً تجمع مواد دفعی جنین‌ها در محیط اطراف افزایش پیدا کرده و میزان مواد مغذی و سوبستراهای انرژی نیز کاهش می‌یابد (۸ و ۹)؛ لذا در روش استاندارد مورد استفاده در آزمایشگاه ما و بسیاری از آزمایشگاه‌های دیگر برای تولید جنین در طی روند کشت حداقل یک تا دو بار محیط کشت تعویض و تازه‌سازی می‌شود. در پژوهش حاضر با توجه به این که در طول دوره کشت جنین، محیط کشت تعویض و تازه‌سازی نمی‌شد احتمالاً در کشت انفرادی در مقایسه با کشت گروهی تجمع مواد دفعی و کاهش سوبستراهای انرژی کمتر بوده و در نتیجه میزان بلاستوسیست مشخصاً افزایش پیدا کرده بود. از سوی دیگر بالاتر بودن نسبی میزان بلاستوسیت در گروه کشت جنین به صورت انفرادی در قطره ۱۰ میکرولیتری نسبت به گروه کشت انفرادی در قطره ۲۰ میکرولیتری احتمالاً به بیشتر رقیق شدن فاکتورهای مترشحه از جنین در قطرات ۲۰ میکرولیتری مرتبط است، علاوه بر این قطرات ۱۰ میکرولیتری از این نظر که به دلیل کوچک‌تر بودن تعداد بیشتری از آن‌ها را می‌توان در یک پتری‌دیش قطره‌گذاری کرد بر قطرات ۲۰ میکرولیتری ارجحیت دارند.

بعدی سبب تسریع و بهبود روند تکملی جنین می‌شود (۱۲و ۲۰). از این رو در مطالعه حاضر، سرم از روز سوم به بعد به قطرات کشت اضافه شد. در پژوهش حاضر تعداد کلی بلاستوسیست روز هفتم در گروه دریافت‌کننده ۵ درصد سرم به طور معنی‌داری کمتر از گروه دریافت‌کننده ۱۰ درصد سرم بود (جدول ۲). علاوه بر این در بلاستوسیست‌های گروه ۵ درصد سرم مشخصاً تعداد بیشتری از آن‌ها در مرحله بلاستوسیست اولیه بودند. این مسأله نشانگر اهمیت درصد سرم در محیط کشت بر تکامل جنین است.

نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران
www.SID.ir

در مجموع چنین به نظر می‌رسد در صورت نیاز به کشت انفرادی جنین‌های گوسفند، با توجه به مزایایی که پیش از این در مقدمه به آن اشاره شد، می‌توان آن‌ها را به صورت انفرادی در قطرات ۱۰ میکرولیتری بدون نیاز به تعویض و تازه‌سازی محیط کشت تا روز ۷ و فقط با اضافه کردن ۱۰ درصد سرم در روز ۳ کشت داد که این روش نتایج قابل قبولی از نظر میزان تشکیل بلاستوسیست خواهد داشت.

منابع

1- Brison, D.; Houghton, F.; Falconer, D.; Roberts, S.; Hawkhead, J.; Humpherson, P.; Lieberman, B. and Leese, H.; Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. Hum. Reprod.; 2004; 19(10): 2319-2324.

2- Buhi, W.; Alvarez, I. and Kouba, A.; Secreted proteins of the oviduct. Cells Tissues Organs; 2000; 166(2): 165-179.

3- Carolan, C.; Lonergan, P.; Khatir, H. and Mermillod, P.; In vitro production of bovine embryos using individual oocytes. Mol. Reprod. Dev.; 1996; 45(2): 145-150.

4- Cordova, A.; Perreau, C.; Uzbekova, S.; Ponsart, C.; Locatelli, Y. and Mermillod, P.; Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. Theriogenology; 2014; 81(9): 1163-1173.

5- Donnay, I.; Van Langendonckt, A.; Auquier, P.; Grisart, B.; Vansteenbrugge, A.; Massip, A. and Dessy, F.; Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. Theriogenology; 1997; 47(8): 1549-1561.

6- Dunn, W.B.; Bailey, N.J. and Johnson, H.E.; Measuring the metabolome: current analytical technologies. Analyst; 2005; 130(5): 606-625.

7- Fujita, T.; Umeki, H.; Shimura, H.; Kugumiya, K. and Shiga, K.; Effect of Group Culture and Embryo-culture Conditioned Medium on Development of Bovine Embryos. J. Reprod. Dev.; 2005; advpub: 0511150024-0511150024.

8- Gardner, D.K.; Lane, M.; Spitzer, A. and Batt, P.A.; Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. Biol. Reprod.; 1994; 50(2): 390-400.

9- Gardner, D.K. and Lane, M.; Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. Biol. Reprod.; 1993; 48(2): 377-385.

10- Gardner, D.K. and Leese, H.J.; Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake. J. Exp. Zool.; 1987; 242(1): 103-105.

11- Goovaerts, I.; Leroy, J.; Van Soom, A.; De Clercq, J.; Andries, S. and Bols, P.; Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. Theriogenology; 2009; 71(5): 729-738.

12- Gutiérrez-Adán, A.; Lonergan, P.; Rizos, D.; Ward, F.; Boland, M.; Pintado, B. and De La Fuente, J.; Effect of the in vitro

www.SID.ir
نشریه علوم دامگاهی دامپزشکی ایران

embryo viability assessment methods. Mol. Reprod. Dev.; 2015; 82(11): 822-838.

20- Pinyopummintr, T. and Bavister, B.; Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. Theriogenology; 1994; 41(6): 1241-1249.

21- Pudakalakatti, S.M.; Uppangala, S.; D'Souza, F.; Kalthur, G.; Kumar, P.; Adiga, S.K. and Atreya, H.S.; NMR studies of preimplantation embryo metabolism in human assisted reproductive techniques: a new biomarker for assessment of embryo implantation potential. NMR Biomed.; 2013; 26(1): 20-27.

22- Rooke, J.; McEvoy, T.; Ashworth, C.; Robinson, J.; Wilmut, I.; Young, L. and Sinclair, K.; Ovine fetal development is more sensitive to perturbation by the presence of serum in embryo culture before rather than after compaction. Theriogenology; 2007; 67(3): 639-647.

23- Scotchie, J.G.; Fritz, M.A.; Mocanu, M.; Lessey, B.A. and Young, S.L.; Proteomic analysis of the luteal endometrial secretome. Reprod. Sci.; 2009; 16(9): 883-893.

24- Seli, E.; Robert, C. and Sirard, M.-A.; OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. Mol. Hum. Reprod.; 2010; 16(8): 513-530.

25- Shirazi, A.; Nazari, H.; Ahmadi, E.; Heidari, B. and Shams-Esfandabadi, N.; Effect of culture system on survival rate culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. Theriogenology; 2001; 55(5): 1117-1126.

13- Khurana, N.K. and Niemann, H.; Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. Biol. Reprod.; 2000; 62(4): 847-856.

14- Lane, M. and Gardner, D.K.; Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. Hum. Reprod.; 1992; 7(4): 558-562.

15- Marhuenda-Egea, F.C.; Gonsálvez-Alvarez, R.; Martínez-Sabater, E.; Lledó, B.; Ten, J. and Bernabeu, R.; Improving human embryos selection in IVF: non-invasive metabolomic and chemometric approach. Metabolomics; 2011; 7(2): 247-256.

16- O'Neill, C.; The potential roles for embryotrophic ligands in preimplantation embryo development. Hum. Reprod. Update.; 2008; 14(3): 275-88.

17- O'Neill, C.; The potential roles for embryotrophic ligands in preimplantation embryo development. Hum. Reprod. Update.; 2008; 14(3): 275-288.

18- Paria, B. and Dey, S.; Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci.; 1990; 87(12): 4756-4760.

19- Perkel, K.J.; Tscherner, A.; Merrill, C.; Lamarre, J. and Madan, P.; The ART of selecting the best embryo: A review of early embryonic mortality and bovine

www.SID.ir

of vitrified bovine embryos produced in vitro. Cryobiology; 2009; 59(3): 285-90.

26- Steptoe, P.C. and Edwards, R.G.; Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet; 1978; 2(8085): 366.

27- Thibodeaux, J.; Del Vecchio, R. and Hansel, W.; Role of platelet-derived growth factor in development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. J. Reprod. Infertil.; 1993; 98(1): 61-66.

www.SID.ir

Arch

Vol.14/No.1
Spring-Summer 2020

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2020; 14(1): 65-72.

Setting up an efficient individual ovine embryo culture system in comparison with conventional method

Davoodian, N.[1*]; Ahmadi, E.[1]

1. Assistant Professor, Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Received: 4 February 2019 ***Accepted:*** 19 October 2019

Summary

The development of an ovine *in vitro* embryo production system where individual embryos could be followed through to the blastocyst stage would be of interest to several fields of study and would allow us to characterize developmentally competent embryos through non-invasive analysis of the metabolite constituents of their corresponding culture media. The present study was designed to establish an individual ovine embryo culture system, with embryo development rates similar to that observed under grouped culture conditions. After IVM and IVF, presumptive zygotes were cultured in groups or individually, either in 20 and 10 microliter drops. Cleavage and blastocyst rates at days 3, 6 and 7 were evaluated. Moreover, the effect of 5 or 10 percent fetal calf serum added to individual culture at day 3, were evaluated. No refreshing was made. Cleavage rate, total blastocyst, early, expanded and hatched blastocyst were similar for all treatments at day 6. Total blastocyst rates at day 7 was lower in group culture than that of individually cultured and in another experiment, total blastocyst and early blastocyst rate was different at day 7 post-cultured. The results of this study show clearly that a large proportion of ovine zygotes can develop to the blastocyst stage when cultured individually, adding 10 percent fetal calf serum at day 3 and without refreshing.

keywords: ovine, embryo, individual, culture.

* Corresponding Author E-mail: davoodian.najmeh@sku.ac.ir

www.SID.ir