

عامل(های) مؤثر در کولاپس شدن بلاستوسیت 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 تفاوتی دارند. اما با بکارگیری این محیطها در کشت طولانی مدت جنین دیده می‌شود که بلاستوسیت‌های هچینگ (HGB) و هچ شده (HdB)، کولاپس می‌شوند. بطوریکه بلاستوسل آنها از بین رفته و گاه هچینگ بلاستوسیت بدخل زونا پلوسیدا برمی‌گردد. لذا به منظور مطالعه شناخت عامل(های) شرکت کننده در این فرآیند، محیطهای پایه نمکی RS_1 و RS_2 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 RS_1 و RS_2 بود. اسیدهای آمینه غیر ضروری (NEAAs)، اسیدهای آمینه ضروری (EAAs)، ویتامینها (Vits)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، 4 mg/ml ، فاکسیون 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 تک سلولی موش در $G_{1,2}$ تجاری یا $RS_1 + NEAAs$ برای ۴۸ ساعت و سپس در سه روز دیگر در $G_{2,2}$ تجاری یا $RS_2 + NEAAs + EAAs + Vits$ کشت شدند. آزمایش II-۱: جنینهای تک سلولی در RS_1 یا $RS_1 + NEAAs$ برای ۴۸ ساعت و سپس در برای RS_2 و یا $RS_2 + NEAAs + EAAs$ به مدت سه روز دیگر کشت شدند (به ترتیب گروه ۱ و ۲). آزمایش II-۲: محیط فاز دوم آزمایش II-۱ ($RS_2 + NEAAs + EAAs$) بعد از دو روز تعویض شد. آزمایش III: جنینهای تک سلولی 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 تک سلولی در $RS_1 + NEAAs$ برای ۴۸ ساعت و سپس در $RS_2 + NEAAs + EAAs$ 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 HdB و HGB در روز پنجم کولاپس می‌شوند و در روز پنجم در گروه ۱ آزمایش II-۱، جنینی کولاپس نشد ولی تعدادی از بلاستوسیتها در گروه ۲ آزمایش II-۱، کولاپس گردیدند. در ضمن تعویض محیط در آزمایش II-۲، اثر بر کاهش کولاپس شدن بلاستوسیتها نداشت. نتایج آزمایش II نیز مانند گروه ۲، آزمایش L-۱ بود. اما درصد زیادی از HdB و HGB در روز پنجم در آزمایش IV کولاپس گردیدند. بطور کلی 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 بلاستوسیتها در محیطهای کشت متوالی مؤثرند و ۲ کولاپس شدن بلاستوسیتها 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 بلاستوسیت، اسیدهای آمینه،

ماکرومولکول افزودنی

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 [۷-۱۱].

در این محیطها، جنینها در روزهای اولیه کشت (تا مرحله ۸ سلولی - مورولا) در محیط کشت حاوی اسیدهای آمینه غیر ضروری ($G_{1,2}$ یا R_1) کشت می شوند و سپس برای تکوین بیشتر به محیط حاوی همه اسیدهای آمینه، منتقل می گردند. $G_{2,2}$ یا R_2 در واقع اصطلاح اسیدهای آمینه غیر ضروری و ضروری در اینجا به استفاده و نیازهای سلولهای سوماتیک برمی گردد [۸، ۹] و بدلیل عدم شناخت کامل ما از نیازهای جنین قبل از لانه گزینی، این موضوع در مورد جنینها صدق نمی کند. بعبارت دیگر در حال حاضر مشخص نیست که کدام یک از اسیدهای آمینه برای جنین ضروری و کدام غیر ضروریند. در کل حذف اسیدهای آمینه از محیطهای کشت، مشکلی را برای تکوین آنها ایجاد نمی کند. بطوریکه با کشت جنینها در محیطهای ساده‌ای نظیر T_6 ، $M16$ و CZB ، درصد زیادی از جنینها به مرحله بلاستوسیت می رسند [۱۰]. اما گفته می شود، وجود اسیدهای آمینه در محیط کشت سبب افزایش هچینگ بلاستوسیتها (بلاستوسیتها) در حال خروج از زونا پلوسیدا) و توان زیستی (Viability) جنینها افزایش لانه گزینی و حفظ آن، پس از انتقال جنینها به رحم مادر می شود [۱۱-۱۳]. مطالعات اولیه ما نیز نشان داد که تکوین جنینهای تک سلولی موش به مرحله هچینگ بلاستوسیت 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 T_6 بطور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است [۸]. اما وقتی ما از محیطهای تجاری $G_{1,2}$ و $G_{2,2}$ برای تکوین جنینهای تک سلولی موش استفاده کردیم، از روز پنجم کشت به بعد مشاهده نمودیم که بلاستوسیتها اندک اندک کوچکتر می شود و در نهایت از بین می رود، گاه بلاستوسیتها در حال خروج از زونا پلوسیدا (هچینگ بلاستوسیتها) به داخل زونا برمی گردند و ظاهر

بلاستوسیت شبیه مورولای متراکم شده است. این رخدادها تحت عنوان کولاپس شدن بلاستوسیتها می باشند. در روز چهارم کشت بلاستوسیتها سالم هستند اما با یک روز کشت بیشتر در روز پنجم کولاپس می شوند اغلب بلاستوسیتهای کولاپس در ادامه رشد در روزهای دیگر دژنره می شوند و بنابراین این فرآیند در اغلب موارد برگشتناپذیر است. این در حالی است که کولاپس شدن بلاستوسیت بندرت در محیط کشت ساده T_6 در روز پنجم مشاهده می شود [۸]. لذا بمنظور شناخت عامل(های) مؤثر در کلاپس شدن بلاستوسیت 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 غیر ضروری 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 T_6 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 غیر ضروری (NEAAs) اضافه شد و به محیط $T_{6,1}$ مجموع اسیدهای آمینه غیر ضروری 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 ۱۰ cc رسانده می شد یا آلبومین سرم گاوی فراکسیون V فاقد اسید چرب (Sigma) بود که با غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده گردید. پنی سیلین G و استرپتومایسین (Sigma) نیز به ترتیب

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

ترکیب (میلی مولار)	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
رلفات منیزیم	۰/۴۹	۰/۴۹
بی کربنات سدیم	۲۵	۲۵
پیروات سدیم	۰/۱۰	۰/۳۲
لاکتات سدیم	۵/۸۷	۱۰/۵
گلوکز	۳/۱۵	۰/۵۰
ایتیلن دی آمین تترا استیک اسید	-	۰/۰۱
پنی سیلین G	۶۳ میلی گرم بر لیتر	۶۳ میلی گرم بر لیتر
استرپتومایسین سولفات	۵۰ میلی گرم بر لیتر	۵۰ میلی گرم بر لیتر

با غلظتهای ۶۳ و ۵۰ میلی گرم 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 Q موجود در پژوهشکده رویان تهیه شدند. پس از ساخت محیطهای کشت، اسمولاریته آنها با اندازه گیری کاهش نقطه انجماد توسط اسمومتر (Gonotec, Germany) مشخص شد و سپس با افزودن محلول کلرید سدیم به آن اسمولاریته بین ۲۶۵-۲۶۰ میلی اسمول 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 ۹ iu هورمون منوپوز انسانی (HMG, Organon) تحریک شدند. پس از ۴۸ ساعت به همان موشها ۹ iu هورمون کوریونی انسانی (hCG, Organon) تزریق گردید و بصورت تکی و یا دوتایی در کنار یک موش نر قرار داده شدند. صبح روز بعد پلاک واژنی در موش ماده نمایانگر انجام جفت گیری بود.

تهیه جنینهای تک سلولی. ۲۴-۲۵ 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 تک سلولی از سوی دیگر خارج گردیدند. سپس تمام جنینهای تک سلولی در یک قطره جمع شده و بطور تصادفی و به تعداد

تقریباً برابر در قطره های حاوی محیط کشت توزیع شدند. تمام جنینها در قطره های ۲۰ میکرو لیتری محیطهای کشت و در پتری دیشهای ۱۵×۶۰ میلی متر (Falcon) و زیر ۴-۳ میلی لیتر روغن معدنی سبک (Merk, d = ۰/۸۸ g/ml) و دمای ۳۷ سانتی گراد و CO₂ 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 طرح ریزی می شدند.

آزمایش I: تکوین جنینهای تک سلولی موش در محیطهای کشت متوالی تجاری G1.2 و G2.2 و معادل های ساختگی آنها در آزمایشگاه. به منظور ارزیابی قدرت تکوین جنینهای تک سلولی موش در محیطهای تجاری G1.2 و G2.2 (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 = R₂ (گروه I-۲) آزمایش I انجام شد. جنینهای تک سلولی موش ۴۸ h در G1.2 یا R₁ کشت شدند و سپس به R₂ یا G2.2 منتقل شده تا سه روز دیگر کشت یابند. سرم افزودنی به R₁ یا R₂، 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 تک سلولی 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

درصد تکوین جنینها به صورت تقسیم تعداد جنینهای آن مرحله خاص بر تعداد کل جنینهای تک سلولی به دست آمد و درصد بلاستوسیت‌های کولاپس شده حاصل تعداد هیچنگ بلاستوسیتها (HgB) و بلاستوسیت‌های هیچ 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 به ترتیب در گروه L_1 و L_2 (۵۴٪ و ۵۹٪) و

(۷۹٪ و ۷۵٪) از جنینها به مورولا یا مورولا + مرحله ۸ سلولی

رسیدند. علاوه بر این درصد بلاستوسیت (B)، بلاستوسیت

متسع (ExB) هیچنگ بلاستوسیت (HgB) و

بلاستوسیت‌های هیچ شده (HdB) در روزهای بعد اختلاف

معنی داری نداشت و به ترتیب ۶۵٪ و ۶۸٪ از جنینهای

تک سلولی در روز پنجم در گروه L_1 به HgB و HdB رسیدند.

همچنین درصد زیادی از HgB و HdB در هر دو گروه کولاپس

شدند (۶۷٪ در L_1 و ۷۹٪ در L_2).

آزمایش ۱. II: تکوین جنینها طی روزهای مختلف در R_{S1} و

R_{S2} (گروه ۱-۱-۱ IL) یا $R_{S1} + NEAAs$ و

$R_{S2} + NEAAs + EAAs$ (گروه ۲-۱ IL) اختلاف معنی داری

نداشت. اما تعدادی از HgB و HdB در گروه ۲-۱ IL 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 بلاستوسیتها حل نشد و ۲۲٪ از

HgB+HdB در روز پنجم کولاپس شدند. این میزان با درصد

کولاپس گروه ۲-۱ IL اختلاف معنی داری نداشت.

آزمایش III: میزان کولاپس شدن بلاستوسیتها با جایگزین

کولاپس شدن بلاستوسیتها. این آزمایش به منظور بررسی تأثیر سرم افزودنی بر کولاپس شدن بلاستوسیت انجام گردید. به همین منظور HSA جایگزین BSA در گروه ۲ آزمایش IL-۱ شد.

آزمایش IV: تأثیر محیط پایه نمکی بر فرآیند کولاپس شدن

بلاستوسیتها. برای بررسی اثر محیط پایه نمکی بر کولاپس

شدن بلاستوسیت این آزمایش طرح ریزی 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 به طور ۲۴ ساعته و به مدت

۴-۵ روز با میکروسکوپ اینورت (Wilovert, Hund) و

بزرگنمایی $10\times$ انجام شد. جنینها براساس موارد ذیل

دسته بندی شدند: جنینهای ۸ سلولی؛ جنینهای ۵-۸ سلولی جز

این دسته قرار می گرفتند، مورولا؛ جنینهای متراکم شده

(compact) که فاقد حفره بلاستوسل بودند، بلاستوسیت؛

جنینهایی که دارای حفره بلاستوسل بودند (اندازه حفره مهم

نسب و این حفره می توانست کوچک و یا بزرگ باشد).

بلاستوسیت متسع (ExB)، بلاستوسل کل جنین را اشغال

کرده بود و اندازه جنین بزرگتر شده بود. هیچنگ بلاستوسیت،

بلاستوسیت‌هایی بودند که دارای بیرون زدگی واضحی از

زوناپلوسیدا بودند. بلاستوسیت‌های هیچ شده؛

بلاستوسیت‌هایی بودند که به طور کامل از زوناپلوسیدا خارج

شده بودند. بلاستوسیت‌های کولاپس؛ بلاستوسیت‌هایی بودند

که ساختار بلاستوسیتی آنها فرو ریخته بود، بلاستوسل از بین

رفته و یا در حال از بین رفتن بود و سلولها در مرکز جمع شده

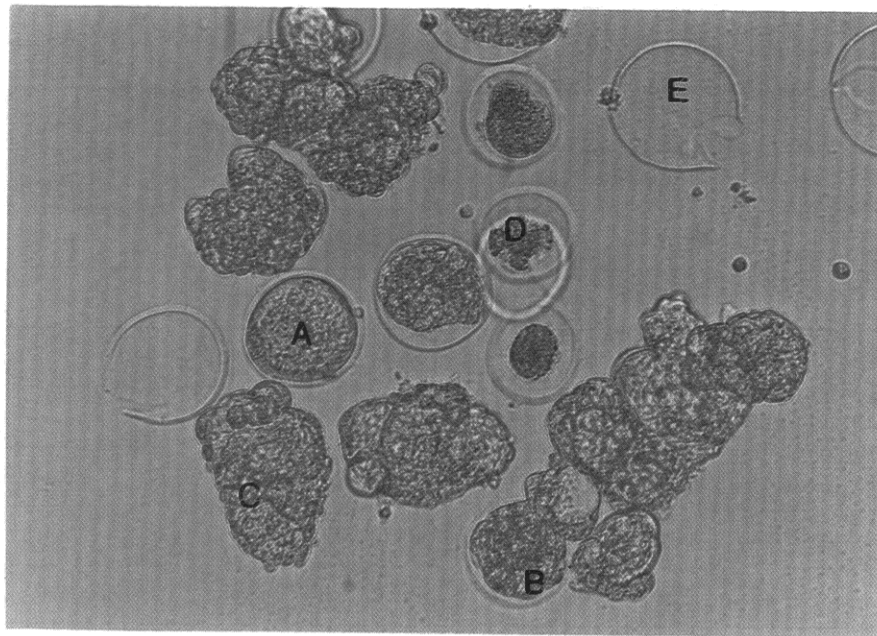
بودند و یا هیچنگ بلاستوسیت‌هایی بودند که علیرغم پاره کردن

بخشی از زوناپلوسیدا به داخل زوناپلوسیدا برگشته بودند در کل

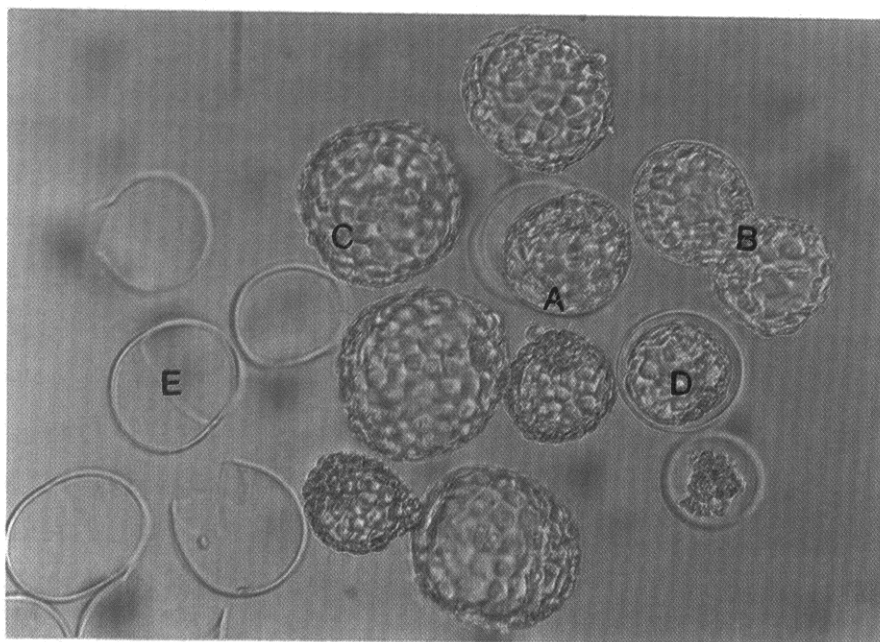
بلاستوسیت به گونه ای می شود که ظاهری مورولا مانند

(مورولای متراکم) می یابد این فرآیند در روز پنجم کشت

مشاهده شد (شکل ۱ و ۲).



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



شکل ۲: بلاستوسیت‌های سالم حاصل از ۵ روز کشت جنینهای تک سلولی (A) بلاستوسیت متسع، (B) هچینگ بلاستوسیت، (C) بلاستوسیت هچ شده، (D) بلاستوسیت متسع در حال کولاپس، (E) زوناپلوسیدا

HdB در آزمایش IV کولاپس شدند. در این مطالعه، جنینهای تک سلولی موش در محیطهای تجاری G_{1.2} و G_{2.2} (Scandinavian IVF Science, Sweden) کشت شدند و مشاهده شد که درصد زیادی از بلاستوسیت‌های هچ شده و هچینگ بلاستوسیتها در روز پنجم کولاپس شدند. این در حالی است که این فرآیند بندرت در محیط ساده T6 در روز پنجم مشاهده شد.

کردن HSA به جای BSA افزایش قابل ملاحظه‌ای یافت (۶۷٪ در مقابل ۱۵٪، $P < 0/001$). مقایسه این آزمایش با آزمایش IL-۲ که دارای ویتامین بود نشان داد که اختلاف دو گروه مزبور معنی دار نمی‌باشد (۶۷٪ در مقابل ۷۹٪ به ترتیب در گروههای III و L۲).

آزمایش IV: مقایسه تکوین جنینها طی ۵ روز کشت در گروه IL-۱-۲ و IV اختلاف معنی داری وجود ندارد و ۱۵٪ از HgB و

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

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

درصدها داخل پرانتز می باشند.

C*: هجینگ بلاستوسیتها و بلاستوسیتهای کولاپس شده، M: مورولا، B: بلاستوسیت، ExB: بلاستوسیت متسع، HgB: هجینگ بلاستوسیت، HdB: بلاستوسیت هج شده، آزمایشها: ۱: G1.2AG2.2 تجاری، ۲: R_{s1}+NEAAsAR_{s2}+NEAAs+EAA+Vits

۱: R_{s1}+NEAAsAR_{s2}+NEAAs+EAA+Vits، ۲: R_{s1}AR_{s2}، ۱: BSA شد ۷: T6.1+NEAAsAT6.2+NEAAs+EAA

۱: تعویض محیط دوم آزمایش ۱-۲، ۱: HSA، ۲: مانند ۱-۲، ۱: HSA جایگزین

a: محیط دارای سرم HSA، b: محیط دارای سرم BSA

بحث

که جنینها در روز چهارم کشت سالم هستند و در مرحله بلاستوسیت می باشند اما با یک روز کشت بیشتر یعنی در روز پنجم کولاپس می شوند احتمالاً فرآیند کولاپس حاصل شکستن اتصالات محکم بین سلولهای تروفوبلاستی است. این شکست می تواند، در نتیجه فشار بلاستوسل در حال اتساع باشد. بطوریکه با افزودن سیتوکالازین و تخریب شبکه میکروفیلانتهای اکتینی قشری (Cortical) و اتصالات محکم و حذف داور باز هم این فرآیند مشاهده می شود. بهرحال از عوامل مهم موجود در محیط کشت، ماکرومولکول افزودنی است که با توجه به نکات فوق در کولاپس شدن بلاستوسیت حائز اهمیت است [۱۶].

نتایج این مطالعه نشان داد که آلبومین سرم انسانی (HSA، آلبومین -۲۰) افزودنی به محیط کشت، مهمترین عامل در کولاپس شدن بلاستوسیت می باشد. به طوری که با جایگزین کردن آلبومین سرم گاوی (BSA)، فاقد اسید چرب و فراکسیون (V) به جای HSA در محیطهای کشت متوالی تهیه شده در آزمایشگاه، میزان کولاپس شدن بلاستوسیتها به نحو چشمگیری کاهش یافت. قابل ذکر است که منبع ماکرومولکولی

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

تعدادی از محققین در گزارشات خود، این فرآیند را به صورت برگشت پذیر گزارش کرده اند بطوریکه ظرف چند ساعت پس از کولاپس شدن، بلاستوسیت به حالت اولیه برمی گردد [۱۴، ۱۵]. حتی با انتقال بلاستوسیتهای کولاپس در گاو مشاهده شده که میزان حاملگی با انتقال بلاستوسیتهای سالم برابر است. اما در این مطالعه مشاهده شد که این فرآیند در محیطهای کشت متوالی برگشت ناپذیر است. این در حالی است

بلاستوسیست، هچینگ بلاستوسیست و افزایش توان لانه‌گزینی آنها پس از انتقالشان به رحم مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۱-۱۳، ۸]. 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 [۲۱-۲۴، ۷].

همچنین نتایج مطالعه اخیر نشان داد که برهم‌کنش اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری می‌توانند صرف‌نظر از محیط پایه‌علمی (R_S یا T_6) یا منبع ماکرومولکولی (آلبومین سرم انسانی یا آلبومین سرم گاو) در فرآیند کولاپس شدن بلاستوسیسستها 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، فینیل آلانین، آرژنین، میتوین، 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، هیستیدین، لیزین، پرولین و سیستئین محرک تکوین جنینهای هامستر می‌باشند [۲۵]. بنابراین همه اسیدهای آمینه تحریک‌کننده تکوین جنینها نمی‌باشند و حتی بعضی ممانعت‌کننده 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 [۳۰، ۳۱] نشان داده شده است. اما به‌کارگیری اسیدهای آمینه غیر ضروری ایگل $\times 1$ و اضافه کردن اسیدهای آمینه ضروری $\times 5$ تشکیل بلاستوسیسست و هچینگ بلاستوسیسستها را افزایش می‌دهد [۳۱، ۱۲]. 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 بلاستوسیسست در حضور اسیدهای آمینه ضروری سیستین و لیزین در غلظت $5/0$ میلی مولار متوقف می‌شود، در

$G_{1,2}$ 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 طرفی به طرف 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 جاروب‌کننده (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 استروئیدها، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب و کلسترول است. بنابراین ممکن است که آلبومین سرم، موادی را به محیط کشت وارد کند که می‌توانند مفید یا مضر باشند. 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 غیر بیولوژیک 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 غیر اشباعی 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 بلاستوسیسستها 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 T_6) بود. اسیدهای آمینه بمنظور افزایش درصد تشکیل

نظیر تاریخین شود [۳۹]. بالعکس در حضور گلوتامین محیط کشت، گلو تامات در بلاستوسیتستها انباشته می شود که شاید دلیل آن این باشد که گلو تامین بطور مستقیم توسط گلو مامیناز به گلو تامات تبدیل می شود. به همین ترتیب گلو تامین در بلاستوسیتسهای در حال تکوین در حضور گلو تامات در جنین انباشته می شود که شاید دلیل آن، این است گلو تامات بطور مستقیم به گلو تامین تبدیل می شود. اگرچه این را هم باید در نظر داشت که گلو تامین بطور خود به خود در محیط کشت به گلو تامات شکسته می شود و این می تواند منجر به افزایش جذب گلو تامات در جنین شود [۳۵].

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

یک احتمال دیگر در فرآیند کولاپس شدن جنینها، افزایش میزان آمونیم حاصل حذف گروه آمینی (Deamination) اسیدهای آمینه است. میزان یون آمونیم در محیط کشت حاوی ۲۰ اسید آمینه و جنین پس از ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه در سانتی گراد به ۰/۲۳۹ میلی مولار می رسد و این مقدار آمونیم بیشتر از مقدار موجود در محیط کشت و شرایطی است که تنها اسیدهای آمینه غیر ضروری وجود دارند، ۰/۱۱۲ میلی مولار [۲۸]. حضور این مقدار آمونیم در محیط کشت تکوین به بلاستوسیتست و توان زیستی آنها را پس از انتقال کاهش می دهد [۴۲].

در جهت غلبه بر این مسئله و حل معضل کولاپس شدن بلاستوسیتسها محیطهای کشت $R_{S1} + NEAAS + EAAS$ پس از ۴۸ ساعت کشت، تعویض شدند [گروه ۴] ولی باز هم روز بعد کشت درصد زیادی از بلاستوسیتسها کولاپس شدند. به

حالی که در حضور همان اسیدهای آمینه و در غلظت ۰/۵ میلی مولار، تکوین جنینها تحریک می گردد [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 پوشاننده (Mask) شود. در حمایت از این فرضیه، گفته می شود که اثر مهارى ویستامینهای 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 ریوفلاوین در حضور نیکوتین آمید ممانعت می شود [۳۲]. حتی اگر بعضی اسیدهای آمینه سمی هم نباشند، ولی ممکن است که برای یک مکانیسم انتقالی یا هم رقابت کنند و جذب سایر اسیدهای آمینه مورد نیاز جنین را متوقف کنند و بدین ترتیب سبب ممانعت از تکوین جنین شوند [۳۴، ۳۳]. مثلاً سیستم انتقال دهنده آسپاراتات و گلو تامات یکی می باشد [۳۵].

همچنین نشان داده شده است که محتوای اسید آمینه‌ای بلاستوسیتسها بطور قابل ملاحظه‌ای در حضور سایر اسیدهای آمینه موجود در محیط در حدود غلظتهایی که در اویداکت وجود دارد تا ۴۰٪ کاهش می یابد [۳۶، ۳۵]. البته لازم به ذکر است که این اثر تنها تا اندازه‌ای به رقابت برای انتقال برمی گردد. برای مثال تاریخین و گلو تامات هر کدام توسط سیستمهای وابسته به Na^+ جداگانه، یعنی به ترتیب توسط سیستمهای X^-_{AG}, β به داخل جنین منتقل می شوند و این سیستمها گلو تامین، گلیسین یا آلانین را انتقال نمی دهند [۳۸، ۳۷]. بنابراین علاوه بر رقابت برای انتقال، ظاهراً جنینهای قبل از لانه گزینی صرف نظر از وجود یک یا چند اسید آمینه در محیط کشت باید مکانیسمهای دیگری برای محدودیت در دستیابی ماگزیمم به محتوای اسید آمینه‌ای شان داشته باشند. به همین ترتیب، کاهش محتوای تاریخین بلاستوسیتسها در حضور گلیسین، آلانین یا گلو تامات نمی تواند به سادگی به تبادل اسیدهای آمینه برگردد زیرا تاریخین توسط فرآیند مستقل از Na^+ و آلانین و گلو تامات بداخل جنین منتقل می گردد [۲۸]. شاید انباشته شدن زیادی بعضی اسیدهای آمینه منجر به فقدان (loss) اسید آمینه دیگری

منابع

- 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.
- 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.
- Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, and Wood C (1998). Evaluation of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod*; 13: 169-177.
- Bavister BD (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artificats. *Hum Reprod Update*; 1: 91-148.
- 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.
- Krisner 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.
- Gardner DK, and Lane M (1997). Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update*; 3: 367-82.
- بهاروند ح، رضازاده ولوجردی م. مقایسه تکوین جنینهای موش در محیطهای وکشت متوالی ساخته شده. R1 و R2 (رویان ۱ و ۲) و معادلهای تجاری G1.2 G2.2. مجله علمی - پژوهشی حکیم، در دست چاپ.
- Eagle H (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*; 130: 432-37.
- بهاروند ح، رضازاده ولوجردی م (۱۳۷۸). تأثیر گلوکز و فسفات بر تکوین جنینهای تک سلولی موش نژاد NMRI در سه محیط کشت M16، CZB و T6. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، جلد ۳، شماره ۱، صفحات ۴۵-۵۷.
- 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.
- 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.
- 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.
- Cole RJ (1967). Cinematographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morphol*; 17: 481-90.
- Massip A (1982). The behavior of cow blastocyst *in vitro*: cinematographic and morphometric analysis. *J Anat*. 134: 399-405.
- Massip A (2001). Pulsatile activity and hatching of *in vitro* produced cow blastocysts: effects of serum supplementation. *European J Morph*; 39: 73-79.
- Maurer HR (1992). Towards serum - free, chemically defined media for mammalian cell culture. In Freshney RI (ed), *Animal*

عبارتی یونهای آمونیوم موجود در محیطهای کشت در این 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 می توان تکوین بلاستوسیتها 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 (Minimal) MEM (Essential Medium) در مطالعه قبلی [۸] نشان داد که حتی با افزودن این ویتامینها، تعداد زیادی از بلاستوسیتها کولایس می شوند.

اگرچه ویتامینها بعنوان کوآنزیم و یا پیشتاز کوآنزیمها هستند و برای انجام بسیاری از واکنشهای متابولیکی می باشند و یا حتی بعضی از آنها نظیر کولین و اینوزیتول جز ترکیبات فسفولیپیدهای غشاء هستند ولی نتوانستند که در حل مشکل کولایس شدن بلاستوسیتها کمکی نمایند. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان می دهد که فرآیند کولایس شدن بلاستوسیتها در محیطهای R_2, R_1 و $G_{1.2}, G_{2.2}$ تجاری مستقل از نوع محیط کشت پایه (T_6 یا R_S)، حضور یا عدم حضور ویتامینهای MEM، تعویض محیط است و به نظر می آید که منبع ماکرومولکولی (سرم) افزودنی به محیط کشت به طور عمده و تا اندازه کمی هم اسیدهای آمینه در کولایس شدن بلاستوسیتها مؤثر باشند.

تشکر و قدردانی. این مطالعه بخشی از طرح «ساخت محیطهای کشت متوالی و انتقال بلاستوسیت» مصوب شورای علمی پژوهشکده رویان و دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی است. بدین وسیله نویسندگان بر خود فرض می دانند تشکر فراوان خود را از همکاری بی دریغ ریاست محترم پژوهشکده، جناب آقای دکتر سعید کاظمی و معاونت محترم پژوهشی پژوهشکده جناب آقای عبدالحسین شاهرودی ابراز دارند.

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 Assist 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 development *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 McKiernan 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 culture. 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 Gardner DK (1994). Nicotinamide, an component of complex culture media, inhibits mouse embryo development *in vitro* and reduces subsequent 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 Biophys, 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 culture conditions. J Reprod Fertil; 61: 307-315.

37. Van Winkle LJ, Mann DF, Weimer BD, and Campione AC (1991). Na⁺-dependent transport to anionic amino acids by preimplantation mouse blastocyst. Biochim Biophys 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 exchange in preimplantation mouse embryos. J Reprod Fertil; 65: 367-80.

40. Van Winkle LJ, Campione AL, and Farrington BH (1990). Development of system BO₂+ 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 BO₂+ 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 ۱-۹.

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 culture to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulated development. Biol Reprod; 50: 390-400.