مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۷، شماره ۹، آذر ۱۳۹۹ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

مقایسه تأثیر سرم اتولوگ و مکمل روی (Zn) در محیط کشت MHRM بر تعداد جنین های تولید شده بـا روش IVF در موش سوری

فاطمه اوروج زاده: کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران (*نویسنده مسئول) oroujzadeh@yahoo.com

مهناز آذرنیا: استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

غدیره میرابولقاسمی: مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران

مهدی هادی: مربی، پژوهشگاه رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین شناسی، تهران، ایران، و سرمایه گذاری دارویی تامین، شرکت تحقیقاتی و مهندسی توفیق دارو، دپارتمان فناوری‌های نوین بیولوژیک، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: تکنیک‌های مربوط به IVF ازجمله روش‌های درمانی مؤثر در درمان زوج‌های نابارور هستند، بر این اساس مطالعه حاضر جهت بررسی اثر سرم اتولوگ و آلبومین سرم گاوی در حضور مکمل روی بر تعداد جنین‌های حاصل طراحی‌شده است.

روش کار: در این مطالعه پژوهشی در هر گروه از ۳ رأس موش ماده و ۱ رأس موش نر بالغ نژاد NMRI برای استحصال تخمک و اسپرم استفاده شد. اووسیت ها از اویداکت و اسپرم‌ها از دم اپیدیدیم جمع‌آوری شدند. اسپرم‌های ظرفیت یافته به قطره‌های حاوی تخمک‌های بالغ اضافه شدند. ترکیب حاصل به مدت ۶ - ۴ ساعت به‌منظور انجام لقاح انکوبه شد. طراحی گروه‌ها در ۴ گروه به ترتیب با عنوان: گروه کنترل، گروه کنترل + روی، گروه کنترل + سرم اتولوگ و گروه فاقد سرم و مکمل با سه تکرار در هر گروه انجام شد. بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون به ترتیب جنین‌های ۲ و ۴ سلولی شمارش شدند. داده‌های حاصل با روش ANOVA1 آنالیز شدند. تفاوت بین نتایج در گروه‌های مختلف در سطح $p \leq ۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها: داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد درصد جنین‌های حاصل در گروه سرم اتولوگ و گروه فاقد سرم نسبت به گروه کنترل پایین‌تر است. تعداد جنین‌ها در گروه حاوی مکمل روی نسبت به گروه کنترل افزایش داشت اما این افزایش معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج چنین به نظر می‌رسد استفاده از آلبومین سرم گاوی در کشت‌ها ضروری است اما ترکیب آن با سرم اتولوگ توصیه نمی‌شود. هم‌چنین بهتر است برای افزایش تعداد جنین‌ها از مکمل روی در محیط کشت استفاده شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه خوارزمی

کلیدواژه‌ها

سرم اتولوگ،

سرم آلبومین گاوی،

مکمل روی،

IVF

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۰۲

تاریخ چاپ: ۹۹/۰۹/۰۱

شیوه استناد به این مقاله:

Ourojzadeh F, Azarnia M, Miraolghasemi SGh, Hadi M. Comparing the effect of bovine serum albumin and Zn supplementation (Zn) in culture medium (MHRM) on the number of fetuses produced by IVF in mice. Razi J Med Sci. 2020;27(9):1-10.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

Razi Journal of Medical Sciences. 2020;27(9):1-10. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Comparing the effect of bovine serum albumin and Zn supplementation (Zn) in culture medium (MHRM) on the number of fetuses produced by IVF in mice

Fatemeh Ourojzadeh: MSc, Department of animal Biology, Faculty of biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran (*Corresponding author) oroujzadeh@yahoo.com
Mahnaz Azarnia: PhD, Department of animal Biology, Faculty of biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
Seyedeh Ghadireh Miraolghasemi: MSc, Department of animal Biology, Faculty of biological Sciences, Kharazmi University, Karaj, Iran
Mahdi Hadi: MSc, Royan Research Institute, Reproductive Medicine Research Center, Department of Embryology, Tehran,Iran, & Tamin Pharmaceutical Investment Company, Tawfiq Daroo Research and Engineering Company, Department of New Biological Technologies, Tehran, Iran

Abstract

Backgruond and Aims: Infertility is defined as the failure to achieve a clinical pregnancy after 12 months of regular intercourse. Currently, approximately 80 million couples in the world, as well as more than 1/5 million couples in Iran are infertile. For the past several decades, assisted reproductive techniques (ART) have been used to compensate for infertility in humans and valuable animals. The world advances in IVF over the past decades have been rapid and impressive, and culture media have played an important role in this success. Evidence suggests that culture medium conditions are important in IVF results and affect pre- and post-implantation development, and possibly offspring health . Due to the need of modern societies for IVF and the increasing progress of science and knowledge, attention to how this technique is implemented is becoming more and more important. What is certain is that achieving healthy fetuses and pregnancies in the very first IVF is important to save time and especially the cost of infertile couples. For this purpose, in the present study, autologous serum and zinc supplement (Zn) were used in culture medium to determine its effect on the number of embryos obtained from IVF and survival rate.

Methods: In this study, male and female NMRI mice of the same age (7 weeks) were selected. The animals were kept under standard conditions and free access to water and food. Female mice were first stimulated to ovulate with PMSG and 48 hours later with HCG. Adult oocytes were collected from Oviduct 20 hours after HCG injection. In each experimental group, 100 oocytes were exposed to sperm for fertilization. Petri dishes containing IVF drops were prepared one day before ovulation and IVF. These drops were included EmbryoCul-MHRM culture medium and 15 mg/ml bovine serum albumin (BSA). After adding BSA to the culture medium, the resulting solution was filtered by 0.2 filters under a laminar hood and the drops were coated with mineral oil to remove possible contaminants. Petri dishes containing 100 µl droplets were incubated for 12-16 hours. Culture groups of IVF were designed in 4 groups, respectively: control group (BSA), control group + zinc supplement, control group + autologous serum (AS), and group without serum and supplement; it was performed with 3 replications in each group. After 24 and 48 hours of incubation of the medium containing oocyte and sperm, 2 and 4 cell

Keywords
Autologous serum,
Bovine serum albumin,
Zinc supplement,
IVF

Received: 23/08/2020
Published: 21/11/2020

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

embryos were counted, respectively. Data were analyzed by ANOVA1 method. The difference between the results in different groups was considered significant at the level of P≤0.05. Also, the number of resulting embryos and the number of degenerated eggs in each group were determined.

Results: Considering that a significant difference was observed between the control group (BSA) and the group containing autologous serum, it seems that the use of bovine serum albumin is a better option for the increase in embryonic development rate. But a combination of both types of serum is not recommended. Also, adding zinc supplementation can help get more fetuses.

Conclusion: According to the results, it seems necessary to use of BSA in cultures, but its combination with AS is not recommended. It is also advisable to use zinc supplements to increase the number of embryos in the culture medium.

Conflicts of interest: None

Funding: Kharazmi University

Cite this article as:

Ourojzadeh F, Azarnia M, Miraolghasemi SGh, Hadi M. Comparing the effect of bovine serum albumin and Zn supplementation (Zn) in culture medium (MHRM) on the number of fetuses produced by IVF in mice. Razi J Med Sci. 2020;27(9):1-10.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

مقدمه

اکنون به طور تقریبی، بیش از هشتاد میلیون زوج درجهان و همچنین بیش از یک و نیم میلیون زوج در ایران، نابارور هستند. آمار ارائه شده بر پایه گزارش سازمان بهداشت جهانی است (۱). ناباروری به‌عنوان عدم موفقیت دررسیدن به بارداری بالینی بعد از ۱۲ ماه مقاربت منظم تعریف می‌شود (۲). در چند دهه گذشته تکنیک‌های کمک باروری یا (Assisted Reproductive Technology- ART) به منظور جبران ناباروری زوجین و حیوانات باارزش استفاده می‌شود. بسیاری از تکنیک‌های کمک باروری بهبودیافته‌اند و درنتیجه منجر به افزایش در نسبت اووسیت زیست پذیر و جنین‌های قابل‌انتقال شده است (۳). ART شامل روش‌هایی است که دست‌کاری in vitro اووسیت و اسپرم انسانی و یا جنین را در برمی گیرد که باهدف ایجاد بارداری صورت می‌گیرد (۴). از انواع تکنیک‌های کمک باروری می‌توان به لقاح آزمایشگاهی یا (in vitro IVF-Fertilization) اشاره کرد. با ظهور این فناوری در سال ۱۹۷۸، درمان ناباروری برخی از زوج‌هایی که به هر دلیلی دارای گامت بوده، ولی از داشتن فرزند محروم بودند امکان‌پذیر شد (۵). پیشرفت‌های جهان درزمینه IVF طی دهه های گذشته سریع و چشمگیر بوده و محیط‌های کشت در این موفقیت نقش مهمی ایفا کرده‌اند. تا سال ۱۹۸۰ مراکز باروری محیط‌های کشت را به‌صورت دست‌ساز می‌ساختند. امروزه محیط‌های کشت متعددی در دسترس هستند که شامل اجزای مختلف هم چون مواد مغذی، ویتامین‌ها و عوامل رشد می‌باشند. مقررات مربوط به محیط کشت IVF عمدتاً در اتحادیه اروپا موردبررسی قرارگرفته است اما در کشورهای غیراروپایی نیز بررسی‌شده است. از زمان تولد لوئیز براون، اولین فرزند متولدشده باIVF ، پیشرفت‌ها در جهان درزمینه تولیدمثل سریع بوده است. تعداد کودکانی که با تکنولوژی‌های کمک تولیدمثلی متولد می شدند به ۵ میلیون نفر رسیده است. شواهد نشان می‌دهد که شرایط محیط کشت درنتیجه IVF مهم است و بر روی تکوین قبل و بعد از لانه گزینی و احتمالاً بر روی سلامت فرزندان تأثیر دارد (۶).

دلایل مهمی برای قرار دادن سرم در محیط کشت وجود دارد. در کنار محیط کشت پایه، مواد پروتئینی موجود در سرم ها برای تسهیل برهم‌کنش‌های جنین با محیط کشت موردنیاز هستند و همچنین سرم ها شرایطی شبیه به لوله های رحمی مادر را برای جنین فراهم می‌کنند (۷). انواع فاکتورهای رشد در سرم وجود دارند که ازجمله آن‌ها می‌توان به فاکتور رشد تغییر شکل‌دهنده بتا، فاکتور رشد اپیدرمی، فاکتور رشد شبه انسولین اشاره کرد. آلبومین سرم گاوی (Bovine BSA- Serum Albumin) نیز از مهم‌ترین پروتئین‌های سرم است و باعث افزایش رشد و بقای سلولی می شود. این پروتئین به عنوان حامل املاح و لیپیدها عمل می‌کند (۸). سرم اتولوگ (Autologous Serum) نوعی از سرم است که از نمونه خون خود فرد گرفته می شود (۹). به نظر می‌رسد استفاده از سرم خود فرد دارای بیشترین سازگاری با پدیده‌های in vivo و سلولی است که می تواند اثرات مطلوبی بر جای گذارد. انتظار می رود این نوع سرم آن دسته از اثرات سویی که به‌واسطه استفاده از سرم غیراتولوگ ایجاد می‌شود را نداشته باشد. روی (Zinc: Zn) یک عنصر بسیار مهم در چرخه تولیدمثل بسیاری از گونه‌ها است. در انسان برای تشکیل و بلوغ اسپرم‌ها، برای تخمک‌گذاری و لقاح ضروری است. در حال حاضر اثبات‌شده است که مکمل روی در درمان ناباروری مردان و در کاهش عوارض دوران بارداری سودمند است (۱۰). شرایط محیط کشت در پستانداران منجر به کاهش پتانسیل تکوینی می‌شود و به‌عبارت‌دیگر بقای جنین تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد. در تحقیق حاضر سعی شده است بازدهی سیستم کشت استفاده شده برای تکوین آزمایشگاهی جنین‌های موش با افزودن مکمل روی به محیط کشت، بهبود یابد.

روش کار

این مطالعه پژوهشی (Original) با استفاده از ۳ سر موش ماده و ۱ سر موش نر نژاد NMRI در هر گروه آزمایشی انجام شد. موش‌های موردمطالعه با سن ۱۰-۷ هفته‌ای تحت شرایط کنترل‌شده (۱۲ ساعت نور/ تاریکی) و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه قوانین و اصول اخلاقی در رابطه با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. این مطالعه مورد تائید کمیته اخلاق دانشکده علوم زیستی در دانشگاه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

خوارزمی قرارگرفته است.

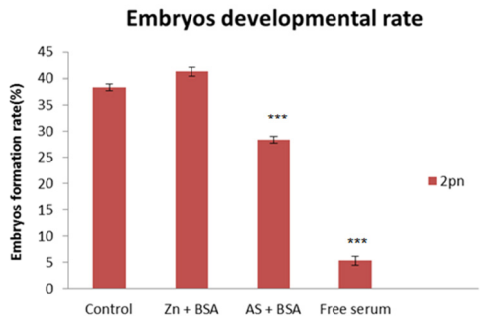
تزریق داخل صفاقی به ترتیب PMSG (Pregnant mare's serum gonadotropin) (فولیگون، هلند) در ساعت ۱۲ ظهر و ۴۸ ساعت بعدازآن HC (Human chorionic gonadotropin) (پرگنیل، آلمان) انجام گرفت. بیست ساعت بعد از تزریق HCG (ساعت ۸ صبح روز بعد)، موش‌ها به‌منظور استحصال تخمک آسان کشی شدند. اویداکت های جداشده به پتری دیش حاوی محیط EmbryoCul-MHRM (توفیق دارو، ایران) منتقل‌شده و با استفاده از دو سرنگ انسولین، تخمک‌ها همراه با توده سلول‌های کومولوس به‌آرامی از لوله رحمی (شکل ۱) خارج گردیدند.

سپس تخمک‌ها به همراه توده سلولی اطرافشان به محیط کشت قطره گذاری شده EmbryoCul-MHRM حاوی BSA(Bovine serum albumin) ۱۵ mg/ml و پوشیده شده با روغن معدنی (سیگما، امریکا) که ۱۲ ساعت انکوبه شده بود، منتقل شدند. اسپرم‌های بالغ و متحرک جداشده از دم اپیدیدیم به‌منظور ظرفیت‌یابی در محیط کشت EmbryoCul-MHRM حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA (سیگما، امریکا) به مدت یک ساعت انکوبه شد. سپس اسپرم‌های ظرفیت یافته به تخمک‌های بالغ موجود در قطره‌ها به‌منظور انجام لقاح اضافه و به مدت ۶ ساعت انکوبه شدند. به‌منظور بررسی رشد و نمو جنین در محیط‌های کشت جنینی مختلف چهار گروه آزمایشی، در هر گروه ۳ تکرار، در هر تکرار یک پلیت و در هر پلیت ۲۰-۲۵ جنین (هر پلیت دارای ۴ قطره) مطالعه شدند. این گروه‌ها عبارت بودند از: گروه کنترل با محیط کشت EmbryoCul-MHRM و حاوی آلبومین سرم گاوی (BSA)و ۳ گروه مقایسه‌ای شامل: ۱- محیط کشت پایه مشابه کنترل به‌اضافه سرم اتولوگ (کنترل + AS)، ۲- محیط کشت پایه مشابه کنترل به‌اضافه مکمل روی (کنترل + zn) و ۳- گروه فاقد سرم و مکمل روی. بدین منظور به محیط کشت گروه کنترل+ Zn، مکمل روی (سیگما البریج، امریکا) به مقدار ۱mg/ml افزوده شد. هم‌چنین از ۱۰ درصد سرم اتولوگ به‌منظور قطره گذاری در گروه کنترل+ AS استفاده گردید. جهت تهیه سرم اتولوگ بعد از جمع‌آوری خون از قلب حیوان در داخل لوله فالکون، نیم ساعت اجازه دادیم تا خون در دمای آزمایشگاه لخته شود. سپس لوله در سانتریفیوژ قرار گرفت تا سلول های خونی و سرم از هم جدا شوند. مایع زردرنگی که در بالای لوله قرار می‌گیرد همان سرم اتولوگ موشی است که برای تخمک‌های همان موش استفاده شد. سرم جهت دی اکتیواسیون به مدت ۱۰ دقیقه و با دمای ۵۶ درجه در بن ماری قرار گرفت. بررسی جنین‌های دوسلولی ۲۴ ساعت و بررسی جنین‌های چهار سلولی ۴۸ ساعت بعد از لقاح انجام شد. تعداد جنین‌های دژنره شده نیز شمارش گردید.

داده‌های حاصل از طریق آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه و سپس آزمون توکی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (V.24) آنالیز شد. پراکندگی داده‌ها نرمال بود و معنی‌داری در سطح P-value کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

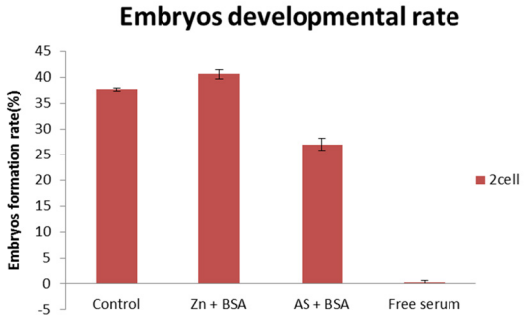
تعداد ۱۰۰ عدد تخمک بالغ از اویداکت موش های ماده به‌طور تصادفی برای هر یک از گروه‌های آزمایش در نظر گرفته شد. با توجه به نمودارهای ارائه‌شده زیر (نمودار ۱- ۴) نتایج کشت جنین‌ها تا مرحله دوسلولی (شکل ۲) نشان داد که میزان درصد تکوین جنین‌های دوسلولی در گروه BSA+AS نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنی‌دار بوده است. از سوی دیگر باوجود آن‌که اختلاف معنی‌داری به جهت افزایش درصد تکوین جنین‌های دوسلولی بین گروه حاوی Zn در مقایسه با



نمودار ۱- میانگین درصد تشکیل جنین‌ها در مرحله دو پیش‌هسته‌ای. Mean±SE, P≤0.05.

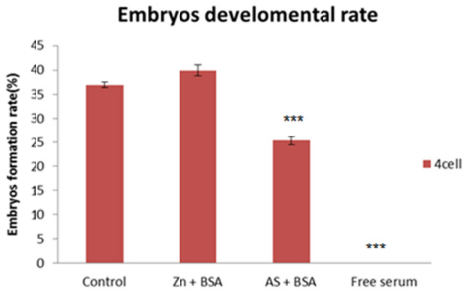
معناداری نسبت به گروه کنترل با علامت * در بالای ستون‌ها مشخص‌شده است. طبق نمودار گروه حاوی AS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. گروهی که در محیط کشت خود مکمل روی داشت نسبت به گروه کنترل افزایش داشته اما این افزایش معنی‌دار نبود. (*P<0.01 ,** P<0.05 و *** P<0.001).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]



نمودار ۲- میانگین درصد تشکیل جنین‌ها در مرحله دوسلولی. Mean±SE, P≤0.05.

معناداری نسبت به گروه کنترل با علامت * در بالای ستون‌ها مشخص شده است. طبق نمودار گروه حاوی AS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. گروهی که در محیط کشت خود مکمل روی داشت نسبت به گروه کنترل افزایش داشته اما این افزایش معنی‌دار نبود. (*P<0.01 ,** P<0.05 و *** P<0.001).

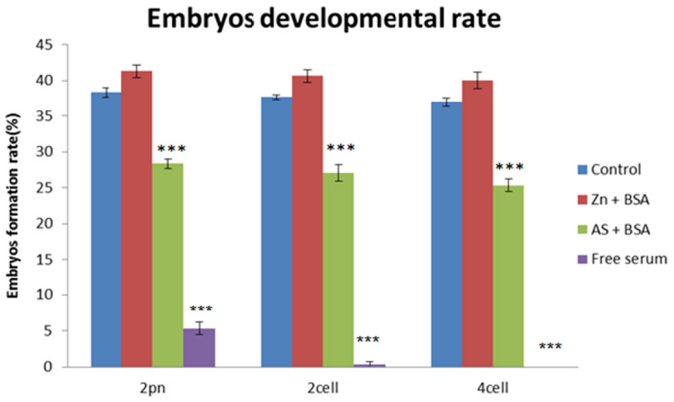


نمودار ۳- میانگین درصد تشکیل جنین‌ها در مرحله چهار سلولی. Mean±SE, P≤0.05.

معناداری نسبت به گروه کنترل با علامت * در بالای ستون‌ها مشخص شده است. طبق نمودار گروه حاوی AS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. گروهی که در محیط کشت خود مکمل روی داشتند نسبت به گروه کنترل افزایش داشته اما این افزایش معنی‌دار نبود. (*P<0.01 ,** P<0.05 و *** P<0.001).

گروه کنترل وجود نداشت اما جنین‌های گروه Zn در مقایسه با گروه کنترل درصد تکوین بیشتری را نشان دادند. نتایج نیاز جنین‌ها به BSA را نشان می‌دهند زیرا در صورت عدم وجود آن در محیط کشت تعداد جنین‌ها نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابند (نمودار ۲). هم‌چنین داده‌های به‌دست‌آمده از کشت جنین‌ها در مرحله ۴ سلولی (شکل ۳) نیز نتایج مشابهی را در مقایسه با نتایج کشت جنین‌ها تا مرحله ۲ سلولی داشت. به‌این‌ترتیب که میزان درصد تکوین جنین های چهار سلولی در گروه BSA+AS نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنی‌دار بود. حال آن‌که اختلاف معنی‌داری در میزان درصد تکوین جنین‌های چهار سلولی بین گروه حاوی Zn در مقایسه با گروه کنترل وجود نداشت. درهرحال میزان درصد تکوین جنین‌های چهار سلولی در گروه Zn در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود. لازم به ذکر است که به‌منظور مشاهده اثر فقدان آلبومین سرم گاوی در محیط کشت بر نمو جنینی، یک گروه دیگر نیز که فاقد هرگونه سرمی بود با سه بار تکرار در نظر گرفته و انجام شد که تعداد انگشت‌شماری از اووسیت ها بارور و مابقی اووسیت ها وجنین‌های 2PN ایجادشده دژنره شدند (نمودار ۳).

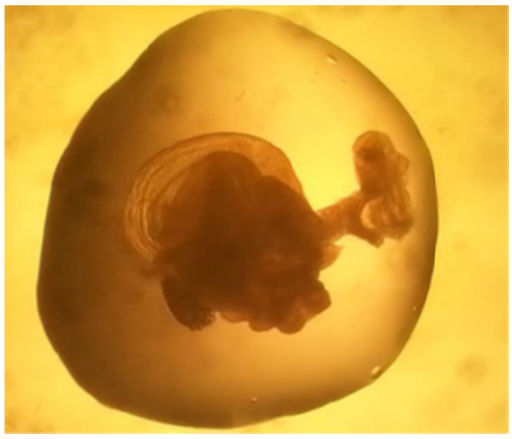
بر اساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت، وجود آلبومین سرم گاوی برای تکوین جنین ضروری



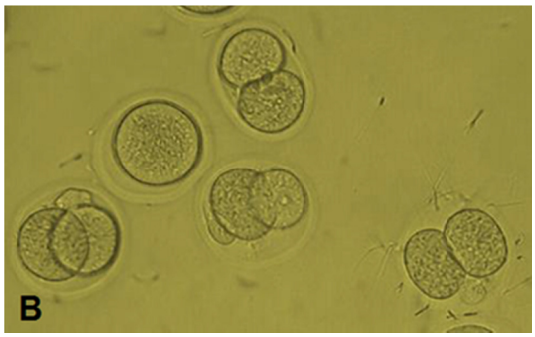
نمودار ٤- نمودار تجمیعی و مقایسه‌ای نرخ رشد و نمو جنینی از مرحله 2pn تا ۴ سلولی در محیط‌های کشت مختلف. Mean±SE, P≤0.05.

معناداری نسبت به گروه کنترل با علامت * در بالای ستون‌ها مشخص‌شده است. طبق نمودار گروه حاوی AS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. گروهی که در محیط کشت خود مکمل روی داشتند نسبت به گروه کنترل افزایش داشته اما این افزایش معنی‌دار نبود. (*P<0.01 ,** P<0.05 و *** P<0.001).

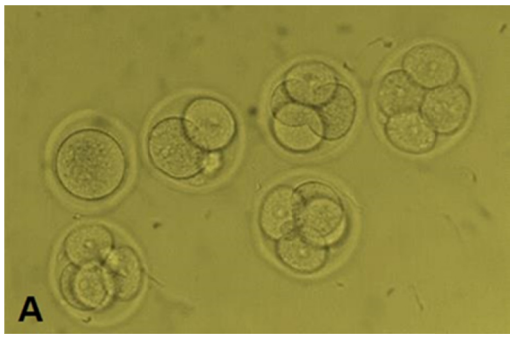
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]



شکل ۱- تورم ایجادشده در لوله رحمی در اثر تجمع توده تخمکی

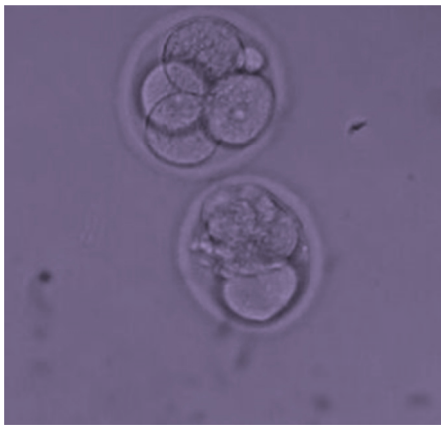


شکل ۲- جنین‌های ۲ سلولی (بزرگنمایی ۲۰۰×)



شکل ۳- جنین‌های ۴ سلولی (بزرگنمایی ۲۰۰×)

است و در صورت ترکیب آن با سرم اتولوگ، تعداد جنین‌ها کاهش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که فقدان BSA به دلیل نقش تغذیه‌ای که دارد مانع لقاح اووسیت‌ها، ایجاد فراگمانتاسیون (شکل ۴) و از دست رفتن تحرک اسپرم‌ها می‌شود. هم‌چنین افزودن مکمل روی به محیط کشت حاوی آلبومین سرم گاوی باعث بهبود تکوین روبه‌جلو جنین‌ها می‌گردد.



شکل ٤- جنین فراگمنته شده در کنار یک جنین چهار سلولی (بزرگنمایی ۲۰۰×)

بحث

محققان دریافتند حضور ۵ - ۱ درصد آلبومین سرم گاوی در محیط کشت به‌منظور جلوگیری از سخت شدن زوناپلوسیدا و درنتیجه عدم موفقیت اسپرم در نفوذ به داخل تخمک ضروری به نظر می‌رسد (۱۱). سرم ها حاوی مواد مختلفی ازجمله هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، ویتامین‌ها، پپتیدها و پروتئین‌ها هستند (۱۲). در پژوهشی که در مورد اثر آلبومین سرم گاوی بر تحرک و زنده‌مانی اسپرم اسبچه در شرایط سرد انجام شد، پس از جمع‌آوری نمونه‌های منی حیوان و تقسیم آن به چهار قسمت مساوی، هر قسمت به ترتیب با رقیق‌کننده‌های منی ترکیب شدند: رقیق‌کننده‌های فاقد BSA، رقیق‌کننده‌های حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA، رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیترBSA و رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA. پس از ۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی، اثر رقیق‌کننده‌ها بر تحرک، زنده‌مانی و فعالیت غشا بررسی شد. نتایج چنین نشان داد که تحرک در ساعت ۴۸ در رقیق‌کننده‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیترBSA در مقایسه با رقیق‌کننده‌های بدون BSA و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. همچنین رقیق‌کننده‌های ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA در مقایسه با رقیق‌کننده‌های بدون BSA و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیترBSA منجر به حفظ تحرک پیش‌رونده بالاتری شد فعالیت غشا و زنده‌مانی در رقیق‌کننده ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA در ساعت ۴۸ در مقایسه با

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

سایر رقیق‌کننده‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (۱۳). بر اساس بررسی ها آلبومین سرم گاوی موجب بهبود دوره تکامل رویانی در خرگوش می شود (۱۴). آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان منبع پروتئین در محیط کشت عمل می کند. مطالعات اثرات مطلوب BSA را در تکوین جنین و در بقای بلاستوسیست های گاو نشان می‌دهند (۱۵). در سال ۲۰۱۷ نیز مطالعه بر روی تخمک‌های بز نشان داد که با توجه به تأثیر BSA در بلوغ آزمایشگاهی، لقاح و رشد جنین بز، می‌تواند به‌عنوان مکمل بلوغ، لقاح و افزایش‌دهنده سرعت رشد تخمک در محیط کشت سودمند باشد (۱۶). مطالعه دیگری در دانشگاه بتگلادش بر روی لقاح و بلوغ آزمایشگاهی اووسیت های بوفالو در محیط کشت حاوی BSA انجام‌گرفته است. در این تحقیق گروه کنترل را محیط کشت فاقد سرم و گروه تجربی را محیط کشت دارای ۵٪ سرم قراردادند. تفاوت‌ها چشمگیر و بدین شرح بود: درصد اووسیت هایی که به مرحله متافاز۲ رسیدند در گروه کنترل ۵۸/۰۲ و در گروه حاوی سرم ۶۸/۱۰ بود. میزان لقاح طبیعی نیز در گروه کنترل ۱۹/۶۳ و در گروه حاوی سرم ۲۹/۵۲ بود. این داده‌ها چنین نشان می‌دهند که افزودن ۵ درصدی BSA در محیط‌های کشت لقاح و بلوغ تخمک، شانس بلوغ تخمک و لقاح اووسیت‌ها را افزایش می‌دهد (۱۷).

وجود مواد معدنی مانند کبالت، مس، روی، آهن، ید و... در رژیم غذایی حیوانات ضروری است (۱۸). در میان انواع مواد معدنی روی نقش مهمی در تولیدمثل دارد (۱۹) و غلظت ناکافی آن ممکن است به شکست مراحل تکوین جنین کمک کند (۲۰). مطالعه‌ای که در سال 2014 بر روی غلظت‌های مختلف Zn بر روی بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) خوک انجام‌شده نشان‌دهنده تأثیر مثبت این مکمل در افزایش تعداد تخمک‌های بالغ می‌باشد. سطح گلوتاتیون داخل سلولی با افزایش دوز روی افزایش می‌یابد و سطح گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر با افزایش دوز کاهش می‌یابد. این نتیجه را می‌توان با نقش آنتی‌اکسیدانی روی توضیح داد. همچنین غلظت کافی روی باعث کاهش شدید آسیب به DNA در سلول‌های کومولوس می‌شود (۲۱). طبق آزمایش‌ها انجام‌شده، افزودن 10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی به محیط IVM باعث جلوگیری از لقاح در اووسیت های گاو می‌شود (۲۲). با توجه به یافته‌های Kincaid، ۳ تا ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی در پلاسما سمی است (۲۳).

نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌ها قبلی، نتایج مطالعه حاضر را تائید می‌کند. احتمالاً مکمل روی در محیط کشت، با تثبیت غشای بیولوژیک، کمک به سنتز پروتئین‌ها و حفظ DNA از آسیب‌های اکسیداتیو، باعث افزایش نرخ تولید جنین‌ها می‌گردد (۲۴).

بسیاری از مواد و شرایط محیطی نیز بر نتایج ART اثرگذارند و بر رشد فولیکول، بلوغ تخمک، لقاح و رشد جنین متعاقباً تأثیر می گذارند (۲۵). قطعه‌قطعه شدن یا فراگمانتاسیون در هر دو شرایط in vitro و in vivo اتفاق می‌افتد، جایی که سلول‌های فاقد هسته با اندازه و تعداد متفاوت در کنار سلول‌های هسته‌دار در جنین یافت می‌شوند. مطالعات نشان داده اندکه جنین‌های با درصد پایین‌تر فراگمانتاسیون شانس بیشتری دررسیدن به مرحله بلاستوسیست دارند (۲۶). در مطالعه حاضر افزودن ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی باعث بهبود روند تکوین جنین‌های موش شد. همچنین گروه کنترل که حاوی سرم BSA در محیط کشت خود بود نسبت به گروه حاوی AS فاقد BSA، دارای افزایش معنی‌داری بود که با بسیاری از مطالعات قبلی سازگار است. همچنین در این مطالعه به‌صورت هم‌زمان از سرم اتولوگ و آلبومین سرم گاوی در محیط کشت استفاده شد که در این گروه نیز کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. محیط فاقد BSA هیچ جنینی به دست نمی‌دهد. این مورد مطالعات قبلی را تائید می‌کند که سرم ها تأمین‌کننده فاکتورهای رشد و پروتئین ها برای تکوین جنین هستند. حضور مکمل روی، سرم اتولوگ و آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌صورت هم‌زمان در محیط کشت نیز هیچ افزایشی در نرخ تکوین جنین‌ها نسبت به گروه کنترل نشان نداد که می‌تواند به علت برهمکنش مواد و ترکیبات موجود در سرم ها و درنتیجه کاهش اثر هرکدام از آن‌ها از طریق مکانیسم بازخورد منفی باشد. طبق نتایج به‌دست‌آمده، گروه AS+ BSA نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۰۱$) در تعداد جنین‌های حاصل بودند. نتایج حاکی از آن است که مکمل روی دارای اثری مثبت بر روی جنین های حاصل از IVF است که

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

منجر به افزایش تعداد جنین‌های به‌دست‌آمده می‌گردد. همچنین نتایج چنین نشان می‌دهند که میزان فراگمنتاسیون جنین‌ها در محیط کشت فاقد سرم و همچنین محیط حاوی سرم اتولوگ، نسبت به گروه کنترل و گروه حاوی مکمل روی بیشتر بود. احتمالاً سرم اتولوگ نتوانسته است همه نیازهای تغذیه‌ای ازجمله فاکتورهای رشد را برای جنین‌ها تامین کند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، استفاده از آلبومین سرم گاوی در تحقیقات به دلیل نقش تغذیه‌ای که دارد، ضروری به نظر می‌رسد و در صورت عدم وجود آن، جنین‌ها به دلیل کمبود مواد غذایی قادر به ادامه رشد و نمو حتی تا مرحله ۲ سلولی نخواهند بود. همچنین این مطالعه می‌تواند پایه‌ای برای مطالعات بعدی باشد تا در صورت اثبات اثر مثبت روی، از این مکمل به منظور بالا بردن نرخ تکوین جنین‌ها استفاده شود زیرا کاهش هزینه ها و صرفه جویی در وقت و زمان از اصول اولیه در کارهای تحقیقاتی به شمار می‌آیند.

ازآنجایی‌که حداکثر خونی که می‌توان از قلب یک موش سوری گرفت حدود ۲ سی سی است که بعد از سانتریفیوژ، فیلتراسیون و بن ماری درنهایت مقدار ۲۰۰ لاندا در اختیار محقق قرار می گیرد و با توجه به امکان آزمون‌وخطا در حین کار و از دست رفتن کل نمونه، پیشنهاد می‌شود از موش رت یا نمونه‌های بزرگ‌تر استفاده گردد. بدین ترتیب دقت کار بالاتر خواهد بود. از سوی دیگر بهتر است همانند آزمایشگاه های انسانی، قبل از گرفتن نمونه سرم اتولوگ، حیوان ازلحاظ بیماری‌های خونی و یا عفونی بررسی شود تا درنتیجه آن به محیط کشت سالم‌تر دسترسی داشته و بالطبع موفقیت بالاتری حاصل گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه خوارزمی تهران در سال ۱۳۹۷ هست.

References

1. WHO I. A tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. Programme on Maternal and Child Health and Family Planning, Division of Family Health. World Health Organization, Geneva. 1991.
2. Steptoe PC. Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet. 1979;11:366
3. Moussa M, Shu J, Zhang X, Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. Sci China Life Sci. 2014;57(9):903-14.
4. Farquhar C, Marjoribanks J. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. Cochrane Database Syst Rev. 2018;8.
5. Akhondi M, Behjati Ardakani Z, Arefi S, Sadri Ardakani H, Arabi M, Zarnani A, et al. [Ashnaei Ba Leghahe Tabiei, Leghah Khareje Rahemi Va Zarorat Estefade Az Gamet Jaygozin Dar Darmane Nabarvari]. Proc SID. 2007;6(4); 307-321. (Persian)
6. Chronopoulou E, Harper JC. IVF culture media: past, present and future. Hum Reprod Update. 2014;21(1):39-55.
7. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. Biol Reprod. 2003;68(1):236-43.
8. Hashemi Bani B, Razavi Sh. Osol Va Mabaniye Keshte Selol Va Mohandesiye Baft. First Edition.Esfahan: Isfahan University of Medical Sciences. 2011:55-56. (Persian).
9. Choi J, Chung JH, Kwon GY, Kim KW, Kim S, Chang H. Effectiveness of autologous serum as an alternative to fetal bovine serum in adipose-derived stem cell engineering.Cell Tissue Bank. 2013;14(3):413-22.
10. Favier AE. The role of zinc in reproduction. Biol. Trace Elem Res. 1992;32(1-3):363-82.
11. Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Sidiqi MA. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilisation procedures in sheep. Small Rumin Res. 1999;34(1):71-6.
12. Hafez ES, Hafez B, editors. Reproduction in farm animals.7th ed.south Carolina: John Wiley & Sons; 2013.p. 490-497.
13. Ghadimi V, Zhandi M. [Asare albumine serume gavi bar keifiat sperm asbche khazar teye sardsai]. Iran J Appl Anim Sci. 2015;46(2):133-139(Persian).
14. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. Bioscience. 2003;27(1):303-311.
15. Varga S, Diez C, Fernández L, Álvarez J, Katchicualula A, Hidalgo C, et al. Culture system and long-term storage of culture media in the in vitro production of bovine embryos. Acta Vet Hung. 2011;59(1):129-39.
16. Asad L, Khandoker M, Rahman A. Effect of Bovine Serum Albumin on In vitro Maturation, In vitro Fertilization and Subsequent Development of

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

Goat Embryos. J Artif Intell Res. 2017;5(6).
17. Rahman A, Khandoker M, Asad L, Saha S, Paul R, Debnath S. In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes cultured in media supplemented with bovine serum albumin. Iran J Appl Anim Sci. 2015;5(3):545-551.
18. Hostetler CE, Kincaid RL, Mirando MA. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. J Vet Sci. 2003;166(2):125-39.
19. Özkaya MO, Nazıroğlu M, Barak C, Berkkanoglu M. Effects of multivitamin/mineral supplementation on trace element levels in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF). Biol Trace Elem Res. 2011;139(1):1-9.
20. Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. Experientia; 1994. 50(7):626-40.
21. Jeon Y, Yoon JD, Cai L, Hwang SU, Kim E, Zheng Z, et al. Supplementation of zinc on oocyte in vitro maturation improves preimplatation embryonic development in pigs. Theriogenology. 2014;82(6):866-74.
22. Stephenson JL, Brackett BG. Influences of zinc on fertilisation and development of bovine oocytes in vitro. Zygote. 1999;7(3):195-201.
23. Kincaid RL. Assessment of trace mineral status of ruminants: A review. J Anim Sci. 1999;77(1):1-10.
24. Özkaya M, Nazıroğlu M, Barak C, Berkkanoglu M. Effects of multivitamin/mineral supplementation on trace element levels in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF). Biol Trace Elem Res. 2011;139(1):1-9.
25. Ghasemian F, Faraji R, Asgharnia M, Zahiri Z, Bahadori MH. The impact of different time intervals between hCG priming and oocyte retrieval on ART outcomes. Iran J Reprod Med. 2013;11(7):559.
26. Tan JH, Chen JJ, Lim LJ, Wong PS. The impact of in vitro human embryo fragmentation on blastocyst development and ploidy using Next-Generation Sequencing (NGS). Reprod Biomed Online. 2019;38(1):e23.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]