مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶

تولید رویان از طریق بالغ کردن، لقاح و کشت برون‌تنی تخمک‌ها طی سه مرحله IVM، IVF و IVC

مسعود دیدارخواه[1]*، موسی وطن دوست[2]
[1]استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند ایران
[2]استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

masooddidarkhah@birjand.ac.ir

چکیده

امروزه تولید رویان در حیوانات مزرعه‌ای از طریق سوپراوولاسیون حیوانات ماده برتر و یا از طریق بالغ کردن، لقاح و کشت برون‌تنی تخمک‌ها طی سه مرحله IVM، IVF و IVC انجام می‌شود. مشخص شده است که انتقال رویان در مراحل ابتدایی تشکیل، یعنی قبل از تشکیل بلاستوسیست، منجر به خارج شدن آن از رحم به داخل واژن دام می‌شود. در انسان تمام تلاش‌های ابتدایی به‌منظور رسیدن به مرحله بلاستوسیست با بهره گرفتن از محیط‌های کشت کلاسیک، با شکست مواجه شد. شرایط پویای موجود در درون بدن موجودات زنده به گونه‌ای است که معمولا امکان بازسازی آن در محیط‌های کشت تعریف شده و در شرایط برون‌تنی به‌طور بهینه فراهم نمی‌شود. با انجماد و نگهداری موفقیت‌آمیز اووسیت، نه تنها می‌توان گامت حیوانی را که به‌طور غیر منتظره یا بر اثر تصادف می‌میرد، نجات داد، بلکه سبب افزایش مواد اولیه برای تحقیقات بنیادی می‌شود.

کلمات کلیدی: کشت برون‌تنی، لقاح، IVF

مقدمه

برنامه سوپراوولاسیون برای انتقال جنین دارای مشکلاتی است که سبب محدود شدن استفاده‌ی آن برای تولید رویان به خصوص در گوسفند شده است. برخی از این مشکلات مانند نرخ متفاوت تخمک‌ریزی و لقاح پس از تلقیح مصنوعی، تحلیل سریع جسم زرد و تغییر در میزان جمع‌آوری رویان هنگام شستشوی رحم و مشکلات مربوط به چسبندگی اندام‌های تناسلی و غیره می‌باشد. امروزه زیگوت‌های حاصل از حیوانات برتر، پس از لقاح برون‌تنی در دسترس هستند. اما شرایط کشت بعد از لقاح برون‌تنی منجر به وارد آمدن آسیب‌های گوناگون به رویان می‌شود. نرخ تولید بلاستوسیست در آزمایشگاه در محدوده‌ی ۴۰-۳۰ درصد است و کیفیت آن‌ها پایین‌تر از رویان رشد یافته در درون بدن است. در حیوانات مزرعه‌ای و به‌منظور انتقال جنین، موفق رساندن رویان به مرحله بلاستوسیست در شرایط برون‌تنی امری اجباری می‌باشد. همین مساله و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.8.3]

همچنین طبیعت سامانه همکشتی، به‌نوعی باعث ایجاد انگیزه‌هایی برای آزمودن توانایی این روش در تولید بلاستوسیست در شرایط برون‌تنی شد. حفظ و ذخیره بلند مدت اووسیت بیمارانی که در معرض خطر از دست دادن عملکرد تخمدان هستند، یکی از اصلی‌ترین دلایل انجماد اووسیت‌های انسان است و این‌کار به حیوانات ماده با ارزش در سایر گونه‌ها نیز گسترش یافته است. همچنین انجماد موثر و کارای اووسیت‌ها می‌تواند بسیاری از تکنیک‌های معین تولید مثلی را تسهیل نماید.

جمع‌آوری تخمدان، استحصال و شستشوی اووسیت

بعد از کشتار دام‌ها، دستگاه تولیدمثلی آن‌ها از بدن خارج می‌شود. سپس تخمدان‌ها از بافت‌های نگهدارنده پیرامون جدا شده و بدون هیچ گونه تماسی با محیط پیرامون به داخل فلاسک حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی که دمای آن بین ۳۸-۳۹ درجه تنظیم شده است، منتقل می‌شود. لازم به ذکر است که در سرم فیزیولوژی مذکور، یک الیکوت ۲۵ میکرولیتری پنی‌سیلین افزوده می‌شود. بعد از رسیدن به آزمایشگاه و بدون اتلاف وقت تمام فولیکول‌های قابل رویت به کمک سر سوزن G ۲۰ که به پمپ خلا متصل می‌باشد، آسپیره شده بعد از اتمام بازیافت اووسیت‌ها، ۱۰ دقیقه زمان لازم است که تمامی اووسیت‌های بازیافت شده ته‌نشین شوند. جستجوی اووسیت‌ها، جداسازی و انتخاب آن‌ها، در زیر هود لامینار و در شرایط استریل انجام می‌شود. پتری‌دیش ها به کمک یک جسم نوک تیز از ناحیه بیرونی آن‌ها خط‌کشی می‌شود تا جستجوی اووسیت‌ها به آسانی انجام پذیرد. بعد از ته‌نشین شدن کمپلکس اووسیت-کومولوس، لوله فالکون حاوی محتوای فولیکولی به آرامی به زیر هود منتقل و توسط پیپت پاستور استریل، آن‌چه در ته لوله رسوب کرده بود به درون پتری‌دیش ریخته می‌شود. با استفاده از پیپت پاستور، بخش پایینی لوله حاوی محتویات فولیکولی کشیده شده و به داخل پتری‌دیش‌های ۱۵×۶۰ میلیمتری استریل تخلیه می‌شوند. سپس کمپلکس‌های کومولوس-اووسیت مناسب جدا شده و به‌درون پتری‌دیش که حاوی محیط بلوغ اووسیت می‌باشد، منتقل می‌شود. فقط اووسیت‌های دارای حداقل سه لایه فشرده از سلول‌های کومولوس و سیتوپلاسم تیره، انتخاب می‌شوند. برای شستشوی اووسیت‌ها، پتری‌دیش‌ها توسط محیط کشت شستشو پر شده و اووسیت‌ها به کمک پیپت پاستور ٤ بار شستشو داده می‌شوند. سپس یک بار دیگر نیز در محیط کشت بلوغ شستشو داده می‌شوند. در این هنگام اووسیت‌ها آماده انتقال به درون قطره‌های محیط کشت بلوغ می‌شوند (۵).

جمع‌آوری اویداکت، استحصال سلول‌های اپیتلیالی اویداکت و روش کشت آن‌ها

بعد از کشتار دام‌ها، دستگاه تولیدمثلی آن‌ها از بدن خارج می‌شود. هر دو اویداکت را از بافت‌های پیوندی متصل به آن‌ها آزاد می‌نماییم. بلافاصله بعد از پاک‌سازی، بایستی دو سر اویداکت‌ها را به‌وسیله ریسمانی محکم بسته، به‌گونه‌ای که هیچ ماده‌ای به آن نفوذ نکند و یا از آن خارج نشود. سپس اویداکت‌ها را در محلول PBS فاقد یون کلسیم و منیزیوم شستشو می‌نماییم. در ادامه اویداکت‌ها قبل از قرار گرفتن بر روی یخ در اتانول ۷۰ درصد غرق می‌شوند. سپس

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.8.3]

اویداکت‌ها را در محلول PBS فاقد یون کلسیم و منیزیوم غنی‌سازی شده با ۲ درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین قرار داده و این مجموعه را بر روی یخ گذاشته و به آزمایشگاه منتقل می‌نماییم. بعد از رسیدن به آزمایشگاه و قبل از باز نمودن ریسمان‌های مسدود کننده موجود در دو انتهای اویداکت، زیر هود لامینار اویداکت‌ها در اتانول و سپس در محلول PBS فاقد یون کلسیم و منیزیوم شستشو داده می‌شوند. سپس ناحیه آمپولا را به سه قسمت مساوی تقسیم نموده و به آرامی و به کمک دو پنس با حرکت مالشی-کششی، سلول‌های اپیتلیالی اویداکت را از آن خارج می‌نماییم. سلول‌ها به‌صورت یک خمیر زرد رنگ در ظرف کشتی که حاوی TCM199 غنی‌سازی شده با ۲ درصد سرم گاوی (BSA) و ۰/۲۵ mg/mL جنتامایسن می‌باشد، تخلیه می‌شوند. قبل از این‌که سوسپانسیون سلولی به دست آمده را ۲ مرتبه از سر سوزن سایز G ۳۰ عبور دهیم، می‌بایست ۱۵ مرتبه با سرسمپلر ۱۰۰۰ میکرولیتری عمل پیپتینگ را برروی آن‌ها اعمال نماییم. بعد از سه مرحله شستشو که بعد از هر مرحله شستشو ۲۵ دقیقه به سلول‌ها اجازه می‌دهیم که در محیط کشت در انکوباتور ته‌نشین شوند، یک الیکوت از سوسپانسیون سلولی به‌واسطه ۱۵ مرتبه عبور از سرسوزن سایز G ۳۰ از هم جداسازی می‌شوند تا مورد سنجش تعداد سلول قرار بگیرند. هر الیکوت از مجموعه سلول‌های حاصل از یکی از قطعات ۳ گانه جدا شده از آمپولا حاصل می شود. زنده بودن سلول‌ها در زمان کشت به‌واسطه رنگ‌آمیزی با رنگ تریپان‌بلو مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. سلول‌های اپیتلیالی اویداکت در چاهک‌های ظرف کشت ٤ خانه کشت داده می‌شود. غلظت سلول‌ها 10^6 در هر ۸۰۰ میکرولیتر TCM-199 غنی‌سازی شده با ۰/۲۵mg/m سرم گاوی ۲ درصد در نظر گرفته می‌شود. سلول‌ها باید در دمای بدن دام یعنی ۳۹ درجه در مورد گوسفند و اگر نمونه‌ها گاوی می‌باشند در دمای ۳۸ درجه با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شوند. فاصله زمانی بین کشتار تا کشت نزدیک به ٦ ساعت می باشد (۱۵، ۱٦).

انجام بلوغ برون‌تنی اووسیت

اووسیت‌ها درون قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری حاوی محیط بلوغ قرار داده می‌شوند. قبل از انتقال اووسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیالی به قطره‌های کشت به مدت ۳-٤ ساعت ظرف کشت باید در انکوباتور قرار داده شود تا قطره‌ها با شرایط موجود در انکوباتور به تعادل برسند. روز قبل از کشت اووسیت، سلول‌های اپیتلیالی به شیوه‌ای که توضیح داده شد، آماده و در انکوباتور قرار داده می‌شوند. پس از انتقال اووسیت‌ها به قطره‌های کشت، ۱۰۰-۱۵۰ دسته سلول اپیتلیالی به قطره‌ها منتقل می‌شوند و روی قطره‌ها با روغن معدنی پوشانده می‌شود. سپس پتری‌دیش حاوی قطره‌های همراه با اووسیت و سلول‌های اپیتلیالی، به‌درون انکوباتور با ۵ درصد گاز دی‌اکسیدکربن، دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و ۹۵ درصد رطوبت، قرار داده می‌شوند. مدت زمان لازم جهت وقوع بلوغ برون‌تنی معادل ٢٤-٢٧ ساعت می‌باشد (۵). برای کشت اووسیت‌ها در گروه شاهد، تمام مراحل قبل را انجام می‌دهیم با این تفاوت که در قطره‌های کشت، از هیچ گونه سلول همراه استفاده نمی‌شود.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.8.3]

آزمودن میزان بلوغ زوناپلوسیدا به واسطه روش هضم آنزیمی (میزان سخت شدن زونا پلوسیدا)

بعد از زمان لازم جهت ایجاد بلوغ برون‌تنی، نیمی از اووسیت‌ها به‌صورت تصادفی به منظور آزمون سختی زوناپلوسیدا انتخاب می‌شوند. اووسیت‌ها به سرعت در DPBS شستشو شده و سپس به قطره‌های ۵۰µl حاوی ۰/۵ درصد (wt/vol) پروناز محلول در DPBS منتقل نموده تا مورد از نظر زمان لازم جهت هضم شدن زوناپلوسیدا به‌واسطه پروناز، مورد ارزیابی قرار گیرند. زمان حل شدن زوناپلوسیدا به‌واسطه ناپدید شدن زونا به کمک مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ و در شرایطی که ظرف کشت روی صفحه گرم (۳۷ درجه سانتیگراد) قرار دارد، محاسبه می‌شود. این زمان ناپدید شدن زونا به عنوان زمان حل شدن آن در نظر گرفته می‌شود (٤).

آماده‌سازی اسپرم

اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی در TCM 199 که با Earle's salts مکمل‌سازی شده‌اند، رقیق‌سازی می‌شود. pH این محلول در نقطه ۷/۸ تنظیم می‌شود. سپس این مخلوط به مدت ۲ دقیقه با دور ۲۰۰g سانتریفیوژ می‌شود. بعد از سانتریفیوژ، محتوای رویی لوله فالکن تخلیه شده و صفحه ته‌نشین شده در کف لوله فالکن تخلیه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۸/۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود (۵).

تهیه قطره لقاح و روش لقاح

محلول لقاح از قبل در آزمایشگاه تهیه شده است، به‌طوری که هر قطره لقاح حاوی ۱۲ میکرومول KCl، ۲۵ میکرومول $NaHCO_3$، ۹۰ میکرومول NaCl، ۰/۵ میکرومول NaH_2PO_4، ۰/۵ میکرومول $MgSO_4$، ۱۰ میکرومول سدیم لاکتات، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA بدون اسید چرب، ۵۰ میکروگرم جنتامایسین و ۵ میکرومول کافئین است. در هر قطره لقاح با حجم ۹۰ میکرولیتر، ۱۰ تا ۲۰ عدد COC بالغ شده اضافه می‌شود. سپس با ۱۰ میکرولیتر از اسپرم انکوبه شده مخلوط می‌شود. بعد از این مرحله در مورد گروه تیمار ۱۰۰–۱۵۰ دسته از سلول‌های اپیتلیومی اویداکت که روز قبل تهیه شده است را به قطره لقاح اضافه می‌نماییم. غلظت نهایی اسپرم‌ها در هر قطره 10^6 است. در هر پتری‌دیش ۹ قطره لقاح قرار داده می‌شود. بعد از سپری شدن دوره انکوباسیون ۲٤ برای گروه شاهد و دو دوره ٤ و ٦ ساعته برای گروه‌های تیمار با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، ۸ درصد CO2 و رطوبت بالای ۹۵ درصد، اسپرم‌ها با COCها، مجموعه کومولوس‌ها و اسپرم‌های متصل به آن‌ها از اووسیت‌های لقاح شده به کمک پیپتینگ آهسته جدا خواهد شد (۵).

ارزیابی پارامترهای IVF به واسطه رنگ‌آمیزی با رنگ هوخست

رویان‌های فرضی (Putative Zygots) بعد از سپری نمودن زمان موردنظر که برای روند IVF در نظر گرفته شده است، با استفاده از ۰/۵ درصد (glutaraldehyde) محلول در PBS به مدت ۳۰ دقیقه فیکس می‌شوند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از رنگ HOECHS 33342 ۱درصد که در PBS حل شده است، رنگ‌آمیزی شده، بعد از رنگ‌آمیزی فرآیند شستشو انجام می‌شود. محلول شستشو شامل PBS غنی شده با ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Polyvinyl pyrrolidone می‌باشد. بعد از شستشو رویان‌ها را

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.8.3]

روی اسلاید شیشه‌ای قرار داده و با میکروسکوپ فلورسنت با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ و ٤۰۰ از نظر پارامترهای مربوط به IVF مرود سنجش قرار می‌دهیم. این پارامترها شامل: ۱) نرخ نفوذ اسپرم، ۲) تعداد اسپرم‌هایی که به زونا پلوسیدا متصل شده‌اند و ۳) تشکیل پیش هسته‌ها نر و ماده می‌باشند (۵). خلاصه روش اجرای آزمایش در جدول۱ نمایش داده شده است.

جدول۱- خلاصه روش اجرای آزمایش

مرحله و زمان مورد نظر	گروه کنترل	گروه تیمار۱	گروه تیمار۲	گروه تیمار۳	گروه تیمار٤
IVM	کشت ساده	همکشتی	همکشتی	کشت ساده	همکشتی
مدت زمان	٢٤ ساعت	٢٤ ساعت	٢٤ ساعت	٢٤ ساعت	٢٤ ساعت
IVF	کشت ساده	همکشتی	کشت ساده	همکشتی	همکشتی
مدت زمان	۱۸ ساعت (زمان استاندارد)	٦ ساعت	۱۸ ساعت (زمان استاندارد)	٤ و ٦ ساعت	٤ ساعت
IVC	کشت ساده	کشت ساده	کشت ساده	کشت ساده	کشت ساده
مدت زمان	۷-۵ روز	۷-۵ روز	۷-۵ روز	۷-۵ روز	۷-۵ روز

تولید رویان آزمایشگاهی

اووسیت‌های بارور شده به محیط کشت رویان منتقل می‌شوند. رویان‌ها در محیط کشت NCSU-37 که به کمک ٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA، ۰/۱ میکرومول سدیم پیرووات، ۲/۷۳ میکرومول لاکتات سدیم و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین مکمل‌سازی شده‌اند، کشت داده می‌شوند. یک گروه از رویان‌ها ٤۸ و گروه دیگر ۷۲ ساعت بعد از لقاح و انجام کلیواژ به محیط کشت تازه NCSU-37 که توسط ٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر BSA و ۵/۵۵ میکرومول دی-گلوکز مکمل‌سازی شده است، به‌همراه ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین منتقل می‌شوند. این رویان‌های تسهیم شده تا روز ۷ بعد از لقاح در همین محیط کشت نگهداری می‌شوند. لازم به ذکر است که هر ۲ روز یک‌بار محیط کشت تعویض خواهد شد (استفاده از محیط کشت تازه هر ۲ روز یک‌بار). برای دوره انکوباسیون از انکوباتور با تنظیمات ۳۸,۵ درجه سانتی‌گراد دما، ۵ درصد O_2، ۵ درصد CO_2 و ۹۰ درصد N_2 استفاده می‌شود.

انجماد رویان‌ها به روش شیشه‌سازی

به منظور ارزیابی کیفیت رویان‌ها بعد از یخ‌گشایی، بخشی از رویان‌های تولید شده با روش‌های متفاوت، به روش شیشه‌سازی منجمد می‌شوند. پروتوکل انجماد مورد استفاده برای شیشه‌سازی رویان‌های گوسفند، پروتکل ارایه شده توسط هانسن و همکاران است (۵).

ارزیابی کیفیت رویان‌ها

کیفیت رویان‌ها بر اساس استانداردهای بین‌المللی انتقال جنین (IETS) و روش‌های تهاجمی و غیر تهاجمی، ارزیابی کیفیت رویان چاپ شده توسط آن وسوم ارزیابی شد. تعداد کل سلول‌های بلاستوسیت، تعداد سلول‌های توده داخلی، تعداد سلول‌های تروفوکتودرم و سلول‌های آپاپتوتیک شمارش می‌شود.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.8.3]

سپس مقاومت آن‌ها در برابر انجماد از طریق بررسی میزان هچ شدن بلاستوسیت‌ها بعد از یخ‌گشایی مورد بررسی قرار خواهد گرفت، به‌طوری که پس از یخ‌گشایی، درصد زنده‌مانی، میزان هچ شدن، میزان رویان‌های از بین رفته، تعداد سلول‌های توده داخلی، تعداد سلول‌های تروفوکتودرم و هسته‌های تروفوکتودرمی قطعه قطعه شده، ارزیابی می‌شود (۵).

ارزیابی مورفولوژی بلاستوسیست‌های تولید شده در سه گروه درجه‌بندی می‌شوند

عالی: رویان هایی که زودتر از سایر هم گروهی‌های خود بلاستوسیست شدند، دارای ICM متراکم و مشخص و منظم، تروفکتودرم یکنواخت و منظم، کروی شکل، دارای سلول‌های متقارن و هم اندازه و رنگ روشن.

خوب: یکنواختی و بی‌نظمی متوسط در تروفکتودرم و ICM، وجود تعداد کمی تکه‌های بلاستومر، شکل ظاهری نامنظم.

متوسط و ضعیف: مشکلات ظاهری که کاملا مشخص باشد، مثل تکه‌های زیاد بلاستومر، مشکلات شدید در تروفکتودرم و ICM، وزیکول‌های بزرگ و متعدد، اما توده رویانی زنده.

اندازه‌گیری قطر بلاستوسیست هنگام هچ

قطر بلاستوسیست در هنگام هچ با استفاده از لنز مدرج میکروسکوپ اندازه‌گیری می‌شود.

تعداد سلول‌های رویانی

بلاستوسیست‌ها به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه در یک قطره ۱۰۰ میکرولیتری از تریتون ۰/۲ درصد قرار می‌گیرد و سپس به‌مدت یک دقیقه به قطره حاوی ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رنگ PI منتقل و پس از آن چهار بار در H-SOFBSA شستشو می‌شود. پس از شستشو، بلاستوسیست‌ها به درون محیط حاوی اتانول و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رنگ هوخست منتقل شده و برای مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در مجاورت یخ نگهداری می‌شود. در این مدت زمان، با استفاده از ترکیب وازلین و پارافین، ٤ خط به شکل لوزی به روی لام قرار داده می‌شود و بین آن‌ها یک قطره کوچک گلیسرول گذاشته می‌شود. بعد از اتمام ۱۵ دقیقه، بلاستوسیست‌ها درون قطره گلیسرول قرار داده می‌شود (به دلیل چسبیده شدن شدید بلاستوسیست‌ها در این مدت قبل از برداشتن جنین، مقداری گلیسرول به داخل پیپت کشیده شده تا جنین به دیواره نچسبد) و توسط لامل ثابت و سپس به کمک میکروسکوپ فلوروسنت شمارش افتراقی انجام می‌شود. در طی این رنگ‌آمیزی سلول‌های ترفکتودرم به رنگ صورتی و سلول‌های توده داخلی به رنگ آبی می‌شود.

روش شیشه‌سازی انجماد رویان و یخ‌گشایی

به طور خلاصه محیط پایه‌ای که برای تهیه‌ی همه محلول‌های شیشه‌سازی استفاده می‌شود، محیط DMEM است که با ۵/۵ میکرومول گلوکز، ۱۹ میلی‌مول سدیم بیکربنات، ۲۵ میکرومول هپس، ۱۰۰ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۲۰ درصد FBS مکمل می‌شود. همه‌ی مراحل متعادل‌سازی و رقیق‌سازی، در دمای اتاق (دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام می‌شود. رویان‌ها در درون قطره‌های ۱۰۰µl از محیط پایه قرار داده می‌شود (۲۰-۳۰ ثانیه)، سپس به داخل محلول متعادل منتقل می‌شوند. در اولین مرحله‌ی متعادل‌سازی، رویان‌هایی که در مرحله مرولا باشند، حدود ۵ دقیقه در قطره‌های ۱۰۰µl از

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.8.3]

محلول متعادل (۵/۱ mM اتیلن گلیکول + ۱/۰۵ mM دی‌متیل سولفات) قرار داده می‌شود. سپس برای مدت ۲ دقیقه در محلول شیشه‌سازی (۲/۷M اتیلن گلیکول + ۱/۲M دی‌متیل سولفات + ۰/۵ M سوکروز) نگهداری می‌شود. برای بلاستوسیست‌های گسترش یافته، زمان لازم برای متعادل سازی ۸ دقیقه و برای محلول شیشه‌سازی، ۳۰ ثانیه است. پس از آن، رویان‌ها با مقدار بسیار کم محلول شیشه‌سازی (کمتر از ۱/۰µl) به پایوت‌های ۰/۲۵ml پر می‌شوند. سپس محیط اضافی خارج می‌شود و سریعا درون نیتروژن مایع فرو برده می‌شود. تمام این فرآیند نباید بیشتر از ٤٥ ثانیه طول بکشد. برای یخ‌گشایی، نوک پایوت حدود ۵ دقیقه به‌طور مستقیم دورن قطره ۱۰۰µl از محلول رقیق‌سازی که حاوی ۰/۵mM سوکروز است، قرار داده می‌شود. سپس رویان‌ها دو بار در محیط پایه شستشو داده می‌شوند و تا مرحله‌ی هچ شدن در محیط IVC-SOF کشت می‌شوند.

نتیجه‌گیری

با توجه به بررسی منابع مشخص شد که تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی اثرات همکشتی با سلول‌های اپیتلیال اویداکت بر روی بلوغ برون‌تنی و لقاح برون‌تنی با رویکرد بررسی تغییرات زوناپلوسیدا، نرخ پلی‌اسپرمی، افزایش بازده تولیدات برون‌تنی رویان و کاهش زمان IVF به انجام نرسیده است. شاید یکی از دلایل منطقی در توجیه عدم وجود چنین مطالعاتی اولا به نوظهور بودن این ایده (تاثیر مواد مترشحه از سلول‌های اپیتلیال اویداکت بر IVF،IVM و IVC) بازگردد. اولین مطالعه در سال ۲۰۰۸ توسط Coy و همکاران (٤) در این راستا به انجام رسیده و پس از آن دو مطالعه در سال ۲۰۱۳ به بررسی مواد مترشحه از اپیتلیوم لوله فالوپ در انسان به انجام رسیده است (۱۳, ١٤، ۱۵ و ۱۸)، و در مرحله بعد به نبود سیستم کشت بهینه سلول‌های اپیتلیال اویداکت مربوط می‌شود. سیستم کشت به‌کار رفته تا سال ۲۰۰٦ به منظور کشت رویان به‌همراه سلول‌های اپیتلیالی، شامل سیستم کشت تک لایه سلول‌های اپیتلیالی با استفاده از روش هضم آنزیمی بوده است، که همچنان توسط برخی از آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر اساس مطالعات انجام شده، توانایی سلول‌های اپیتلیالی در حفظ ماهیت حقیقی و عملکرد یک‌پارچه آن‌ها بعد از کشت به این روش کاملا از بین می‌رود. در سال ۲۰۰٦ روش جدید در کشت سلول‌های اپیتلیالی اویداکت مطرح شد که به نوعی آن از اثرات مفید سلول‌های اپیتلیال اویداکت استفاده شده در سیستم‌های کشت همراه رویان می‌توان به توانایی غلبه این سیستم کشت رویان بر توقف تکوین رویان در مرحله ۸-۱٦ سلولی که در نشخوارکنندگان رخ می‌دهد، نام برد. همچنین استفاده از این نوع کشت رویان منجر به ارتقاء نرخ آبستنی و بازده کلی تولید رویان در شرایط برون تنی می‌شود (۷, ۸). مطالعات انجام گرفته در همستر و رت نشان داده است که سرعت انتقال رویان در اویداکت نسبت به سرعت انتقال اووسیت لقاح نیافته در اویداکت بیشتر می باشد این پدیده به صورت سیستمیک القا نمی‌شود، بلکه فرۀیندی کاملا موضعی می‌باشد که نشان دهنده این مطلب است که سلول‌های اویداکت تنها سلول‌های صادر کننده پیام به سوی رویان نیستند، بلکه به‌نوعی پاسخ دهنده به حضور رویان می‌باشند. قلابی تازه در استفاده از سامانه همکشتی در تولیدات برون تنی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.8.3]

رویان به حساب می‌آید (۱۹). اویداکت در تولید مثل پستانداررن ایفاگر نقش تعیین کننده و حساسی می‌باشد. اویداکت به‌عنوان ارگانی که چندین وظیفه را به‌عهده دارد شناخته می‌شود. این وظایف عبارتند از فراهم نمودن یک محیط بهینه برای بلوغ اووسیت، ظرفیت پذیر شدن اسپرم، لقاح و انتقال گامت‌ها و رویان (٦, ۱۰و ۱۲). اپیتلیوم اویداکت از سلول‌های مژکدار و سلول‌های ترشحی تشکیل شده است. مژک‌ها به‌طور فعال در انتقال اووسیت، اسپرم و رویان در مراحل ابتدایی رشد دخیل می‌باشند. این درحالی است که سلول‌های ترشحی مشغول به تولید موادی هستند که در فراهم نمودن ریزمحیط موجود دراویداکت موثر هستند (۱, ۲،۳، ١٦، ۱۷و ۱۱). نسبت سلول‌های مژکدار به سلول‌های ترشحی در اویداکت نشخوارکنندگان و همچنین ریخت‌شناسی این سلول‌ها در خلال چرخه فحلی به‌طور مشخصی دستخوش تغییرات می‌شود. در اینفاندیبولوم و آمپولای اویداکت تعداد سلول‌های مژکدار در اواخر فاز لوتئال افزایش می‌یابد. هرچه به سمت نواحی انتهایی آمپولا پیشروی کنیم، این افزایش کم رنگ‌تر می‌شود. در اواخر فاز لوتئال چرخه فحلی در بز، ارتفاع سلول‌ها کاهش می‌یابد. این کاهش در ارتفاع سلول‌های مژکدار اینفاندیبولوم و آمپولا بیشتر به چشم می‌خورد (۱, ۱۹). در مروری بر منابع انجام شده مشخص شد که پروتئین OGP موجود در مایع اویداکت توانایی ارتقا بلوغ زونا پلوسیدا را دارا می‌باشد. لازم است که تمامی پروتئین‌ها و فاکتورهای رشد حاضر در مایع اویداکت از سلول‌های تراوشی اپیلیوم اویداکت تولید شده و در مایع اویداکت تجمع یابند. لذا استفاده از سلول‌های اپیتلیومی اویداکت با رویکرد کاربرد سامانه جمع‌آوری و کشت بهینه این سلول‌ها که باعث حفظ عملکرد این سلول‌ها در محیط کشت و بیان تمام ژن‌های شاخص از جمله ژن کدکننده پروتئین OGP می‌شود، می‌تواند منجر به ارتقا روند بلوغ کلی اووسیت و همچنین بلوغ زوناپلوسیدا شود. درنهایت حاصل این افزایش بازده با نمایش اثرات خود در مرحله لقاح برون‌تنی و کاهش نرخ پلی‌اسپرمی خودنمایی می‌کند. با توجه به توانایی کاهش محتوای ROS تولید شده به‌واسطه حضور سلول‌های حمایت کننده در سامانه همکشتی در مرحله لقاح برون‌تنی، می‌توان این انتظار را داشت که کیفیت رویان‌های تولید شده به واسطه کاهش محتوی ROS بهتر شود. حضور سامانه همکشتی در مرحله لقاح برون تنی به واسطه تولید فاکتورهای متعددی که ارتقادهنده عملکرد اسپرم می‌باشند، می‌تواند منجر به کاهش زمان لازم برای روند لقاح شود، بدون این‌که نرخ باروری کاهش یابد. همچنین نرخ تولید بلاستوسیت‌های با کیفیت که قابلیت انتقال به رحم دام‌های پذیرنده را دارا می‌باشند، افزایش می‌یابد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.8.3]

فهرست منابع References

1. **Abe H, Hoshi H. (1997).** Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. Cytotechnology.;23(1-3):171-83.

2. **Aoki VW, Peterson CM, Parker-Jones K, Hatasaka HH, Gibson M, Huang I, et al. (2005).** Correlation of sperm penetration assay score with polyspermy rate in in-vitro fertilization. J Exp Clin Assist Reprod.;2(1):3.

3. **Broermann DM, Xie S, Nephew KP, Pope WF. (1989).** Effects of the oviduct and wheat germ agglutinin on enzymatic digestion of porcine zona pellucidae. J Anim Sci.;67(5):1324-9.

4. **Coy P, Canovas S, Mondejar I, Saavedra MD, Romar R, Grullon L, et al. (2008).** Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. Proc Natl Acad Sci U S A.;105(41):15809-14.

5. **Dadashpour Davachi N, Kohram H, Zainoaldini S. (2012).** Cumulus cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. Small Ruminant Research.;102(1):37-42.

6. **Ellington JE. (1991).** The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. Cornell Vet.;81(3):313-28.

7. **Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, et al. (2003).** Bovine embryo technologies. Theriogenology.;59(2):599-616.

8. **Gandolfi F, Moor RM. (1987).** Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J Reprod Fertil.;81(1):23-8.

9. **Hansen P. (2013).** IVF protocol. Available from: http://www.animal.ufl.edu/hansen./

10. **Hunter RH. (2003).** Reflections upon sperm-endosalpingeal and sperm-zona pellucida interactions in vivo and in vitro. Reprod Domest Anim.;38(2):147-54.

11. **Leese HJ, Tay JI, Reischl J, Downing SJ. (2001).** Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. Reproduction.;121(3):339-46.

12. **Menezo Y, Jr., Russo G, Tosti E, El Mouatassim S, Benkhalifa M. (2007).** Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. J Assist Reprod Genet.;24(11):513-20.

13. **Mondejar I, Aviles M, Coy P. (2013).** The human is an exception to the evolutionarily-conserved phenomenon of pre-fertilization zona pellucida resistance to proteolysis induced by oviductal fluid. Hum Reprod.;28(3):718-28.

14. **Mondejar I, Martinez-Martinez I, Aviles M, Coy P. (2013).** Identification of potential oviductal factors responsible for zona pellucida hardening and monospermy during fertilization in mammals. Biol Reprod.;89(3):67.

15. **Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J, Menezo Y. (1990).** Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. Hum Reprod.;5(6):737-43.

16. **Rottmayer R, Ulbrich SE, Kolle** S, Prelle K, Neumueller C, Sinowatz F, et al. (2006). A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. Reproduction.;132(4):637-48.

17. **Thibodeaux JK, Goodeaux LL, Roussel JD, Menezo Y, Amborski GF, Moreau JD, et al. (1991).** Effects of stage of the bovine oestrous cycle on in-vitro characteristics of uterine and oviductal epithelial cells. Hum Reprod.;6(6):751-60.

18. **Walter I. (1995).** Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). Anat Rec.;243(3):347-56.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.8.3]

19. Yaniz JL, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Mullins KJ. (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. Anat Rec.;260(3):268-78**.**

The embryo production through maturation, fertilization and extracorporeal culture of oocytes in three stages IVM, IVF and IVC

Masood Didarkhah*[1], Moosa Vatandoost[2]
[1]Assistant Professor, Department of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, PO BOX 19395-3697, Tehran, IRAN

Masooddidarkhah@birjand.ac.ir

Abstract
Today, the production of embryos in farm animals is carried out through the supravoluation of female animal substances, or through the maturation, fertilization and extracorporeal culture of oocytes during the three stages of IVM, IVF and IVC. In humans, all the initial efforts to reach the blastocyst stage failed with the use of classical culture environments. The dynamic conditions within the body of living organisms are such that it is usually possible to reconstruct it in cultivated environments and in the external conditions it is not optimally provided. The same issue, as well as the nature of the collaborative system, somehow gave rise to incentives to test the ability of this method to produce blastocyst in external conditions. Long-term oocyte preservation and storage of patients at risk for loss of ovarian function are one of the main reasons for freezing Oocytes are human, and this has also extended to valuable animal animals in other species. Effective freezing of oocytes can also facilitate many specific reproductive techniques.
Keywords: extracorporeal culture, fertilization, IVF

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.4.8.3]