

بررسی اثر گالاکتوز و فروکتوز به عنوان جایگزین گلوکز در محیط کشت بر تکوین جنین‌های دو سلولی موش در محیط آزمایشگاه (In vitro)

الهام علی‌آبادی* (Ph.D.) امیر اسماعیل نژاد مقدم** (Ph.D.)
عباسعلی کریمپور ملکشاہ*** (Ph.D.)

چکیده

سابقه و هدف : منابع انرژی نقش مهمی را در تکوین جنین‌های قبل از لانه‌گزینی بر عهده دارند. یکی از مهمترین منابع تأمین کننده انرژی، گلوکز می‌باشد که تأثیر آن در مراحل مختلف تکوین جنین مورد تحقیق بسیار قرار گرفته است. از آنجایی که فروکتوز و گالاکتوز از ایزومرهای مهم گلوکز می‌باشند و مطالعات کمی در خصوص تأثیر آنها بر تکوین جنین در محیط آزمایشگاه انجام گرفته است، لذا این مطالعه علاوه بر بررسی مجدد تأثیر گلوکز بر رشد و نمو جنین، تأثیر این دو ایزومر را به عنوان جایگزینی برای گلوکز در محیط کشت مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها : موش‌های سفید سوئسی بعد از تحریک تخمک گذاری توسط هورمون HMG و HCG و جفت گذاری ۴۸ تا ۵۰ ساعت بعد از آخرین تزریق، کشته شده و جنین‌های دو سلولی به وسیله فلاشینگ از لوله‌های رحمی آنها جمع‌آوری شدند. جنین‌ها به طور تصادفی به محیط‌های کشت موردنظر انتقال داده شده و تا مرحله هچینگ (خروج از زونا پلوسیدا) کشت داده شدند. در این تحقیق محیط‌های کشت T_6 حاوی گلوکز (T_6+gl)، T_6 حاوی گالاکتوز (T_6+gal)، T_6 حاوی فروکتوز (T_6+fr) و T_6 بدون هگزوز (T_6-h) مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها : درصد جنین‌های رسیده به مرحله بلاستوسیست در محیط‌های کشت فوق به ترتیب ۹۱/۲۵، ۶۷/۰۹، ۹۲/۸۵ و ۷۰/۹۲ بود. همچنین به ترتیب ۴۰/۸۲، ۲۵/۲۱، ۴۲/۸۵ و ۲۳/۴۶ درصد از جنین‌ها بعد از ۷۲ ساعت به مرحله هچینگ رسیدند. درصد جنین‌های بلاستوسیست و هچینگ در محیط T_6+gl و T_6+fr به طور معنی داری بیشتر از محیط T_6+gal و T_6-h بود ($P<0/0001$)، اما هیچ اختلاف معنی داری بین جنین‌های کشت داده شده در محیط T_6+gal نسبت به محیط T_6-h و نیز T_6+fr نسبت به T_6+gl مشاهده نشد.

استنتاج : براساس یافته‌های این تحقیق می‌توان استنتاج نمود که گالاکتوز نمی‌تواند جانشین مناسبی برای گلوکز در محیط کشت جنین‌های اولیه باشد، اما فروکتوز می‌تواند جایگزین گلوکز در محیط کشت شود، بدون این که تکوین جنین‌ها در مقایسه با گلوکز دچار اختلال شود. با وجود این استفاده از فروکتوز به عنوان جانشین گلوکز به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

واژه‌های کلیدی : گالاکتوز، فروکتوز، رشد و تکامل جنینی، بارورسازی آزمایشگاهی

✉ شیراز - دانشکده پزشکی - گروه علوم تشریح
*** دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

* استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
** استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

مقدمه

نتایج حاصله از مطالعات مربوط به کشت جنین حیوانات می‌تواند راهگشای حل مشکلات کشت جنین انسانی باشد. امروزه با استفاده از این نتایج و ارایه تحقیقات با استفاده از جنین‌های انسان گام‌های مهمی در حل مشکلات نازایی زوج‌های نابارور برداشته شده است.

با وجود این هنوز مشکلات زیادی در این زمینه بالاخص در رابطه با محیط‌های کشت و ترکیبات موجود در آنها وجود دارد که زمینه تحقیق را کماکان فراهم می‌سازد (۱). شرایط محیط کشت و ترکیبات موجود در آن از جمله عواملی هستند که به میزان زیاد بر رشد جنین تأثیر می‌گذارند و با کنترل آنها می‌توان محیط مناسبی را جهت رشد جنین فراهم نمود (۲). یکی از این عوامل شناخته شده منابع انرژی خارجی مورد استفاده در محیط‌های کشت است که جنین با استفاده از این مواد انرژی لازم برای فعالیت‌های خود را تأمین می‌کند. مهمترین منابع تأمین‌کننده انرژی برای جنین در محیط‌های کشت پیرووات، لاکتات و گلوکز می‌باشند که در ترشحات دستگاه تناسلی ماده نیز یافت می‌شوند (۳). مطالعات زیادی پیرامون متابولیسم این مواد توسط جنین صورت گرفته است. نتایج حاصله نشان داده‌اند که جنین در مرحله خاصی از رشد قادر نیست انواع انرژی را مورد استفاده قرار دهد، بلکه توانایی جنین در استفاده از منابع انرژی به مرحله رشد آن بستگی دارد. در عین حال با افزایش سن، جنین می‌تواند منابع متنوع‌تری از انرژی را مورد استفاده قرار دهد (۴، ۵). علاوه بر این میزان استفاده جنین از یک منبع انرژی خاص همزمان با افزایش سن آن، افزایش یافته و نحوه ترکیب منابع انرژی در محیط کشت نیز نقش به‌سزایی را در رشد جنین برعهده‌دارند (۴). با وجود استفاده از این سه منبع مهم تأمین‌کننده انرژی در اغلب محیط‌های کشت جنین و علی‌رغم انجام

تحقیقات بسیاری که در خصوص نقش هر یک از آنها به تنهایی و یا در کنار یکدیگر انجام پذیرفته است (۶، ۷، ۸)، هنوز اتفاق نظر کاملی در این خصوص وجود ندارد. این اختلاف نظر در مورد نقش گلوکز بیشتر به چشم می‌خورد. درحالی‌که برخی محققان اهمیت گلوکز را به عنوان یک ترکیب انرژی‌زا برای تمام مراحل جنین اولیه در محیط آزمایشگاه مورد توجه قرار داده‌اند (۴)، بعضی دیگر وجود آن را در محیط کشت فقط برای مراحل انتهایی تکوین جنین پیش از لانه‌گزینی ضروری دانسته (۵، ۶) و معتقدند این ترکیب حتی بر تکوین مراحل ابتدایی جنین اولیه پستانداران در محیط آزمایشگاه اثر سویی داشته و به عنوان یک عامل ایجادکننده توقف رشد (Growth block) می‌توان از آن یاد کرد (۹، ۱۰). در ترکیب تمام محیط‌های کشت، یا حداقل یکی از آنها، لاکتات و پیرووات وجود دارند و این دو ماده به تنهایی و بدون حضور گلوکز نیز می‌توانند جنین‌های دو سلولی موش را تا مرحله بلاستوسیست برسانند (۱۱). با وجود این به دلیل اهمیت گلوکز در افزایش درصد بلاستوسیست و افزایش احتمالی کیفیت جنین‌ها به نظر می‌رسد استفاده از آن در محیط‌های کشت اجتناب ناپذیر باشد مگر آن‌که جایگزین مناسبی برای آن پیدا شود. گالاکتوز و فروکتوز ایزومرهای مهم گلوکز می‌باشند که مطالعات زیادی در خصوص اهمیت احتمالی و نقش آنها در متابولیسم جنین وجود ندارد. برخی گزارشات وجود فروکتوز را در تکوین جنین‌های اولیه مثبت ارزیابی کردند (۱۲). گزارش‌ها در خصوص اهمیت گالاکتوز به عنوان سوسترای انرژی‌زا بسیار محدود می‌باشد (۱۳). به دلیل آن‌که این دو ایزومر در برخی مایعات طبیعی بدن همانند ترشحات رحم و مایع منی (Semen) وجود داشته و در خصوص نقش آنها بر تکوین جنین‌های اولیه در محیط آزمایشگاه تحقیقات کمی انجام پذیرفته است،

لذا این تحقیق به بررسی نقش این دو هگروز به عنوان جایگزین گلوکز در محیط کشت پرداخته است.

مواد و روش‌ها

حیوان آزمایشگاهی

برای تهیه جنین، از موش سفید سوئیسی (Swiss white mice) استفاده شده است. موش‌ها به وسیله گنادوتروپین جهت تخمک‌گذاری تحریک (Superovulation) شدند. بدین منظور به موش‌های ماده ۴ تا ۶ هفته‌ای ۵ تا ۷/۵ واحد PMSG^۱ و ۴۸ تا ۵۰ ساعت بعد واحد ۵ تا ۷/۵ hCG^۲ به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از تزریق hCG، موش‌های ماده به صورت یک به یک با موش‌های نر به منظور جفت‌گیری در قفس‌های جداگانه قرار داده شدند. صبح روز بعد با دیدن پلاک واژنی، مثبت بودن جفت‌گیری تأیید و حیوانات مثبت برای نمونه‌گیری، جداگانه نگهداری گردیدند. ۴۸ تا ۵۰ ساعت پس از تزریق hCG اویداکت‌ها از حیوان ماده مثبت جدا و به قطره‌های محیط کشت H₆-h موجود در زیر روغن پارافین، جهت آزادسازی جنین‌ها انتقال داده شدند. جنین‌ها در این زمان در اواخر مرحله دو سلولی اند (Late two-cell).

محیط‌های کشت

محیط H₆ و T₆ برای شستشو و کشت جنین‌ها استفاده شد. به منظور بررسی اثر فروکتوز و گالاکتوز، گلوکز از محیط T₆ حذف و به همان میزان (۰/۲۵mM) فروکتوز یا گالاکتوز اضافه گردید. در نهایت پنج نوع محیط T₆ دارای گلوکز (T₆+gl)، T₆ دارای فروکتوز (T₆+fr)، T₆، T₆ دارای گالاکتوز (T₆+gal)، T₆ بدون هگروز (T₆-h) و H₆ بدون هگروز هیپدار (H₆-h) ساخته شد.

به محیط‌های فوق ۱۰ درصد سرم آلبومین انسانی اضافه گردید (مواد لازم برای ساختن محیط‌ها از شرکت سیگما خریداری شدند).

جمع آوری، کشت و بررسی رشد جنین‌ها

برای آزاد سازی جنین‌ها با استفاده از یک پنس ظریف سر اویداکت‌ها در زیر میکروسکوپ تشریحی مشخص و سر سوزن فلاش شماره ۳۰ متصل به سرنگ انسولین ۱ میلی‌لیتری حاوی H₆-h در داخل سر اویداکت قرار گرفته و سپس ۰/۵ تا ۰/۱ میلی لیتر محیط به داخل اویداکت فرستاده شد و از قسمت رحمی اویداکت جنین‌ها به همراه مدیوم خارج گردیدند.

جنین‌ها از خرده‌های سلولی (Cell debris) توسط پی‌پت دهانی (Mouth pipette) جدا و در محیط کشت H₆-h سه مرتبه شسته و سپس به صورت تصادفی بین محیط‌های کشت مختلف (T₆-h، T₆+fr، T₆+gl) تقسیم و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور Co2 (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان Co2 ۵ درصد) قرار داده شدند. در هر قطره محیط کشت ۱۰ الی ۱۵ جنین قرار داده شد و آزمایشات ۱۸ مرتبه تکرار شدند. با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Invert microscope) رشد جنین‌ها مطالعه و مراحل رشد آنها شامل ۴ و ۸ سلولی، مرولا، بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست ثبت می‌شد (وسایل یک بار مصرف از شرکت Nanc و Falcon تهیه شدند).

تجزیه و تحلیل آماری

میانگین نسبی در مرحله مرولا و بلاستوسیست برای هر یک از گروه‌های آزمایش محاسبه و با استفاده از آزمون‌های ANOVA و Turkey مقایسه آماری بین آنها انجام پذیرفت.

1. pregnant mare's serum gonadotropin
2. Human chorionic gonadotropin

یافته ها

در محیط های کشت T_6+gl ، T_6+fr ، T_6+gal و T_6-h به ترتیب ، ۲۴۰، ۲۳۴، ۲۲۴ و ۲۲۷ جنین کشت داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت به ترتیب ۹۱/۲۵ ، ۶۷/۰۹ ، ۹۲/۸۵ و ۷۰/۹۲ درصد از جنین ها به مرحله بلاستوسیست و ۴۰/۸۲ ، ۲۵/۲۱ ، ۴۲/۸۵ و ۲۳/۴۶ درصد از جنین ها به مرحله هچینگ بلاستوسیست رسیدند. آزمون آماری اختلاف معنی داری را بین گروه T_6+gal و T_6-h چه از نظر بلاستوسیست و چه از نظر هچینگ بلاستوسیست نشان نداد. همچنین میزان بلاستوسیست و هچینگ در گروه T_6+gal و T_6+fr نیز اختلافی را نشان نداد. اما نسبت بلاستوسیست و هچینگ در این دو محیط در مقایسه با محیط های کشت حاوی گالاکتوز و بدون هگزوز به طور معنی داری بالاتر بود ($p < 0.001$ ، جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: میزان بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست در محیط های مختلف پس از گذشت ۷۲ ساعت از زمان کشت

محیط کشت مورد استفاده	تعداد جنس کشت شده	بلاستوسیست (درصد)	هچینگ بلاستوسیست (درصد)
T_6+gl	۲۴۰	۲۱۹ (۹۱/۲۵)a	۹۸ (۴۰/۸۲)a
T_6+gal	۲۳۴	۱۵۷ (۶۷/۰۹)b	۵۹ (۲۵/۲۱)b
T_6+fr	۲۲۴	۲۰۸ (۹۲/۸۵)c	۹۶ (۴۲/۸۵)c
T_6-h	۲۲۷	۱۶۱ (۷۰/۹۲)d	۵۱ (۲۳/۴۶)d

a و c در مقایسه با b و d ($P < 0.001$)

بحث

یافته های این مطالعه نشان داد که در محیط کشت حاوی گلوکز نسبت بیشتری از جنین ها در مقایسه با محیط حاوی لاکتات و پیرووات ولی بدون هگزوز به مرحله بلاستوسیست و هچینگ می رسند. برخی از مطالعات قبلی وجود گلوکز را برای بلاستولاسیون

جنین های مرحله مرولا و تبدیل آنها به بلاستوسیست ضروری دانستند و گزارش کردند لاکتات و پیرووات به تنهایی قادر به رساندن جنین ها به مرحله بلاستوسیست نیستند (۴، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۷)؛ ولی یافته های ما نشان داد که بدون حضور گلوکز نیز جنین های موش می توانند به مرحله بلاستوسیست برسند، با وجود این حضور گلوکز میزان تکوین جنین ها به بلاستوسیست را افزایش می دهد. تفاوت غلظت سوبستراهای انرژی زا و نیز نژاد حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده شاید دلیل تفاوت یافته های گزارش شده باشد.

بر اساس یافته های این تحقیق گالاکتوز جایگزین مناسبی برای گلوکز نمی تواند باشد چرا که استفاده از آن میزان تکوین جنین ها را در مقایسه با محیطی که فاقد هگزوز و حاوی لاکتات و پیرووات بود افزایش نداد، با وجود این هیچ گونه اثر سویی نیز بر تکوین جنین ها نداشته است.

در خصوص تأثیر گالاکتوز بر تکوین جنین های اولیه در محیط کشت مطالعات زیادی انجام نگرفته است. Chattut و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند که بدون حضور گلوکز جنین های موش تا مرحله مرولا پیش رفته و پس از آن دچار توقف رشدی می شوند. آنان همچنین گزارش کردند که گالاکتوز نیز می تواند در ایفای چنین نقشی جایگزین گلوکز شده و بلاستولاسیون را در جنین ها تحریک نماید (۱۳). این در حالی است که در تحقیقی دیگر اثرات سوء گالاکتوز بر تکوین جنین های اولیه مورد تأکید قرار گرفته است (۱۲). ما توجه دقیقی برای این تفاوت ها نداریم. به نظر می رسد مطالعات بیشتر و دقیقتری برای بررسی این موضوع مورد نیاز باشد.

یافته های این تحقیق همچنین نشان داد که فروکتوز بر خلاف گالاکتوز، در تکوین جنین ها و رساندن آنها به

تشدید توقف رشدی (Growth block) در مراحل اولیه (مرحله دو سلولی در موش) نشده و در حضور فروکتوز جنین‌ها بهتر می‌توانند مرحله توقف رشدی را پشت سر بگذارند (۱۹،۱۸). البته در تحقیق حاضر از جنین‌های دو سلولی‌ای که مرحله توقف رشدی را پشت سر گذاشته بودند استفاده شد لذا اثر فروکتوز در پشت سر گذاشتن مرحله توقف رشدی مورد بررسی واقع نشد. همچنین شمارش بلاستومرهای بلاستوسیست‌ها انجام نگرفت. براساس یافته‌های این تحقیق تصور می‌شد برای ساخت محیط کشت مناسب‌تر برای تکوین جنین‌های اولیه می‌توان فروکتوز را مورد توجه قرار داد. البته هنوز مطالعات بیشتری لازم است تا بتوان در عمل از این ماده انرژی‌زا در محیط‌های کشت استفاده نمود.

مرحله بلاستوسیست و هچینگ می‌تواند همانند گلوکز عمل نماید اما این تحقیق هیچ‌گونه مزیتی را برای فروکتوز در مقایسه با گلوکز نشان نداده است. Guyader و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که در محیط کشت حاوی گلوکز درصد بیشتری از جنین‌ها در مقایسه با محیط حاوی فروکتوز به مرحله هچینگ می‌رسند (۱۷) اما در مقابل Ludwig و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که در حضور فروکتوز گرچه نسبت جنین‌های مرحله بلاستوسیست هامستر با محیط حاوی گلوکز تفاوتی نداشته است ولی تعداد سلول‌های بلاستوسیست‌های حاصله در محیط حاوی فروکتوز بیشتر بوده و همچنین این جنین‌ها نسبت لانه‌گزینی بیشتری را نشان دادند (۱۲). همچنین برخی تحقیقات دیگر نشان دادند که فروکتوز برخلاف گلوکز، باعث

فهرست منابع

1. Gardner DK, Sakkas D. Mouse embryo cleavage metabolism and viability: role of medium composition. *Hum- Reprod.* 1993; 8(2): 288-94.
2. Fischer B, Schumacher A, Hegele HC, Beier HM. Potential risk of light and room temperature exposure to preimplantation embryos. *Fert. Steril.* 1988; 50(6): 938-944.
3. Garder DK, Leese HJ. Concentration of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro *J.Reproduction & Fert.* 1990; 88(1): 361-368.
4. Martin KL, Leese HJ. Role of developmental factors in the switch from pyruvate to glucose as the major exogenous energy substrate in the preimplantation mouse embryo. *Reprod. Fertil- Dev.* 1999; 11(7-8): 425-33.
5. Brown JJ, Whittingham DG. The roles of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F1 hybrid mice in vitro. *Development.* 1991; 112(1): 99-105.
6. Brinson DR, leese HJ. Energy metabolism in last primplantation rat embryos. *J- Reprod. Fert.* 1991; 93(1): 245-251.
7. Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine be cattle embryos produced and co-cultured in vitro. *J- Reprod- fert.* 1992; 95(2): 585-595.
8. Leppens-Luisier G, Sakkas D. Development, glycolytic activity, and

- viability of preimplantation mouse embryos subjected to different periods of glucose starvation. *Biology-of-Reproduction*. 1997; 56(3): 589- 96.
9. Gardner DK, Lane M. Allevation of the "2- cell block" and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos. *Hum-Reprod*. 1996; 11(12): 2703-12.
10. Houghton FD, Sheth B, Mordn B, Leese HJ, Fleming TP. Expression and activity of hexokinnase in the early mouse embryo. *Mol- Hum- Reprod*. 1996; 2(10): 793-8.
۱۱. امیر اسماعیل نژاد مقدم ، عباسعلی کریمپور. بررسی اثر پیرووات، لاکتات و گلوکز در رشد و نمو جنین‌های موش در محیط آزمایشگاه در مرحله قبل از لانه‌گزینی. مجله علمی- پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۱۳۸۰ ؛ سال یازدهم، شماره ۳۱، صفحات ۴۰ تا ۴۵.
12. Ludwig TE, Lane M, Bavister BD. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture. *Biology-of- Reproduction*. 2001; 64(5): 1366- 74. preimplantation mouse pathenogenones in invitro in absence of glucose. *Mol-Reprod-Dev*- 1996; 43(4): 421-7.
13. Chattot CL, Lewis WJ, Torres I, Ziomek CA. One-minute exposure of 4- cell mouse embryos to glucose overcomes morula block in CZB medium. *Mol-Reprod- and- Dev*. 1994; 37(4): 407-12.
14. Mognetti B, et al. The development of preimplantation mouse parthenogenones invitro in absence of glucose. *Mil-Reprod-Dev*. 1996; 43(4): 421-7.
15. Miyoshi K, Funahashi H, Okuda K, Niwa K. Development of rat one- cell embryos in a chemically defined medium: effects of glucose, phosphate and Osmolarity. *J. Reprod. Fertil*. 1994, 100(1): 21-6.
16. Sakkas D, Urner F, Menenzo Y, Leppens G. Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage and visability of mouse embryos in vitro. *Biol. Reprod*. 1993; 49(6): 1288-92.
17. Guyader-Joly C, Khatchadourian C, Menenzo Y. Comparative glucose and fructose incorporation and converion by in vitro produced bovine embryos zygote. 1996 May; 4(2): 85-91.
18. Sakkas D, Batt PA, Cameron AW. Development of preimplantation goat (*capra hircus*) embryos in vivo and vitro. *J. Reprod. Fert*. 1989; 87(1): 356- 359.
19. Meneso Y, Katchadourian C. Involvement of glucose 6 phosphate isomerase activity in the mouse embryo "2-cell block" in vitro *C.R- Acad. Sci. Paris*, 1990; 310: 297-301.