Archive of SID

پژوهشی

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

الهام علي‌آبادي(Ph.D.)* امیر اسماعیل نژاد مقدم(Ph.D.)**
عباسعلي كريمپور ملكشاه(Ph.D.)***

چکیده

سابقه و هدف : منابع انرژی نقش مهمی را در تکوین جنین‌های قبل از لانه گزینی 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 آنجایی‌که 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 سوئیسی بعد از تحریک تخمک گذاری توسط هورمون HMG و HCG و جفت‌گذاری ٤٨ تا ٥٠ 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 کشتT_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 قرارگرفتند.

یافته ها : درصد جنین‌های رسیده به مرحله بلاستوسیست در محیط‌های کشت فوق به ترتیب ۹۱/۲۵، ٦٧/٠٩، ٩٢/٨٥ و ٧٠/٩٢ بود. همچنین به ترتیب ٤٠/٨٢، ٢٥/٢١، ٤٢/٨٥ و ٢٣/٤٦ درصد از جنین‌ها بعد از ٧٢ 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<٠/٠٠٠١)، 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.

واژه هاي كليدي : گالاکتوز، فروکتوز، رشد و تکامل جنینی، بارورسازی آزمایشگاهی

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

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-23]

Archive of SID

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 وترکیبات موجود در آنها وجود دارد که زمینه تحقیق را کماکان فراهم می‌سازد(۱).شرایط محیط‌کشت وترکیبات 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 محیط‌های‌کشت پیرووات، لاکتات وگلوکز می‌باشندکه درترشحات دستگاه تناسلی ماده نیز یافت می‌شوند(۳). مطالعات زیادی پیرامون متابولیسم این مواد توسط جنین صورت گرفته است. نتایج حاصله نشان داده‌اند که جنین درمرحله 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(۵،٤). علاوه بر این میزان استفاده جنین ازیک منبع انرژی خاص همزمان با افزایش سن آن، افزایش یافته و نحوه ترکیب منابع انرژی در محیط کشت نیزنقش به‌سزایی را در رشدجنین برعهده‌دارند(٤).

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 ازآنها به تنهایی و یا درکنار یکدیگرانجام پذیرفته است(۸،۷،٦)، هنوز اتفاق نظر کاملی در این خصوص وجود ندارد. این اختلاف‌نظر درمورد نقش‌گلوکز بیشتر به‌چشم می‌خورد. درحالی‌که برخی محققان اهمیت‌گلوکز را به عنوان یک ترکیب انرژی‌زا برای تمام مراحل جنین اولیه در محیط آزمایشگاه مورد توجه قرار داده‌اند (٤)، بعضی دیگر وجود آن را در محیط کشت فقط برای مراحل انتهایی تکوین جنین پیش از لانه‌گزینی ضروری دانسته (٦،٥) و معتقدند این ترکیب حتی بر تکوین مراحل ابتدایی جنین اولیه پستانداران در محیط آزمایشگاه اثر سویی داشته و به‌عنوان‌یک عامل‌ایجادکننده‌توقف رشد(Growth block) می‌توان از آن یاد کرد(۱۰،۹). 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 سوبسترای انرژی زا 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 درخصوص نقش آنها برتکوین جنین‌های اولیه در محیط آزمایشگاه تحقیقات کمی انجام پذیرفته است،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-23]

www.SID.ir

Archive of SID

لذا این تحقیق به بررسی نقش این دو هگزوز 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. بدین‌منظور به موش‌های ماده ٤ تا ٦ هفته‌ای ٥ تا ٧/٥ واحد PMSG [1] و٤٨ تا٥٠ ساعت بعد واحد ٥ تا ٧/٥ hCG [2] به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس ازتزریقhCG، موش‌های ماده به‌صورت 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.٤٨ تا٥٠ ساعت پس ازتزریقhCG اویداکت‌ها از حیوان ماده مثبت جدا و به قطره‌های محیط کشت H_6-h موجود در زیر روغن پارافین، جهت آزادسازی جنین‌ها انتقال داده شدند. جنین‌ها در این زمان در اواخر مرحله دو سلولی‌اند (Late two-cell).

محیط‌های کشت

محیطH_6 وT_6 برای شستشو وکشت جنین‌ها استفاده شد. به منظور بررسی اثر فروکتوز وگالاکتوز،گلوکز از محیط T_6 حذف و به همان میزان (٠/٢٥mM) فروکتوز یا گالاکتوز اضافه گردید. در نهایت پنج نوع محیط T_6 دارای گلوکز(T_6+gl)، T_6 دارای فروکتوز (T_6+fr) ، T_6 دارای گالاکتوز (T_6+gal)، T_6 بدون هگزوز (T_6-h) و H_6 بدون هگزوز هیپزدار (H_6-h) ساخته شد.

به محیط‌های فوق ١٠ 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 درزیر میکروسکوپ تشریحی مشخص و سر سوزن فلاش شماره ٣٠ متصل به سرنگ انسولین ١ میلی‌لیتری حاوی H_6-h در داخل سر اویداکت قرار گرفته و سپس ٠/٠٥ تا ٠/١ میلی لیتر محیط به داخل اویداکت فرستاده شد و از قسمت رحمی اویداکت جنین‌ها به همراه مدیوم خارج گردیدند.

جنین‌ها از خرده‌های سلولی (Cell debries) توسط پی‌پت دهانی(Mouth pipette) جدا و در محیط کشت H_6-h سه مرتبه شسته و سپس به صورت تصادفی بین محیط های کشت مختلف (T_6-h , T_6+fr و T_6+gl) تقسیم و به مدت ٧٢ ساعت در انکوباتور Co2 (دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد و میزان Co2 ٥ درصد) قرار داده شدند. در هر قطره محیط کشت ١٠ الی ١٥ جنین قرار داده شد و آزمایشات ١٨ مرتبه تکرار شدند. با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Invert microscop) رشد جنین‌ها مطالعه و مراحل رشد آنها شامل ٤ و ٨ سلولی، مرولا، بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست ثبت می‌شد(وسایل یک بارمصرف ازشرکت Nanc وFalcon 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

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-23]

Archive of SID

یافته ها

در محیط‌های کشت T_6+gl، T_6+gal، T_6+fr و T_6-h به ترتیب ، ۲۲٤،۲۳٤،۲٤۰ و ۲۲۷جنین کشت داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت به ترتیب ۹۱/۲۵ ، ٦۷/۰۹ ، ۹۲/۸۵ و ۷۰/۹۲ درصد از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست و ٤۰/۸۲ ، ۲۵/۲۱ ، ٤۲/۸۵ و۲۳/٤٦ درصد از جنین‌ها به مرحله هچینگ بلاستوسیست رسیدند.

آزمون آماری اختلاف معنی‌داری را بین گروه T_6 +galو 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 وT_6+Fr نیزاختلافی را نشان نداد. اما نسبت بلاستوسیست و هچینگ در این دو محیط در مقایسه بامحیط‌های کشت حاوی گالاکتوز وبدون هگزوز به‌طورمعنی‌داری بالاتر بود (p<۰/۰۰۱، جدول‌شمارهٔ۱).

جدول شمارهٔ ۱ : میزان بلاستوسیست و هچینگ بلاستوسیست در محیط‌های مختلف پس از گذشت ۷۲ ساعت از زمان کشت

محیط کشت مورداستفاده	تعداد جنس کشت شده	بلاستوسیست	هچینگ بلاستوسیست
		تعداد(درصد)	تعداد(درصد)
T_6+gl	۲٤۰	۲۱۹(۹۱/۲۵)a	۹۸(٤۰/۸۲)a
T_6+ gal	۲۳٤	۱۵۷(٦۷/۰۹)b	۵۹(۲۵/۲۱)b
T_6+ fr	۲۲٤	۲۰۸(۹۲/۸۵)c	۹٦(٤۲/۸۵)c
T_6-h	۲۲۷	۱٦۱(۷۰/۹۲)d	۵۱(۲۳/٤٦)d

a و c در مقایسه با b و d (P <۰/۰۰۰۱)

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد که در محیط کشت حاوی گلوکز نسبت بیشتری از جنین‌ها در مقایسه با محیط حاوی لاکتات و پیرووات ولی بدون هگزوز به مرحله بلاستوسیست و هچینگ می‌رسند. برخی از مطالعات قبلی وجود گلوکز را برای بلاستولاسیون جنین‌های مرحله مرولا و تبدیل آنها به بلاستوسیست ضروری دانستند و گزارش کردند لاکتات و پیرووات به تنهایی قادر به رساندن جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست نیستند(۱۷،۱۵،۱٤،۱۳،٤)؛ ولی یافته‌های ما نشان داد که بدون حضور گلوکز نیز جنین‌های موش می‌توانند به مرحله بلاستوسیست برسند، با وجود این حضور گلوکز میزان تکوین جنین‌ها به بلاستوسیست را افزایش می‌دهد. تفاوت غلظت سوبستراهای انرژی‌زا و نیز نژاد حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده شاید دلیل تفاوت یافته‌های گزارش شده باشد.

براساس یافته‌های این تحقیق گالاکتوز جایگزین مناسبی برای گلوکز نمی‌تواند باشد چرا که استفاده از آن میزان تکوین جنین‌ها را در مقایسه با محیطی که فاقد هگزوز و حاوی لاکتات و پیرووات بود افزایش نداد، با وجود این هیچ‌گونه اثر سویی نیز بر تکوین جنین‌ها نداشته است.

در خصوص تأثیر گالاکتوز بر تکوین جنین‌های اولیه در محیط کشت مطالعات زیادی انجام نگرفته است. Chattut و همکاران (۱۹۹٤) نشان دادند که بدون حضور گلوکز جنین‌های موش تا مرحله مرولا پیش رفته و پس از آن دچار توقف رشدی می‌شوند. آنان همچنین گزارش کردند که گالاکتوز نیز می‌تواند در ایفای چنین نقشی جایگزین گلوکز شده و بلاستولاسیون را در جنین‌ها تحریک نماید(۱۳). این در حالی است که در تحقیقی دیگر اثرات سوء گالاکتوز بر تکوین جنین‌های اولیه مورد تأکید قرار گرفته است(۱۲). ما توجیه دقیقی برای این تفاوت‌ها نداریم. به نظر می‌رسد مطالعات بیشتر و دقیقتری برای بررسی این موضوع مورد نیاز باشد.

یافته‌های این تحقیق همچنین نشان داد که فروکتوز بر خلاف گالاکتوز، در تکوین جنین‌ها و رساندن آنها به

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-23]

www.SID.ir

Archive of SID

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 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 سرگذاشتن 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.

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

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-23]

Archive of SID

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.
11. امیر اسماعیل نژاد مقدم ، عباسعلی کریمپور. بررسی اثر پیرووات، لاکتات وگلوکز 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 ٤٠ تا ٤٥ .
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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-23]

www.SID.ir