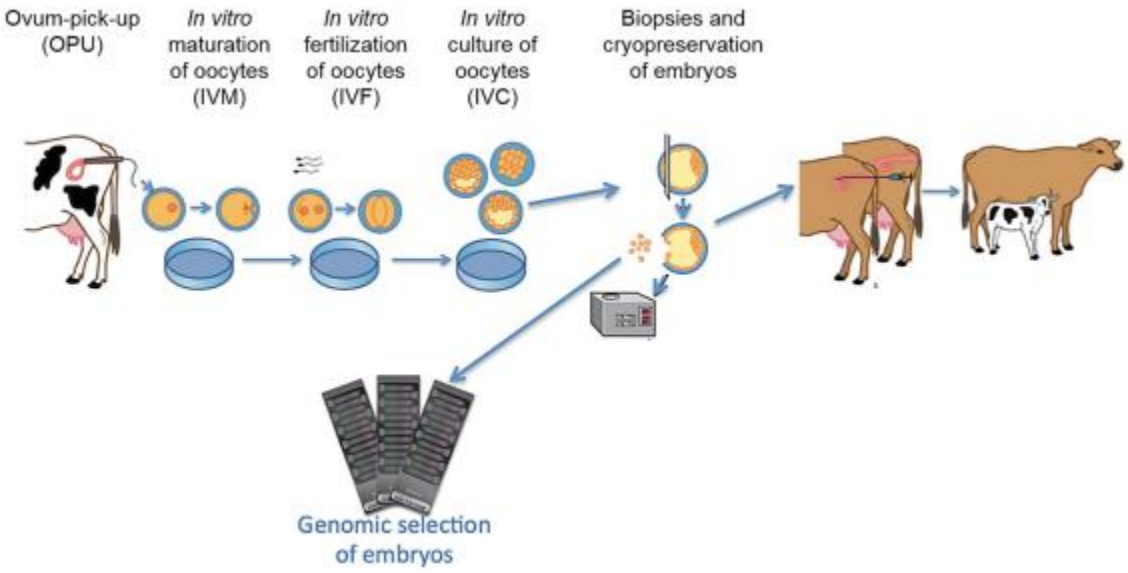
پیشرفت‌های اخیر در تولید جنین گاوی آزمایشگاهی



تنظیم کننده:

واحد تحقیق، توسعه و نوآوری

شرکت کشت و دامداری فکا

گردآورنده: محسن دره شوری

دی ۱۴۰۴

چکیده

تولید جنین در محیط آزمایشگاهی(IVP)[1] به‌عنوان یکی از پیشرفته‌ترین فناوری‌های زیست‌تولیدی در دامپروری مدرن شناخته می‌شود که نقش مهمی در تسریع پیشرفت ژنتیکی و بهبود بهره‌وری ایفا می‌کند .بر اساس مرور و تحلیل نتایج گزارش‌شده در مطالعات مختلف، عوامل متعددی بر کیفیت و میزان موفقیت جنین‌های تولیدشده به روش تولید جنین در محیط آزمایشگاهی اثرگذار هستند. در این راستا، مطالعات پیشین به بررسی روش‌های جمع‌آوری اووسیت، فرآیند بلوغ و لقاح آزمایشگاهی، و شرایط کشت جنین پرداخته‌اند و تأثیر ترکیب محیط‌های کشت و وضعیت فیزیولوژیک بر رشد و تکامل جنین‌ها را مورد ارزیابی قرار داده‌اند . یافته‌های گزارش‌شده در این مقالات نشان می‌دهد که کیفیت اولیه اووسیت، بهینه‌سازی محیط کشت، استفاده از افزودنی‌هایی مانند فاکتورهای رشد و آنتی‌اکسیدان‌ها، و انتخاب مناسب اسپرم، نقش تعیین‌کننده‌ای در افزایش بازده تولید جنین و نرخ تشکیل بلاستوسیست دارند. در مجموع، این نتایج می‌توانند به‌عنوان مبنایی کاربردی برای اصلاح و بهینه‌سازی پروتکل‌های تولید جنین در محیط آزمایشگاهی و افزایش موفقیت تولید جنین‌های با کیفیت در دام‌های مولد مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی :تولید جنین در محیط آزمایشگاهی، اووسیت، بلاستوسیست، لقاح آزمایشگاهی، بهینه‌سازی محیط کشت

مقدمه

افزایش جمعیت جهانی و نیاز روزافزون به منابع غذایی با کیفیت، پژوهشگران و صنعت دامپروری را به سمت بهبود بهره‌وری و تولید حیوانات مولد هدایت کرده است. در این میان، فناوری‌های نوین تولید مثل، به ویژه تولید جنین در محیط آزمایشگاهی، به عنوان ابزاری کلیدی برای افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی و بهینه‌سازی مدیریت گله مطرح شده‌اند .تولید جنین در محیط آزمایشگاهی امکان تولید چندین جنین از حیوانات با ارزش ژنتیکی بالا را فراهم می‌کند و این جنین‌ها می‌توانند در زمان مناسب فریز شده و به دام‌های گیرنده منتقل شوند. این فرآیند نه تنها تولید نسل‌های با کیفیت را تسریع می‌کند، بلکه زمینه تحقیقات پیشرفته در زیست‌شناسی تولید مثل را نیز فراهم می‌سازد. فرایند تولید جنین در محیط آزمایشگاهی شامل مراحل جمع‌آوری اووسیت‌ها، بلوغ آزمایشگاهی(IVM)[2] ، لقاح آزمایشگاهی (IVF)[3] و کشت جنین تا مرحله بلاستوسیست است(IVC)[4]. موفقیت هر مرحله به کیفیت اولیه اووسیت، ویژگی‌های اسپرم، ترکیب و شرایط محیط کشت، و تکنیک‌های استفاده‌شده وابسته است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که استفاده از اسپرم مرتب‌سازی شده، افزودنی‌های فاکتور رشد، آنتی‌اکسیدان‌ها و بهینه‌سازی شرایط محیطی می‌تواند بازده و کیفیت جنین‌ها را به‌طور قابل توجهی افزایش دهد. علاوه بر جنبه کاربردی، تولید جنین در محیط آزمایشگاهی نقش مهمی در تحقیقات پایه‌ای دارد. این فناوری امکان مطالعه فرآیندهای سلولی و مولکولی بلوغ اووسیت، لقاح و توسعه جنین را فراهم می‌کند و می‌تواند به شناسایی نشانگرهای زیستی کیفیت جنین و توسعه پروتکل‌های بهینه کمک کند. در مجموع، تولید جنین در محیط آزمایشگاهی نه تنها بهبود کارایی تولید دام را ممکن می‌سازد، بلکه به عنوان یک بستر علمی برای پیشرفت در حوزه بیوتکنولوژی تولید مثل مطرح است. بر اساس آمار سالانه تولید جنین که در سال‌های اخیر توسط IETS ارائه شده است، بیش از ۴۰۰ هزار جنین

[1]- In Vitro Production
[2]- In Vitro Maturation
[3]- In Vitro Fertilization
[4]- In Vitro Culture

گاوی حاصل از تولید آزمایشگاهی در سراسر جهان منتقل شده‌اند . از میان کل جنین‌های منتقل‌شده، حدود ٪۸۰ آن‌ها به‌صورت تازه منتقل شده‌اند. این امر بازتاب‌دهنده این واقعیت است که جنین‌های تولیدشده در شرایط آزمایشگاهی نسبت به جنین‌های تولیدشده درون‌تنی مقاومت انجمادی[1] کمتری دارند. در اواخر دهه ۱۹۹۰، تعداد جنین‌های منجمد_ذوب‌شده چه درون تنی و چه تولید جنین در محیط آزمایشگاهی که منتقل می‌شدند، عملاً با تعداد جنین‌های تازه (غیرمنجمد) برابر بود. پس از آن، نسبت انتقال جنین‌های تازه تولید جنین در محیط آزمایشگاهی افزایش یافت، اما در سال‌های اخیر (۲۰۱۴ تا ۲۰۱۶)، افزایش قابل‌توجهی در تعداد انتقال جنین‌های منجمد_ذوب‌شده تولید جنین در محیط آزمایشگاهی نیز دیده شده است؛ که احتمالاً به دلیل استفاده از محیط‌های کشت پیشرفته با محتوای سرمی کم یا فاقد سرم و یا افزودنی‌های اختصاصی تقویت‌کننده رشد جنینی است که کیفیت جنین را ارتقا می‌دهند. دلیل بالقوه دیگری که می‌تواند این افزایش را توجیه کند، بهبود کارایی مرتبط با استفاده از سیستم کشت هم‌زمان [2]در تولید جنین در محیط آزمایشگاهی است. در اواخر دهه ۱۹۸۰، ترکیب تکنیک برداشت اووسیت به‌کمک سونوگرافی که معمولاً با عنوان جمع‌آوری اووسیت هدایت‌شده با سونوگرافی یا OPU[3] شناخته می‌شود . با فناوری تولید جنین در محیط آزمایشگاهی در دسترس قرار گرفت. چندین مرکز تلقیح مصنوعی در اروپا، سیستم OPU–IVP را به‌عنوان ابزار اصلی برای تکثیر دام‌هایی با ارزش ژنتیکی بالا به کار گرفتند. در ایالات متحده، ترکیب فناوری OPU–IVP در اواخر دهه ۱۹۹۰ در سطح تجاری پذیرفته شد. در آن زمان، این فناوری عمدتاً برای تولید جنین از ماده‌هایی استفاده می‌شد که به دلایل مختلف قادر به تولید جنین زنده با روش متعارف MOET[4] نبودند. تحت این شرایط، توسعه تجاری فناوری کند پیش می‌رفت؛ اما اخیراً و با ورود اسپرم تعیین جنسیت شده (SS)[5]و انتخاب ژنومی (GS[6]) . نتایج اخیر حاصل از تولید جنین در محیط آزمایشگاهی و همچنین در دسترس قرار گرفتن اسپرم تعیین جنسیت شده از گاوهای نر نخبه‌تر، هر دو به افزایش و تثبیت جایگاه تولید جنین در محیط آزمایشگاهی در بازار دام کمک کرده‌اند.یکی از مهم‌ترین عواملی که در رشد تولید جنین در محیط آزمایشگاهی برجسته است، فناوری سورت معکوس [7]است؛ این روش شامل ذوب‌کردن چند نی اسپرم معمولی غیر تعیین جنسیت شده، سپس جداسازی اسپرم‌ها بر اساس جنسیت با استفاده از فلوسایتومتری، و در نهایت استفاده فوری از اسپرم جنسیت‌سنجی‌شده برای تولید جنین در محیط آزمایشگاهی است .این روش که توسط شرکت Trans Ova Geneticsبه کمال رسید، امکان جنسیت‌سنجی تقریباً هر نوع اسپرم گاوی ذخیره‌شده و منجمد را فراهم کرد. ابزارهای ژنتیکی جدید منجر به بهبود انتخاب دام از طریق انتخاب ژنومی شدند و پیشرفت و بهره‌وری ژنتیکی را تسریع کردند ترکیب فناوری‌های کمک‌باروری (ART) شامل MOET و تولید جنین در محیط آزمایشگاهی با انتخاب ژنومی باعث بیشینه شدن پیشرفت ژنتیکی در گاو می‌شود. افزون بر این، ترکیب بیوپسی‌های به‌دست‌آمده از جنین‌های غیر منتقل‌شده یا آمنیوسنتز در تلیسه‌های جوان با انتخاب ژنومی فشار انتخاب ژنتیکی را بیش از پیش افزایش داده است. جنین‌ها می‌توانند از طریق تولید جنین در محیط آزمایشگاهی از تلیسه‌ها و گاوهای سیکلیک غیرآبستن، ماده‌هایی که به درمان سوپراوولاسیون پاسخ مناسب نمی‌دهند، حیوانات دارای ناهنجاری‌های دستگاه تولیدمثل که انتقال گامت را مختل می‌کنند، یا دام‌هایی که در شرایط انتهایی (سن، بیماری، آسیب) قرار دارند، تولید شوند. به همین ترتیب، از دام‌های آبستن در سه‌ماهه اول بارداری، گاوهای شیرده در دوره پس از زایمان، و

---

[1]- cryotolerance
[2]-co-culture
[3]- Ovum Pickup
[4]- Multiple Ovulation and Embryo Transfer
[5]- Superovulation and Semen (or Sperm) collection
[6]- Genomic Selection
[7]- reverse sorting

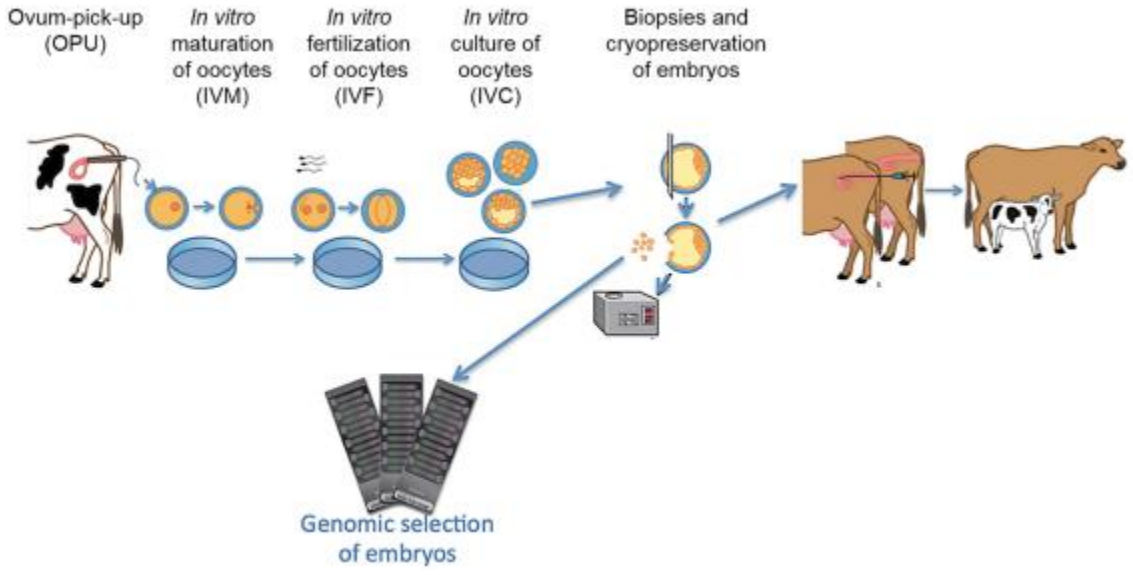
حتی گوساله‌های پیش‌بلوغ نیز می‌توان برای تولید جنین در محیط آزمایشگاهی استفاده کرد. همچنین تخمدان‌های جمع‌آوری‌شده از کشتارگاه‌ها نیز منبع مناسبی برای تولید اووسیت هستند. نخستین گوساله‌هایی که کاملاً از طریق تولید جنین در محیط آزمایشگاهی به‌دست آمدند ، بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها، لقاح آزمایشگاهی و رشد جنینی آزمایشگاهی. پیشرفت چشمگیری در شناخت نیازهای گامت‌ها و جنین‌ها و متابولیسم آن‌ها حاصل شده است که به توسعه محیط‌های کشت بهتر منجر شد و تولید جنین و کیفیت آن را افزایش داد و همچنین باعث کاهش بروز «سندروم نوزاد بزرگ (LOS) شد . پیشرفت‌های عمده امروزی در تولید جنین در محیط آزمایشگاهی به‌دنبال بهبود عملکرد در تمامی مراحل هستند: تحریک تخمدانی، بازیابی اووسیت، بلوغ، لقاح، رشد جنینی، انجماد، انتقال و استقرار آبستنی.

اووسیت‌ها برای تولید جنین در محیط آزمایشگاهی را می‌توان از دو طریق به‌دست آورد:

۱. آسپیره فولیکولی تحت هدایت سونوگرافی از حیوان زنده یا از طریق برداشت تخمدان (اواریکتومی)،

۲. آسپیره فولیکولی پس از مرگ (تخمدان‌های به‌دست‌آمده از کشتارگاه).

در هر دو حالت، اووسیت‌ها از مجموعه‌ای ناهمگون از فولیکول‌های آنترال با اندازه ۲ تا ۸ میلی‌متر آسپیره می‌شوند؛ فولیکول‌هایی که شامل فولیکول‌های مربوط به موج‌های فولیکولی تخمک‌گذاری‌نشده و تخمک‌گذاری‌شونده و همچنین فولیکول‌های غالب و تحت‌سلطه در این موج‌ها هستند. اووسیت‌های موجود در فولیکول‌های غالب بزرگ معمولاً در مرحله موسوم به «پیش‌بلوغ» یا «ظرفیت‌سازی» قرار دارند؛ مرحله‌ای که در آن توانایی لازم برای بلوغ نهایی، لقاح و پشتیبانی از رشد جنینی را کسب می‌کنند.



روند فرآیند برداشت اووسیت Ovum Pickup از گاوهایی با نژاد مختلف، بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها، لقاح آزمایشگاهی ، کشت آزمایشگاهی جنین‌ها، جمع‌آوری بیوپسی‌ها، انتخاب ژنومی با استفاده از نشانگرهای تک‌نوکلئوتیدی (SNP)[1] و انجماد جنین‌ها.

لقاح(Fertilization)

پس از تکمیل بلوغ اووسیت ، اووسیت‌ها برای مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت با اسپرم‌ها همزمان کشت می‌شوند تا لقاح صورت گیرد. تعامل اسپرم_ اووسیت در ظرف بلوغ اووسیت در حجم ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر برای تعداد کم اووسیت‌های OPU و معمولاً در حجم <۴۰۰ میکرولیتر برای اووسیت‌های جمع‌آوری‌شده از کشتارگاه رخ می‌دهد. اسپرم‌ها معمولاً با روش‌های swim-upیا سانتریفیوژ گرادیان چگالی شسته و انتخاب می‌شوند تا محیط انجماد، پلاسمای منی، ذرات و اسپرم‌های مرده حذف شده و بخش متحرک‌تر اسپرم انتخاب شود. اسپرم‌ها همچنین باید با عوامل ظرفیت‌دهنده [2]درمان شوند تا توانایی نفوذ به ZP[3] اووسیت را پیدا کنند . حداقل تعداد اسپرم مورد نیاز برای هر اووسیت به دلیل تفاوت زیاد بین نژادها و گاوها مشخص نیست، اما معمولاً غلظتی بین ۱ تا ۲ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر برای بلوغ اووسیت استفاده می‌شود. بنابراین، تعداد زیادی اووسیت می‌توانند با اسپرم‌های منجمد متعارف لقاح داده شوند، در حالی که اسپرم‌های تعیین جنسیت شده معمولاً حاوی ۲.۱میلیون اسپرم در هر نی هستند و نسخه Sexed Ultra دارای ۴ میلیون اسپرم است. نرخ لقاح، اندازه‌گیری شده به‌عنوان نرخ تقسیم سلولی ۴۸ ساعت پس از تلقیح (و با فرض عدم وقوع پارتنوژنز)، معمولاً بین ٪۷۰ تا ٪۸۵ است. یکی از مزایای اصلی بلوغ اووسیت این است که نیاز به تعداد کمی اسپرم برای لقاح اووسیت‌ها دارد، که استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده را تسهیل می‌کند.

استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده تولید جنین در محیط آزمایشگاهی:

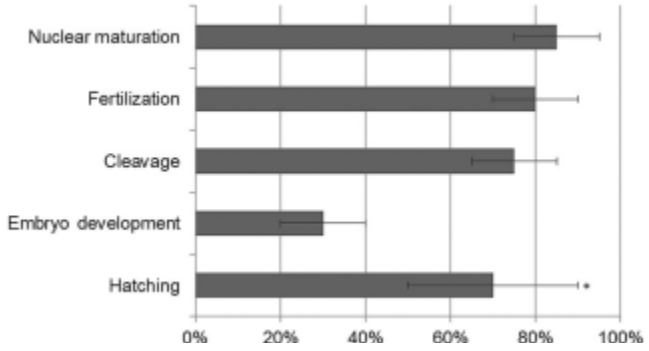
تا کنون، مطالعات علمی محدود به استفاده از تعیین جنسیت شده در تولید جنین در محیط آزمایشگاهی منتشر شده است. داده‌ها عمدتاً عملکرد آن را تحت شرایط معمول بلوغ اووسیت و تفاوت‌ها بین گاوها توصیف می‌کنند . معمولاً تحت شرایط و پروتکل‌های مشابه اسپرم معمولی استفاده می‌شود، و این احتمالاً به نرخ پایین تقسیم سلولی و توسعه جنین کمک کرده است .بنابراین، نفوذ به (ZP)اووسیت به‌نظر می‌رسد یکی از موانع اصلی استفاده از اسپرم های تعیین جنسیت شده باشد. علل احتمالی این عملکرد کاهش‌یافته شامل کاهش بقای پس از ذوب، کاهش تحرک، مشکلات ظرفیت‌دهی و هیپراکتیویشن، و آسیب به آکروزوم یا اختلال در تعامل رنگ فلورسانت با DNA است .تعداد کمی از مطالعات به‌طور کافی اسپرم های تعیین جنسیت شده را با اسپرم معمولی مقایسه کرده‌اند و عوامل هویت گاو نر، نوبت منی، غلظت اسپرم و هپارین را در نظر گرفته‌اند . سایر مقالات به دلیل عدم استفاده از اسپرم‌های یک نوبت منی برای هر دو نوع یا عدم شفافیت داده‌ها، امکان مقایسه صحیح را فراهم نمی‌کنند.

[1]-Single Nucleotide Polymorphism
[2]-capacitating factors
[3]- zona pellucida

مطالعاتی که به‌طور خاص اسپرم های تعیین جنسیت شده و اسپرم معمولی از همان گاو نر را مقایسه کردند دریافتند که تفاوت‌های بیان ژنی ممکن است نقش مهمی در توسعه جنین‌های اولیه وابسته به جنسیت ایفا کند، به ویژه تفاوت‌های ترنسکریپشی که در مرحله پیش‌کاشتن رخ می‌دهد و به اقدامات هورمونی جنسیتی نسبت داده نمی‌شود. همچنین، اختلافات mRNA بین گاوها مشاهده شد، اما بین اسپرم‌های-X و-Y سورت شده تفاوتی نبود، هرچند بین بلاستوسیست‌های مذکر و مونث در سه ژنGSTM3 ، DNMT3Aو PGRMC1 تفاوت مشاهده شد. استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده در تولید جنین در محیط آزمایشگاهی نتایج متفاوتی نشان داده است . این نوسان زیاد می‌تواند ناشی از پروتکل‌های آزمایشگاهی متفاوت و نبود شرایط استاندارد تولید جنین در محیط آزمایشگاهی برای اسپزم تعیین جنسیت شده باشد. در فرآیند سورت فلو سایتمتری، اسپرم تحت درمان‌هایی مانند رنگ‌آمیزی DNA، اثر رقیق‌سازی، نیروهای سانتریفیوژ، فشار بالا، بار الکتریکی، تابش لیزر و انجماد قرار می‌گیرد. کاهش ظرفیت عملکردی اسپرم‌های تعیین جنسیت شده به‌نظر می‌رسد چندعلتی و تجمعی باشد؛ بنابراین بقای پس از ذوب، یکپارچگی اسپرم، وضعیت آکروزوم، عملکرد غشا، الگوی تحرک، کیفیت DNA و یا تجمع آسیب‌ها («اثر تجمعی») ممکن است تحت تأثیر قرار گیرد. یکی از ویژگی‌های متمایز سورت فلو سایتمتری اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Y کاهش قابل توجه تحرک پس از ذوب و طول عمر متوسط است . برای جبران یا کاهش این ناکارآمدی‌ها، تنظیمات مختلفی امتحان شده است، مانند مدت هم‌کاشت اووسیت و اسپرم، دوز اسپرم و غلظت اسپرم.

توسعه جنین

در بلوغ اووسیت ، اووسیت‌های لقاح‌یافته برای مدت ۷ روز تحت توسعه جنین در شرایط آزمایشگاهی قرار می‌گیرند تا به مرحله بلاستوسیست برسند. به‌طور کلی، بین ٪۲۰ تا ٪۴۰ زیگوت‌های کشت‌شده به بلاستوسیست تبدیل می‌شوند. پس از رسیدن به مرحله بلاستوسیست، انتقال جنین مطابق با روش‌های مشابه بلاستوسیست‌های درون‌تنی انجام می‌شود یا جنین‌ها برای استفاده‌های بعدی انجماد می‌شوند. با این حال، تنها جنین‌های تولید جنین در محیط آزمایشگاهی با کیفیت بالا برای انجماد توصیه می‌شوند تا بقای پس از ذوب افزایش یابد، که این امر می‌تواند نرخ بارداری در پروتکل‌های انتقال مستقیم جنین را بهبود بخشد. روش رایج انجماد جنین‌های تولید جنین در محیط آزمایشگاهی هنوز ویتریفیکاسیون است .اگرچه انجماد آهسته دوباره محبوبیت یافته است .روندهای جدید نشان می‌دهند که انتخاب جنین‌های "بهترین" یا با بیشترین مقاومت نسبت به فرایند انجماد برای انتقال مستقیم، بالاترین نرخ بارداری را به همراه دارد. اندازه‌گیری مصرف اکسیژن هر جنین به‌صورت جداگانه، تحلیل مصرف متابولیت‌های کلیدی مانند پیرووات، گلوکز و اسیدهای آمینه، و همچنین تولید متابولیت‌ها از طریق متابولیسم سلولی (مثلاً لاکتات) می‌تواند به‌عنوان استاندارد طلایی برای ارزیابی جنین‌ها در نظر گرفته شود.



موفقیت جنین‌های تولیدشده در شرایط آزمایشگاهی در گاوهایی با نژاد مختلف در هر مرحله متوالی فرآیند

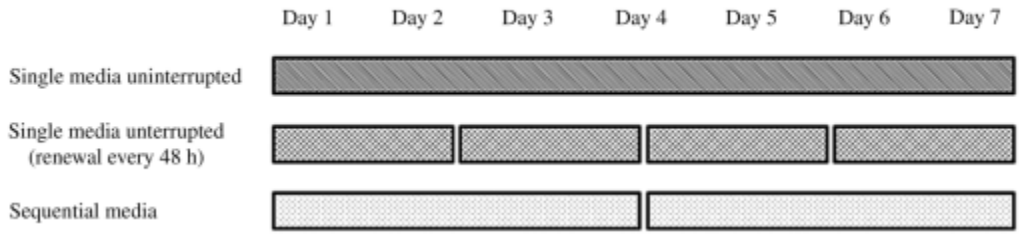
اهمیت محیط کشت در تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی(IVP)

با گسترش استفاده تجاری از تولید جنین در محیط آزمایشگاهی جنین‌های گاوی در سراسر جهان، توجه بیشتری به بهینه‌سازی نرخ تولید بلاستوسیست و کیفیت آن شده است. علاوه بر این، تمرکز بر محدودیت‌های قانونی واردات و صادرات جنین‌هایی که در محیط‌های حاوی سرم حیوانی کشت داده می‌شوند، به دلیل خطر انتشار پاتوژن‌ها، موجب شده است که تمایل به حذف سرم از محیط‌های تولید جنین در محیط آزمایشگاهی افزایش یابد. اگرچه استفاده تجاری از جنین‌های تولید جنین در محیط آزمایشگاهی در حال افزایش است، هنوز نیاز به بهبود بازده و کیفیت جنین وجود دارد تا نرخ بارداری افزایش یافته و امکان انجماد عمیق برای انتقال مستقیم فراهم شود. علاوه بر این، گزینه‌های محدودی از محیط‌های کشت گاوی بدون سرم و فرموله‌شده که مطابق استانداردها و قوانین بین‌المللی IETS باشند، به‌صورت تجاری در دسترس هستند شرکت دانمارکی EmbryoTrans Biotech ApS (Haslev, Denmark)یک مجموعه کامل از محیط‌های تولید جنین در محیط آزمایشگاهی با جایگزین مصنوعی سرم توسعه داده است که در آن تمامی مراحل از تولید جنین ازمایشگاهی ، بلوغ اووسیت و تولید جنین ازمایشگاهی تا مرحله بلاستوسیست در محیط‌های بدون سرم انجام می‌شوند. اکثر آزمایشگاه‌های تجاری و تحقیقاتی تولید جنین در محیط آزمایشگاهی گاوی، محیط کشت خود را به‌صورت داخلی و با استفاده از محلول‌های کشت سلول پستانداران موجود، مانند: Tissue Culture Medium 199 (TCM 199); Sigma-Aldrich یا Tyrode’s Albumin Lactate Pyruvate(TALP) و افزودنی‌های مختلف، آماده می‌کردند. به‌طور کلی، محیط‌های کشت تولید جنین در محیط آزمایشگاهی گاوی نیازمند ترکیباتی مانند محلول متعادل نمکی Earle’s salts) (M199، برای بی‌کربنات سدیم، اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری، -Lگلوتامین، فسفاتاز، پیرووات، آنتی‌بیوتیک‌ها، ویتامین‌ها، EDTA، قند (فروکتوز یا گلوکز) و سایر عوامل محافظ (مانند آنتی‌اکسیدان‌ها) و مواد مغذی یا عوامل تقویت‌کننده عملکرد گامت/جنین هستند.

برای توسعه جنین در محیط ازمایشگاهی، محیط SOFبه‌عنوان رایج‌ترین سیستم کشت پیوسته استفاده شده است. با این حال، در برخی آزمایشگاه‌های تجاری گاوی، علاقه به انجام کشت ترتیبی [1]افزایش یافته است. مفهوم محیط‌های ترتیبی به‌طور خاص برای

[1]-Sequential Culture

پاسخگویی به نیازهای متغیر جنین در طول این دوره توسعه طراحی شده است . سیستم کشت ترتیبی بر این اصل استوار است که جنین در طول رشد خود نیازهای متفاوتی دارد و توانایی متابولیزه کردن گلوکز به تدریج کسب می‌شود. از طرف دیگر، سیستم کشت تک‌فرمی[1] شامل یک فرمولاسیون واحد است که باید توسعه جنین تا مرحله بلاستوسیست را تضمین کند. علم پشت این رویکرد این است که به جنین اجازه داده شود به‌صورت «à la carte» مواد مغذی لازم برای رشد کامل را انتخاب کند . هر دو استراتژی، کشت ترتیبی و تک‌فرمی، می‌توانند به‌طور برابر مؤثر باشند . در حالی که در سیستم تک‌فرمی، اختلالات pH و دما کمتر رخ می‌دهد. مزیت کاهش دستکاری‌های خارج از انکوباتور می‌تواند عملکرد تشکیل بلاستوسیست را بهبود بخشد و به‌عنوان یک عامل جبرانی عمل کند. تولید عوامل اتوکرین/پاراکرین مفید توسط جنین‌های نزدیک به هم و حفظ شرایط کشت ثابت، می‌تواند به افزایش غلظت این عوامل تقویت‌کننده جنین و در نتیجه افزایش بقای آن‌ها کمک کند .



نمایش شماتیک سه روش کشت جنین‌های گاو هایی با نژاد مختلف از مرحله زیگوت تا بلاستوسیست

این شکل به‌صورت شماتیک سه رویکرد اصلی برای کشت جنین گاوی را از مرحله زیگوت تا مرحله بلاستوسیست نشان می‌دهد:

۱. سیستم کشت تک‌فرمی:(Monoculture System)

- ✓ در این رویکرد، جنین‌ها در یک محیط کشت یکپارچه با فرمولاسیون ثابت از مرحله زیگوت تا بلاستوسیست قرار می‌گیرند.
- ✓ مزیت اصلی آن، کاهش دستکاری‌های خارج از انکوباتور است که می‌تواند باعث بهبود نرخ تشکیل بلاستوسیست و افزایش بقای جنین شود.

۲.سیستم کشت ترتیبی:(Sequential Culture System)

- ✓ در این رویکرد، جنین‌ها بر اساس نیازهای متابولیک و رشدی خود در مراحل مختلف، به محیط‌های کشت متفاوت منتقل می‌شوند.

[1]-Monoculture

- ✓ این روش بر اساس این اصل طراحی شده است که جنین در طول رشد خود نیازهای متفاوتی دارد و توانایی متابولیزه کردن گلوکز و سایر مواد مغذی را به تدریج کسب می‌کند.

۳.استفاده از محیط‌های شرطی‌شده یا هم‌کشت با سلول‌های اپیتلیال

در این روش، جنین‌ها در حضور سلول‌های اپیتلیال لوله فالوپ گاو یا محیط‌های حاوی ترکیبات ترشح شده توسط این سلول‌ها کشت داده می‌شوند.

- ✓ مزیت این رویکرد، فراهم کردن شرایط شبه‌فالوپی طبیعی است که می‌تواند نرخ بلاستوسیست، کیفیت جنین و موفقیت انجماد و انتقال را بهبود دهد.
- ✓ این روش همچنین می‌تواند شامل افزودن عوامل اتوکرین/پاراکرین و اگزوزوم‌ها برای بهبود توسعه جنین باشد.

۴.انکوباتورهای مدرن و پایش جنین

انکوباتورهای مدرن روی میز کار از ظرفیت بزرگ ۱۵۰ لیتر به محفظه‌های کوچک ۵۰۰ میلی‌لیتر تغییر کرده‌اند. این انکوباتورها دارای چندین محفظه مستقل هستند که هرکدام مجهز به حسگرهای دما، CO_2و O_2 می‌باشند و امکان کنترل کامل محیط هر محفظه را فراهم کرده و زمان بازیابی شرایط ایده‌آل را کوتاه می‌کنند. با استفاده از سیستم‌های پایش جنین در زمان واقعی که دارای دوربین‌های داخلی هستند، امکان مشاهده سرعت رشد جنین و شناسایی ناهنجاری‌های مورفولوژیک در مراحل مختلف توسعه فراهم شده است. این سیستم‌ها ترکیبی از ظاهر جنین (مورفولوژی) و زمان‌بندی تقسیمات سلولی اولیه را به نرم‌افزارهای کامپیوتری منتقل می‌کنند تا جنین‌های زنده و با پتانسیل بالای لانه‌گزینی شناسایی شوند. نسل بعدی سیستم‌های کشت جنین احتمالاً بر پایه فناوری میکروفلوئیدیک خواهد بود، که از کشت ایستا به کشت دینامیک تغییر می‌دهد، افزودن خودکار مواد شیمیایی خاص در زمان مشخص و تغییر تدریجی ترکیب محیط را امکان‌پذیر می‌سازد و از شوک‌های دمایی و pH جلوگیری می‌کند.

۵.اهمیت محیط کشت دینامیک و شبیه‌سازی شرایط طبیعی

در شرایط طبیعی، جنین از لوله فالوپ به حفره رحم منتقل می‌شود که ترکیب مایعات و جو گازی متفاوت است. بنابراین، سیستم‌های کشت ایستا قادر به بازسازی کامل محیط رشد جنین نیستند. سیستم‌های دینامیک امکان تغییر تدریجی و دقیق محیط کشت، تأمین مواد مغذی مصرف شده، حذف ضایعات متابولیکی و خودکارسازی فرآیندهای خاص مانند دنودیشن را فراهم می‌کنند و فشار محیطی را بر گامت‌ها و جنین کاهش می‌دهند.

پلتفرم‌ها و دستگاه‌های نوین می‌توانند مسیر بهینه‌سازی شرایط کشت جنین را فراهم کنند و عملکرد گامت‌ها، زنده‌مانی، مقاومت به انجماد و نرخ بارداری را به حداکثر برسانند. هرچند کیفیت جنین‌های حاصل از تولید جنین در محیط آزمایشگاهی هنوز پایین‌تر از جنین‌های طبیعی است، اما کشت زایگوت‌های گاوی تولید جنین در محیط آزمایشگاهی تحت شرایط درون تنی می‌تواند کیفیت آن‌ها را مشابه جنین‌های کاملاً طبیعی بازگرداند.

مشکلات فعلی تولید جنین در محیط آزمایشگاهی:

- جنین‌های تولید شده در محیط آزمایشگاهی نسبت به جنین‌های طبیعی قابلیت لانه‌گزینی کمتری دارند و نسبت به انجماد حساس‌تر هستند.
- جنین‌های برون تنی در مراحل چهار سلولی و مورولا به شرایط کشت حساس هستند.
- تفاوت‌های بیان ژن، متابولیسم و تحمل بین جنین‌های درون تنی و برون تنی معمولاً به‌عنوان پاسخ سازگارانه به محیط کشت تلقی می‌شوند.
- انتخاب جنین قبل از انتقال هنوز بر اساس تحلیل مورفولوژیکی و تجربی است؛ بنابراین، روش‌های غیرتهاجمی جدید برای پیش‌بینی پتانسیل رشد و موفقیت لانه‌گزینی نیاز است.

روش‌هایی مانند مورفوکینتیک و غربالگری ژنومی پیشرفته ممکن است در آینده به‌طور روتین در آزمایشگاه‌های تولید جنین در محیط آزمایشگاهی تجاری برای انتخاب جنین استفاده شوند. فناوری‌های ویرایش ژنومی و اپی‌ژنومی مانند CRISPR-Cas9 نیز می‌توانند برای کاربردهای زیست‌پزشکی و بهینه‌سازی ژنتیکی جنین به کار روند.

نتیجه‌گیری:

تولید جنین در محیط آزمایشگاهی به عنوان یکی از پیشرفته‌ترین فناوری‌های کمک‌باروری در دامپروری، توانسته است جایگاه مهمی در بهبود بهره‌وری و پیشرفت ژنتیکی گاو پیدا کند. موفقیت تولید جنین در محیط آزمایشگاهی به شدت به کیفیت اووسیت‌ها، ویژگی‌های اسپرم، بهینه‌سازی محیط کشت و مدیریت دقیق مراحل بلوغ، لقاح و توسعه جنین وابسته است. پیشرفت‌های اخیر، از جمله استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده، انتخاب ژنومی، محیط‌های کشت پیشرفته و سیستم‌های پایش دینامیک، توانسته‌اند بازده و کیفیت جنین‌ها را افزایش دهند و محدودیت‌های سنتی تولید جنین در محیط آزمایشگاهی مانند حساسیت جنین‌ها به انجماد و نرخ پایین لانه‌گزینی را کاهش دهند. با این حال، تفاوت‌های موجود بین جنین‌های برون تنی و درون تنی از نظر متابولیسم، بیان ژن و تحمل محیطی، نیاز به بهینه‌سازی بیشتر پروتکل‌ها و توسعه روش‌های انتخاب جنین پیشرفته دارد. به طور کلی، تولید جنین در محیط آزمایشگاهی نه تنها امکان تولید جنین‌های با کیفیت و افزایش کارایی تولید مثل را فراهم می‌کند، بلکه به عنوان یک پلتفرم علمی و کاربردی برای تحقیق در زیست‌شناسی تولید مثل و بهبود ژنتیکی دام مطرح است و چشم‌انداز روشنی برای تجاری‌سازی گسترده و ارتقای نسل‌های با ارزش ژنتیکی ارائه می‌دهد.

References:

[1] Albus FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG and Gilchrist RB 2010. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. Human Reproduction 25, 2999–3011.

[2] de Sousa RV, da Silva Cardoso CR, Butzke G, Dode MAN, Rumpf R and Franco MM 2017. Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. Theriogenology 90, 25–31.

[3] Baldassarre H, Currin L, Mihailovic L, Bellefleur AM, Gutierrez K, Mondadori RG, Glanzer WG, Schuermann Y, Bohrer RC, Dicks N, Lopez R, Grand FX, Vigneault C, Blondin P, Gourdon J and Bordignon V 2018. Interval of gonadotropin administration for in vitro embryo production from oocytes collected from Holstein calves between 2 and 6 months of age by repeated laparoscopy. Theriogenology 116, 64–70.

[4] Gonzalez-Marin C, Lenz RW, Gilligan TB, Evans KM, Gongora CE, Moreno JF and Vishwanath R 2017. Sexed ULTRA™, a new method of processing sex sorted bovine sperm improves post-thaw sperm quality and in vitro fertility. Reproduction, Fertility and Development 29, 204–204

[5] Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Freitas BG, Bragança LGM, Marques KNG, Sá Filho MF, B ´o GA, Maplesoft RJ and Brunelli PS 2016. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. Theriogenology 85, 877–886

[6] Sirard MA 2018. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. Reproduction 156, R1–R7.