

Evaluation of different strain mice during in vitro fertilization and embryo development in response to superovulation

Jalleh Shakerzadeh¹, Mansoureh Movahedin², Akram Eidi¹, Nasim Hayati Roodbari¹, Kazem Parivar¹

¹ Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Anatomical Sciences Department, Medical Science Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Mice are the most commonly used animal in reproductive research and following the urgent need for these type of studies and also due to the increased interest in the ethical principle of animal rights, four various inbred and outbred strains of the laboratory mouse were evaluated to select the more efficient one for reproductive research.

Materials and methods: 60 female and 16 male of strains (C57, CD1, NMRI, and Balb/c) weighing 25 to 30g and aged 6 to 8 weeks were evaluated under same conditions at different stages of mature oocyte collection, fertilization and *in vitro* embryo development up to the blastocyst stage. The data were analyzed using a chi-square test, and the selected significance level was $p < 0.05$.

Results: Among the four strains, the highest to lowest fetal survival rates were for the CD1, NMRI, Balb /C and C57 mice, respectively and their values were 38.9, 14.4, 9.1 and 3.1%, individually.

Conclusion: Considering the results, we conclude that it is not possible to obtain optimal results for some strains due to using same instructions. The results showed that the highest rate of fertilization and embryo development up to the 8-cell stage was observed in the outbred CD1 mice. It seems that this strain is more applicable than others for reproductive research. In addition, we believe that using different medium during fertilization and embryo development as well as laboratory conditions, probably assist in improving the embryo production while minimized the required number of animals and allowed the achievement of the desired result.

Keywords: *Invitro fertilization, Superovulation, Inbred mice, Outbred mice, Infertility treatment.*

Cited as: Shakerzadeh J, Movahedin M, Eidi A, Hayati Roodbari N, Parivar K. Evaluation of different strain mice during in vitro fertilization and embryo development in response to superovulation. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 32(1): 53-63.

Correspondence to: Mansoureh Movahedin

Tel: +98 02182884502

E-mail: movahed.m@modares.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-0767-6519

Received: 3 Jul 2021; **Accepted:** 28 Sep 2021

بررسی تفاوت سویه های مختلف موش در میزان لقاح آزمایشگاهی و تکوین جنین در پاسخ به تحریک تخمک گذاری

ژاله شاکرزاده^۱، منصوره موحدین^۲، اکرم عیدی^۱، نسیم حیاتی^۱، کاظم پریور^۱

^۱ گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: موش رایج ترین مدل حیوانی در تحقیقات تولید مثلی است و به دنبال نیاز ضروری به این مطالعات و همچنین افزایش اهمیت اصول اخلاقی در حیوانات، ۴ سویه مختلف درون زاد و برون زاد با هدف انتخاب موش آزمایشگاهی کارآمدتر برای تحقیقات تولید مثلی، مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: ۶۰ سر موش ماده و ۱۶ سر موش نر به وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم و سن ۶ تا ۸ هفته از سویه های *Balb/c*، *CD1*، *NMRI* و *C57* در مراحل مختلف جمع آوری تخمک و تکوین جنین تا مرحله بلاستوسیست، در شرایط یکسان، مورد ارزیابی قرار گرفتند و کلیه داده ها توسط آزمون *chi-square* تحلیل شدند.

یافته ها: در بین ۴ سویه مختلف، به ترتیب بیشترین تا کمترین درصد زنده ماندن جنین مربوط به موشهای *CD1*، *NMRI*، *BALB/c* و *C57* و مقادیر آنها به ترتیب برابر با ۳۸/۹، ۱۴/۴، ۹/۱ و ۳/۱ درصد بود.

نتیجه گیری: با در نظر گرفتن نتایج تحریک تخمک گذاری و لقاح آزمایشگاهی، چنین نتیجه میگیریم که با یک روش یکسان، امکان حصول نتیجه بهینه وجود ندارد. نتایج نشان می دهد که بالاترین تعداد تکوین جنین تا مرحله ۸ سلولی در موش برون زاد *CD1* مشاهده شد و به نظر می رسد که این سویه از موش، مدل مناسب تری برای مطالعات تولید مثلی است. همچنین استفاده از محیط های کشت متفاوت و در نظر گرفتن فواصل تزریق هورمون و میزان آن، احتمالاً می تواند تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی را بهبود بخشیده و گرفتن نتیجه دلخواه با استفاده حداقل تعداد حیوان را امکان پذیر سازد.

واژگان کلیدی: لقاح آزمایشگاهی، تحریک تخمک گذاری، موش درون زاد و برون زاد، درمان ناباروری.

مقدمه

دهه های گذشته، میزان موفقیت در حفظ باروری و تولد نوزاد به دنبال انتقال جنین در این روش، نسبتاً کم و در حدود ۳۰٪ باقی مانده است (۱). عوامل بسیاری، از جمله آناتومی رحم مادر، هورمون ها، فاکتورهای رشد، سایتوکاین ها و تنظیم کننده های مولکولی در موفقیت یک چرخه IVF تأثیرگذار هستند (۲، ۳). تولید جنین به دنبال فناوری های کمک باروری به القای تخمک گذاری، لقاح آزمایشگاهی و همین طور، کشت آزمایشگاهی کارآمد بستگی دارد و کیفیت خوب تخمک نیز یکی از اساسی ترین فاکتورهای موفقیت در تکنیک های لقاح آزمایشگاهی است (۴).

استفاده از روش های کمک باروری با بازدهی بیشتر و عوارض کمتر، مهم ترین هدف درمانی کمکی برای زوج های نابارور است. با توجه به گذشت ۳۰ سال از شروع درمان ناباروری، علی رغم پیشرفت های بسیار در مسیر IVF (*in vitro fertilization*) طی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، منصوره موحدین

(email: movahed.m@modares.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-0767-6519

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۴/۱۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۷/۶

دارد (۱۹). اگر این فرض معتبر باشد، باید بتوان داده‌های آماری قوی‌تری را با تعداد موش‌های درون‌زاد کمتری در مقایسه با تعداد مورد نیاز در آزمایش‌های مبتنی بر سوبه‌های برون‌زاد، به دست آورد که مزایای عملی و اخلاقی نیز دارد. با این حال، شواهد مربوط به تنوع فنوتیپی کمتر بین موش‌های درون‌زاد متفاوت است، به طوری که برخی از مطالعات (۲۰) صریحاً چیزی غیر از این را نشان می‌دهند. با این وجود، این ایده که ناهمسانی ژنتیکی منجر به بیشتر شدن تنوع فنوتیپی می‌شود، قانع‌کننده است و طرفداران آن مخالف استفاده از سوبه‌های برون‌زاد در تحقیقات زیست‌پزشکی هستند (۲۱، ۲۲).

سوبه‌های موش برون‌زاد، که اغلب در تحقیقات ژنتیک، سم‌شناسی و داروسازی استفاده می‌شوند، با روش‌های کاملاً اتفاقی تولید شده‌اند. شناخت ویژگی‌های این سوبه‌ها و مزایا و معایب‌شان برای انجام طرح‌های آزمایشی مهم است. در بسیاری از مطالعات، استفاده نکردن از سوبه موش مناسب، باعث از بین رفتن تعداد زیادی از منابع حیوانی در تحقیقات می‌شود (۱۹).

به دلیل طیف گسترده کاربردهای سوبه‌های مختلف در زمینه‌های متنوع علمی و همچنین در مطالعات تعداد و کیفیت تخمک در زمان تخمک‌گذاری، انجام لقاح آزمایشگاهی و توانایی زنده ماندن و حفظ جنین در آزمایشگاه و همچنین حفظ باروری در سوبه‌های مختلف نیز در مطالعات بالینی ناباروری جهت تعیین موش آزمایشگاهی مناسب و موفق بسیار ضروری به نظر می‌رسد. در بین مدل‌های مختلف موش، تفاوت وجود دارد و آگاهی از این تنوع، حائز اهمیت است. موش‌هایی که بیشترین استفاده را در تحقیقات آزمایشگاهی دارند، عبارتند از موش Balb/C، Sprague-Dawley و موش Wistar. از سوبه‌های دیگر مانند موش NMRI، موش CD1 و موش ICR نیز استفاده بسیاری شده است. اکثر این حیوانات توسط چهار ارائه‌دهنده اصلی (آزمایشگاه جکسون، آزمایشگاه‌های رودخانه چارلز، آزمایشگاه‌های علوم تاکونیک و آزمایشگاه‌های هارلان) تهیه می‌شوند. مدل‌های حیوانی فوق‌الذکر برای تحقیق در ایمونولوژی، انکولوژی، فیزیولوژی، آسیب‌شناسی و به صورت انبوه در علوم اعصاب استفاده می‌شوند (۲۳).

Balb/C: یکی از معمولی‌ترین موش‌های درون‌زاد است و یک سوبه آلبینو است که دارای ویژگی‌های تولید مثل آسان و تغییرات حداقلی وزنی بین ماده و نر است. در حالی که موش‌های Balb/C به عنوان یک مدل حیوانی عمومی استفاده می‌شوند، به طور گسترده‌ای برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال و به‌ویژه برای تحقیقات در سرطان‌درمانی و ایمونولوژی مفید هستند (۲۴).

موش رایج‌ترین مدل حیوانی در تحقیقات تولید مثلی، به‌ویژه مطالعه تخمک‌های بالغ و یا بررسی رشد جنین قبل از لانه‌گزینی است. همچنین برای تعیین اثرات فاکتورهای مختلف بر میزان تخمک‌گذاری و یا برای بررسی رشد جنین قبل از لانه‌گزینی به تعداد زیادی تخمک و جنین نیاز است (۵، ۶). بنابراین تعداد موش‌های مورد نیاز برای آزمایش‌های متعدد افزایش می‌یابد. با این حال، در سال‌های اخیر، به دلیل اهمیت اصول اخلاقی در مراقبت از حقوق حیوانات، با تعیین و معرفی سوبه موش مناسب برای هر مطالعه، می‌توان تعداد موش مورد استفاده در هر مطالعه را کاهش داد.

تحریک تخمک‌گذاری، یک تیمار هورمونی است که باعث رشد فولیکول و تخمک‌گذاری تخمک‌های بالغ مرحله MII (متافاز ۲) می‌شود. عوامل زیادی در ایجاد این تحریک تخمک‌گذاری و در ادامه، در کشت جنین مؤثر هستند که می‌توان به سن (۷)، سوبه (۸)، دوز هورمون (۹) و فاصله تزریق (۸) اشاره کرد. به نظر می‌رسد که ساختار ژنتیکی، یکی از پارامترهای مؤثر در پاسخ به تحریک تخمک‌گذاری است (۱۰). گزارش شده است که تحریک تخمک‌گذاری موش‌ها با سوبه و با فاصله مناسب تزریق گنادوتروپین ارتباط زیادی دارد (۱۱). گزارشی در مورد استفاده از سوبه‌های مختلف حیوانات آزمایشگاهی در پروتکل‌های تحریک تخمک‌گذاری (IVF) (۱۴، ۱۵) و (IVD) *in vitro* (development) (۱۶، ۱۷) وجود دارد. برای به‌دست آوردن نتایج رضایت‌بخش در چنین آزمایش‌هایی، با بهترین نتیجه در تولید تخمک و جنین و استفاده کمتر از حیوانات آزمایشگاهی، نیازمند تعیین سوبه مناسب‌تر برای تحقیقات تولید مثلی هستیم.

چندین دهه است که سوبه‌های موش درون‌زاد یا خالص، به موش‌های برون‌زاد ترجیح داده شده‌اند، و سوبه‌هایی مانند C57 و Balb/C به شکل وسیعی در کاربردهای زیست‌پزشکی استفاده می‌شوند. مزیت استفاده از موش‌های درون‌زاد (Inbred) (خالص) نسبت به موش‌های برون‌زاد (outbred) بر این است که صفات آن‌ها تنوع و تغییرپذیری کمتری دارد (۱۸).

موش‌های درون‌زاد، ترجیحاً برای مطالعات ایمونولوژیک، نقشه‌برداری ژنتیکی جمعیت و مطالعات ژنتیکی-مولکولی (برای جلوگیری از اثرات زمینه‌ای در جهش‌زایی و تراخیخته‌ها) انتخاب می‌شوند. ترجیح اکثریت برای سوبه‌های درون‌زاد در تحقیقات زیست‌پزشکی از باورهای متعارف ناشی می‌شود که این حیوانات باید تنوع فنوتیپی درون، سوبه‌ای کمتری نسبت به حیوانات برون‌زاد نشان دهند؛ زیرا هر گونه تنوع فنوتیپی سوبه درون‌زاد به دلیل تنوع محیطی است؛ در حالی که در حیوانات برون‌زاد، علاوه بر تنوع محیطی و برهم‌کنش ژن با محیط، تنوع ژنتیکی نیز وجود

مراحل آزمایش

این آزمایش شامل ۴ مرحله است:

مرحله اول: تحریک تخمک گذاری و جمع آوری تخمک بالغ MII (متافاز ۲)، مرحله دوم: تهیه و آماده سازی اسپرم، مرحله سوم: لقاح آزمایشگاهی (IVF) و مرحله چهارم: تکوین جنین در آزمایشگاه (IVD).

مرحله اول: تحریک تخمک گذاری و جمع آوری تخمک بالغ

از هر کدام از سویه های درون زاد و برون زاد، تعداد ۱۵ سر موش ماده و ۴ سر موش نر استفاده شد. تمامی موش های ماده به منظور تحریک تخمک گذاری، با پروتکل یکسان به صورت تزریق داخل صفاقی ابتدا به وسیله IU ۷/۵ هورمون گنادوتروپین (PMSG) (Pregnant mare's serum gonadotropin) از شرکت (Folligon, Intervet) در روز پنجشنبه و سپس IU ۷/۵ هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) human chorionic gonadotropin از شرکت (تولید دارو، ایران)، با فاصله ۴۸ ساعته، در روز شنبه تیمار شدند.

گنادوتروپین ها بدون توجه به چرخه فعلی، تزریق شدند. تخمک گذاری در موش های ماده بر اساس پروتکل استاندارد (IU ۷/۵ گنادوتروپین با فاصله ۴۸ ساعته بین دو هورمون) تحریک شده و میزان تحریک تخمک گذاری بین موش های مختلف مقایسه شد. برای برداشتن تخمک بالغ MII، پس از گذشت ۱۴ ساعت از تزریق هورمون دوم یا hCG در روز یکشنبه، موش های ماده با روش نخاعی کشته شدند. درصد موش هایی که دچار تحریک تخمک گذاری شده و تعداد تخمک های تخمک گذاری شده، بلافاصله پس از بازیابی تخمک ها ثبت شد. پس از پیست کردن ملایم، تخمک ها برای حضور اولین جسم قطبی (تخمک بالغ در مرحله متافاز ۲ به نام MII) توسط میکروسکوپ معکوس ارزیابی شدند و تعداد آن ها ثبت شد (۲۹).

مرحله دوم: آماده سازی اسپرم

اسپرم از موش نری با باروری ثابت شده و ۶ تا ۸ هفته سن، تهیه شد. به این ترتیب که در ابتدای روز لقاح آزمایشگاهی (روز یکشنبه)، موش با روش نخاع گردنی کشته شد. پس از جداسازی اپیدیدیم، هر ناحیه به یک پلیت انتقال داده شد و با کمک سوزن انسولین، روی بافت، چندین برش به منظور رها شدن اسپرم ها ایجاد شد. پلیت محتوی نمونه در انکوباتور قرار داده شد و به مدت یک ساعت برای ظرفیت پذیری انکوبه شد. پس از یک ساعت، اسپرم های متحرک و سالم که خود را به اطراف قطرات حاوی محیط کشت HTF (ژنوسل، ایران) رسانده بودند، برای انجام IVF جمع آوری شدند (۲۹).

C57: همان موش های 6/ C57BL یا 6/ C57 black هستند که به سادگی، 6/ Black یا به اختصار C57 یا B6 نیز نامیده می شوند. این موش ها، درون زاد بوده و اغلب به عنوان مدل های فیزیولوژیکی یا پاتولوژیک برای مطالعات in vivo خدمت می کنند و همچنین برای ساخت مدل های موش تراریخته استفاده می شوند (۲۵).

CD1: در حالی که هر دو موش C57BL/6 و Balb/C سویه هایی درون زاد هستند، موش های CD1، برون زاد هستند. (توجه: موش های درون زاد به عنوان «سویه» شناخته می شوند؛ در حالی که موش های برون زاد معمولاً «ذخیره» یا «استوک» نیز نامیده می شوند). این موش آزمایشگاهی در اهداف بسیار متنوع و چندگانه، از جمله در مطالعات آنکولوژی، پیری، ایمنی، سمیت و سرطان، مورد استفاده قرار گرفته اند (۲۸-۲۶).

NMRI: به عنوان سویه برون زاد به طور انبوه، تولید، ارزیابی و مورد مطالعه قرار می گیرد. مطالعات بسیاری روی این نوع موش انجام گرفته است؛ اما عمده ترین این مطالعات روی سم شناسی، ترانولوژی، فارماکولوژی (به ویژه در روان درمانی برای مطالعات رفتاری)، فیزیولوژی و تولید مثلی است (۱۸).

در این تحقیق، با هدف انتخاب نوع مناسب تر و کارآمدتر موش آزمایشگاهی برای مطالعات تولیدمثلی و ناباروری، ما اثر سویه های مختلف موش های درون زاد و برون زاد را بر میزان تحریک تخمک گذاری، لقاح آزمایشگاهی و همچنین در ادامه، تکوین جنین به مرحله بلاستوسیست در آزمایشگاه (IVD) در موش های CD1، C57، Balb/C و NMRI مورد ارزیابی قرار دادیم.

مواد و روشها

حیوانات

۶۰ سر موش ماده و ۱۶ سر موش نر با وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم و سن ۶ تا ۸ هفته از سویه های Balb/C و NMRI، CD1، C57، از پژوهشگاه رویان (تهران، ایران) خریداری شدند. آزمایشات حیوانی طبق «اصول راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات» انجام شدند. حیوانات در یک دوره نوری ۱۲ ساعت نور / ۱۲ ساعت تاریکی در دمای کنترل شده (22 ± 2 درجه سانتیگراد) و رطوبت ۵۰ درصد با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. همچنین، تمامی حقوق حیوانی مطابق با دستور العمل دانشگاه «علوم تحقیقات» برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد و با شناسه اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1398.123 مصوب شد. نمونه های موشی بر اساس اصول دام پزشکی به روش قطع نخاع گردنی کشته شدند.

مرحله سوم: لقاح آزمایشگاهی

گروه‌های مورد مطالعه برای لقاح آزمایشگاهی به این ترتیب آماده شدند:

گروه A: اسپرم ظرفیت‌یابی شده NMRI به قطره محیط HTF (human tubal fluid) حاوی تخمک‌های NMRI اضافه شد. گروه B: اسپرم ظرفیت‌یابی شده CD1 به قطره محیط HTF حاوی تخمک CD1 منتقل شد. گروه C: اسپرم ظرفیت‌یابی شده Balb/C به قطره محیط HTF حاوی تخمک‌های Balb/C منتقل شد. گروه D: اسپرم ظرفیت‌یابی شده C57 به قطره محیط HTF حاوی تخمک C57 منتقل شد.

به هر قطره IVF حدود 2×10^6 اسپرم در میلی‌لیتر اضافه شد. برای IVF، محیط mHTF با ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاو (BSA) (Sigma-Aldrich, Germany) غنی‌سازی گردید. سپس این مخلوط به مدت ۶ ساعت در انکوبار CO₂ ۶٪ انکوبه شد. ظرفیت‌یابی اسپرم و انکوباسیون IVF در ۶٪ CO₂ دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام گرفت. به منظور ارزیابی میزان لقاح، سلول‌های اسپرم و کومولوس به آرامی با پیپت از پلیت خارج شدند و تعداد تخم‌های حاوی پیش‌هسته نر و ماده (2PNs) شمارش شد. پس از گذشت این زمان، تخمک‌های لقاح‌یافته را یک بار دیگر شست‌وشو داده و به پلیت جدید حاوی قطرات ۳۰ میکرولیتری HTF انتقال داده شد. در هر قطره، ۵ تا ۱۰ تخمک لقاح‌یافته انتقال داده شد. (۲۹).

مرحله چهارم: رشد جنین در شرایط آزمایشگاهی

۲۲-۲۵ ساعت پس از لقاح، جنین دو و چهار سلولی مشاهده شد و پس از شست‌وشو و انتقال به محیط جدید HTF، جنین ۸

سلولی ۴۸ ساعت بعد ایجاد شد. قطرات IVD، ۲۵ میکرولیتری بود و توسط روغن معدنی پوشانیده شد. رشد و نمو رویان با شمارش سلول، ۴ سلول، ۸ سلول، بلاستوسیست، به ترتیب، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از لقاح به وسیله استریومیکروسکوپ مشاهده شد و تعداد آن‌ها به صورت مشاهده تجربی و ارزیابی مورفولوژیکی چشمی ثبت شد. سرانجام، نرخ IVD در همه گروه‌ها با یکدیگر مقایسه شد؛ در حالی که در تمام مراحل آزمایشگاهی از محیط HTF استفاده شد.

تحلیل داده‌ها

کلیه داده‌ها در جداول ۲*۲ جمع‌آوری شده و آنالیز نتایج لقاح و تکوین جنین‌ها توسط آزمون chi-square مورد بررسی قرار گرفت. $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. پس از جمع‌آوری و کدگذاری داده‌ها از نرم‌افزار spss نسخه ۲۵ به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

تحریک تخمک‌گذاری

مقایسه تحریک تخمک‌گذاری و تعداد تخمک‌های بالغ (MII) که دارای اولین جسم قطبی بودند، در بین موش‌های Balb/C، NMRI، CD1 و C57 در جدول ۱ نشان داده شده است.

با توجه به جدول ۱، ۶/۹ درصد از از تخمک‌های به‌دست‌آمده از موش NMRI غیر بالغ MI (متافاز ۱ فاقد جسم قطبی) بودند و ۹۳/۱ درصد در گروه MII بالغ

جدول ۱. آمار تجربی مقایسه دوبره‌دو در چهار سویه موش نسبت به یکدیگر بر اساس تعداد تخمک پس از تحریک تخمک‌گذاری و همچنین تعداد تخمک مرحله MII (متافاز ۲)

CD1/NMRI				C57/NMRI				Balb/NMRI			
غیرفعال	MII	کل	P value	غیرفعال	MII	کل	P value	غیرفعال	MII	کل	P value
۵/۱۱	۱۸۸/۱۴۹	۱۹۳/۱۶۰	۰/۰۵۴	۴۲/۱۱	۸۶/۱۴۹	۱۲۸/۱۶۰	۰/۰۰۱	۱۴/۱۱	۱۱۸/۱۴۹	۱۳۲/۱۶۰	۰/۲۵۷
CD1/C57				CD1/Balb				Balb/C57			
غیرفعال	MII	کل	P value	غیرفعال	MII	کل	P value	غیرفعال	MII	کل	P value
۵/۴۲	۱۸۸/۸۶	۱۹۳/۱۲۸	۰/۰۰۱	۵/۱۴	۱۸۸/۱۱۸	۱۹۳/۱۳۲	۰/۰۰۱	۱۴/۴۲	۱۱۸/۸۶	۱۳۲/۱۲۸	۰/۰۰۱

جدول ۲. آمار تجربی مقایسه دوبره‌دو در چهار سویه موش نسبت به یکدیگر بر اساس نرخ تبدیل شدن از مرحله MII به 2PN

CD1/NMRI				C57/NMRI				Balb/NMRI			
غیرفعال	2PN	کل	P value	غیرفعال	2PN	کل	P value	غیرفعال	2PN	کل	P value
۱۱/۳۶	۱۷۷/۱۱۳	۱۸۸/۱۴۹	۰/۰۰۱	۵۴/۳۶	۳۲/۱۱۳	۸۶/۱۴۹	۰/۰۰۱	۳۲/۳۶	۸۶/۱۱۳	۱۱۸/۱۴۹	۰/۳۰۳
CD1/C57				CD1/Balb				Balb/C57			
غیرفعال	2PN	کل	P value	غیرفعال	2PN	کل	P value	غیرفعال	2PN	کل	P value
۱۱/۵۴	۱۷۷/۳۲	۱۸۸/۸۶	۰/۰۰۱	۱۱/۳۲	۱۷۷/۸۶	۱۸۸/۱۱۸	۰/۰۰۱	۳۲/۵۴	۸۶/۳۲	۱۱۸/۸۶	۰/۰۰۱

۱۰۳/۷۱۸ و سطح معنی داری آن ۰/۰۰۳ بود که کمتر از ۰/۰۵ است و نشان دهنده معنی دار بودن آن است. بیشترین و کمترین درصد فعال ماندن و انجام لقاح موفق و تشکیل 2PN به ترتیب مربوط به سویه های موش CD1 و C57 و مقادیر آن ها به ترتیب برابر با ۹۴/۱ و ۳۷/۲ درصد بود.

میزان لقاح موفق و تبدیل شدن تخمک مرحله متافاز ۲ (MII) به 2PN در سویه CD1 بیشتر بود و تفاوت معنی داری با دیگر سویه ها مشاهده شد ($p < 0.05$). همچنین در مقایسه دوجه دو در سایر سویه ها مشاهده شد که بین دو موش NMRI و C57 میزان تشکیل 2PN در NMRI بیشتر بود. همچنین بین دو موش C57 و Balb/C میزان تشکیل 2PN در Balb/C بیشتر بود و بین NMRI و Balb/C، از این لحاظ، تفاوت معنی داری وجود نداشت.

تکوین جنین در آزمایشگاه IVD

درصد تشکیل جنین به ترتیب در مرحله ۲ و ۴ و ۸ سلولی و سپس مرحله بلاستوسیست در نمونه های مختلف به ترتیب در جدول زیر آورده شده و مورد بررسی قرار گرفته است.

میزان تبدیل شدن از مرحله ترکیب پیش هسته ی نر و ماده (2PN) به مرحله ۲ سلولی:

میزان لقاح و تعداد تشکیل 2PN (2pronucleus) - ترکیب پیش هسته نر و ماده که نشان دهنده لقاح موفق است) در سویه های مختلف، طبق جدول ۲ مشاهده شد.

از بین ۴ سویه موش، مقدار آمار Chi-squared برابر با

(متافاز ۲ دارای اولین جسم قطبی) بودند. همچنین، ۲/۶ درصد از CD1 در گروه غیر بالغ، ۹۷/۴ درصد در گروه MII، ۱۰/۶ درصد از Balb/C در گروه غیر بالغ، ۸۹/۴ درصد در گروه MII و ۳۲/۸ درصد از C57 در گروه غیر بالغ و ۶۷/۲ درصد در گروه MII بودند.

از بین ۴ سویه موش، مقدار آماره Chi-squared برابر با ۷۴/۲۳۵ و سطح معنی داری آن ۰/۰۰۷ بود که کمتر از ۰/۰۵ و نشان دهنده معنی دار بودن آن است. بیشترین و کمترین درصد مشاهده شده بلوغ تخمک ها که دارای جسم قطبی بودند (متافاز ۲) به ترتیب مربوط به سویه های CD1 و C57 بود و مقادیر آن ها به ترتیب برابر ۹۷/۴ و ۶۷/۲ درصد بود. تعداد کل تخمک های به دست آمده پس از تحریک تخمک گذاری در موش های CD1 در مقایسه با سایر گروه ها به طور معنی داری افزایش داشت ($p < 0.05$).

علاوه بر این، در مقایسه دوجه دو بین موش های NMRI و C57، میزان تخمک MII در NMRI بیشتر بود و بین موش های Balb/C و C57، میزان MII در Balb/C بیشتر بود و سایر سویه ها نسبت به هم تفاوت معنی داری نداشتند.

لقاح آزمایشگاهی IVF

میزان لقاح و تعداد تشکیل 2PN (2pronucleus) - ترکیب پیش هسته نر و ماده که نشان دهنده لقاح موفق است) در سویه های مختلف، طبق جدول ۲ مشاهده شد.

از بین ۴ سویه موش، مقدار آمار Chi-square برابر با

جدول ۳. آمار تجربی مقایسه دوجه دو در چهار سویه موش نسبت به یکدیگر بر اساس نرخ تبدیل شدن از مرحله 2PN به ۲ سلولی

CD1/NMRI			C57/NMRI			Balb/c /NMRI		
غیرفعال	۲ سلولی	P value	غیرفعال	۲ سلولی	P value	غیرفعال	۲ سلولی	P value
۱۶/۷	۱۶۱/۱۰۶	۱۷۷/۱۱۳	۸/۷	۲۴/۱۰۶	۳۲/۱۱۳	۲۸/۷	۵۸/۱۰۶	۸۶/۱۱۳
CD1/C57			CD1/ Balb/c			Balb/c /C57		
غیرفعال	۲ سلولی	P value	غیرفعال	۲ سلولی	P value	غیرفعال	۲ سلولی	P value
۱۶/۸	۱۶۱/۲۴	۱۷۷/۳۲	۱۶/۲۸	۱۶۱/۵۸	۱۷۷/۸۶	۲۸/۸	۵۸/۲۴	۸۶/۳۲

جدول ۴. آمار تجربی مقایسه دوجه دو در چهار سویه موش نسبت به یکدیگر بر اساس نرخ تبدیل شدن از مرحله ۲ سلولی به ۴ سلولی

CD1/NMRI			C57/NMRI			Balb /NMRI		
غیرفعال	۴ سلولی	P value	غیرفعال	۴ سلولی	P value	غیرفعال	۴ سلولی	P value
۱۴/۳۷	۱۴۷/۶۹	۱۶۱/۱۰۶	۱۰/۳۷	۱۴/۶۹	۲۴/۱۰۶	۲۶/۳۷	۳۲/۶۹	۵۸/۱۰۶
CD1/C57			CD1/ Balb			Balb /C57		
غیرفعال	۴ سلولی	P value	غیرفعال	۴ سلولی	P value	غیرفعال	۴ سلولی	P value
۱۴/۱۰	۱۴۷/۱۴	۱۶۱/۲۴	۱۴/۲۶	۱۴۷/۳۲	۱۶۱/۵۸	۲۶/۱۰	۳۲/۱۴	۵۸/۲۴

و کمترین درصد زنده ماندن جنین و تکوین به مرحله دوسلولی، به ترتیب مربوط به سویه موش NMRI و Balb/C بود که مقادیر آن‌ها به ترتیب برابر با ۹۳/۸ و ۶۷/۴ درصد بود. تکوین جنین به مرحله ۲ سلولی به طور معنی داری در NMRI نسبت به سایر سویه‌ها بیشتر بود ($p < 0.05$). البته، در مقایسه دوه‌دو بین تعداد جنین رسیده به مرحله ۲ سلولی، بین دو موش NMRI و CD1، تفاوت معنی داری میان نرخ تکوین در این مرحله وجود نداشت. در مقایسه بین سایر سویه‌ها در مرحله تکوین ۲ سلولی، بین دو موش Balb/C و CD1، میزان تشکیل و رسیدن جنین به مرحله ۲ سلولی در CD1 بیشتر بود. همچنین، بین دو موش C57 و CD1 میزان تشکیل 2PN در CD1 بیشتر بود و سایر سویه‌ها نسبت به هم، تفاوت معنی داری نداشتند.

میزان تبدیل شدن از مرحله ۲ سلولی به ۴ مرحله سلولی

با توجه به جدول ۴، در مورد تعداد تکوین رسیده به مرحله ۴ سلولی، ۳۴/۹ درصد از موش‌های NMRI در گروه غیرفعال (متوقف شده در مرحله ۲ سلولی) و ۶۵/۱ درصد در گروه فعال (رسیده به مرحله ۴ سلولی)، ۸/۷ درصد از CD1 در گروه غیر فعال و ۹۱/۳ درصد در گروه فعال، ۴۴/۸ درصد از Balb/C در گروه غیرفعال و ۵۵/۲ درصد در گروه فعال و ۴۱/۷ درصد از C57 در گروه غیر فعال و ۵۸/۳ درصد در گروه فعال بودند.

از بین ۴ سویه موش، مقدار آماره Chi-square برابر با ۴۴/۱۷۳ و سطح معنی داری آن ۰/۰۰۳ بود که کمتر از ۰/۰۵ است و نشان دهنده معنی دار بودن آن است. بیشترین

۱۰۳/۷۱۸ و سطح معنی داری آن ۰/۰۰۳ بوده که کمتر از ۰/۰۵ است و نشان دهنده معنی دار بودن آن است. بیشترین و کمترین درصد فعال ماندن و انجام لقاح موفق و تشکیل 2PN به ترتیب مربوط به سویه‌های موش CD1 و C57 است و مقادیر آن‌ها به ترتیب برابر با ۹۴/۱ و ۳۷/۲ درصد است. میزان لقاح موفق و تبدیل شدن تخمک مرحله ۲ متافاز ۲ MII به 2PN در سویه CD1 بیشتر بوده و تفاوت معنی داری با دیگر سویه‌ها مشاهده شد ($p < 0.05$). همچنین در مقایسه دوه‌دو در سایر سویه‌ها مشاهده شد که بین دو موش NMRI و C57 میزان تشکیل 2PN در NMRI بیشتر است. همچنین بین دو موش C57 و Balb/C میزان تشکیل 2PN در Balb/C بیشتر است و بین NMRI و Balb/C، از این لحاظ، تفاوت معنی داری وجود ندارد.

تکوین جنین در آزمایشگاه IVD

درصد تشکیل جنین به ترتیب در مراحل ۲، ۴ و ۸ سلولی و سپس مرحله بلاستوسیست در نمونه‌های مختلف، به ترتیب در جدول‌های ۳ تا ۶ زیر آورده شده و مورد بررسی قرار گرفته است.

میزان تبدیل شدن از مرحله (2PN) ترکیب پیش هسته نر و ماده به مرحله ۲ سلولی

میزان تکوین جنین از مرحله 2PN به مرحله ۲ سلولی در نمونه‌های مختلف، طبق جدول ۳ مشاهده شد. از بین ۴ سویه موش، مقدار آماره Chi-square برابر با ۳۶/۰۹۱ و سطح معنی داری آن ۰/۰۰۵ بود که کمتر از ۰/۰۵ است و نشان دهنده معنی دار بودن آن است. بیشترین

جدول ۵. آمار تجربی مقایسه دوه‌دو در چهار سویه موش نسبت به یکدیگر بر اساس نرخ تبدیل شدن از مرحله ۴ سلولی به ۸ سلولی

CD1/NMRI			C57/NMRI			Balb/NMRI		
غیرفعال	کل	P value	غیرفعال	کل	P value	غیرفعال	کل	P value
۳۴/۳۵	۱۱۳/۳۴	۰/۰۰۱ ***	۵/۳۵	۹/۳۴	۰/۳۰۵	۱۱/۳۵	۲۱/۳۴	۰/۱۲۵
CD1/C57			CD1/Balb			Balb/C57		
غیرفعال	کل	P value	غیرفعال	کل	P value	غیرفعال	کل	P value
۳۴/۵	۱۱۳/۹	۰/۲۹۴	۳۴/۱۱	۱۱۳/۲۱	۰/۱۸۴	۱۱/۵	۲۱/۹	۰/۹۳

جدول ۶. آمار تجربی مقایسه دوه‌دو در چهار سویه موش نسبت به یکدیگر بر اساس نرخ تبدیل شدن از ۸ سلولی به بلاستوسیست

CD1/NMRI			C57/NMRI			BALBc/NMRI		
غیرفعال	کل	P value	غیرفعال	کل	P value	غیرفعال	کل	P value
۳۸/۱۱	۷۵/۲۳	۰/۸۹	۵/۱۱	۴/۲۳	۰/۲	۹/۱۱	۱۲/۲۳	۰/۴۳۱
CD1/C57			CD1/BALBc			BALBc/C57		
غیرفعال	کل	P value	غیرفعال	کل	P value	غیرفعال	کل	P value
۳۸/۵	۷۵/۴	۰/۱۸۵	۳۸/۹	۷۵/۱۲	۰/۴۱۶	۹/۵	۱۲/۴	۰/۵۲۳

از بین ۴ سویه موش، مقدار آماره Chi-square برابر با ۲/۳۹۴ و سطح معنی داری آن ۰/۴۹۵ بود که بیشتر از ۰/۰۵ است؛ بنابراین تفاوت معنی داری میان چهار سویه موش در زنده و فعال ماندن در رسیدن به مرحله بلاستوسیست وجود نداشت. بیشترین و کمترین درصد فعال ماندن و تکوین به بلاستوسیست به ترتیب مربوط به موش های نوع NMRI و C57 بود که مقادیر آن ها به ترتیب برابر با ۶۷/۶ و ۴۴/۴ درصد بود. البته، در میزان تکوین جنین ۸ سلولی به بلاستوسیست، بین دو موش NMRI و CD1، تفاوت معنی داری دیده نشد. همچنین، در مقایسه بین سایر سویه ها نسبت به یکدیگر در مرحله تکوین به مرحله بلاستوسیست، تفاوت معنی داری وجود نداشت.

نرخ تبدیل شدن از مرحله گرفتن تخمک تا رسیدن به مرحله بلاستوسیست بین چهار سویه موش مختلف

با توجه به جدول ۷، ۸۵/۶ درصد از جنین های سویه NMRI در گروه غیر فعال (عدم موفقیت در تکوین جنین از زمان لقاح تا مرحله بلاستوسیست) و ۱۴/۴ درصد در گروه فعال (موفق در تکوین از زمان لقاح تا مرحله بلاستوسیست) بودند. همچنین، ۶۱/۱ درصد از سویه CD1 در گروه غیر فعال و ۳۸/۹ درصد در گروه فعال بودند. ۹۰/۹ درصد از Balb/C در گروه غیر فعال، ۹/۱ درصد در گروه فعال و ۹۶/۹ درصد از C57 در گروه غیر فعال و ۳/۱ درصد در گروه فعال بودند.

از بین ۴ سویه موش، مقدار آماره Chi-square برابر با ۸۲/۳۵۰ و سطح معنی داری آن ۰/۰۰۱ بود که کمتر از ۰/۰۵ و نشان دهنده معنی دار بودن آن است. بیشترین کمترین درصد فعال ماندن (تکوین به مرحله بلاستوسیست)، به ترتیب مربوط به سویه CD1 و C57 و مقادیر آن ها به ترتیب برابر با ۳۸/۹ و ۳/۱ درصد بود. سویه CD1، نسبت به سه گروه دیگر، در مراحل آزمایش از گرفتن تخمک تا رسیدن به مرحله ۸ سلولی با دیگر سویه ها تفاوت معنی داری داشت ($p < 0.05$). در مقایسه دوه دو، میزان تبدیل شدن از مرحله گرفتن تخمک تا رسیدن به مرحله بلاستوسیست بین دو موش NMRI و CD1 تفاوت معنی داری وجود داشت و میزان فعال ماندن و تکوین جنین در سویه CD1 بیشتر بود. همچنین در مقایسه بین دو موش NMRI و C57، میزان فعال ماندن NMRI بیشتر بود. در مقایسه بین دو موش Balb/C و C57 در میزان تخمک مرحله MII، لقاح و تکوین به مرحله بلاستوسیست، میزان فعال ماندن Balb/C بیشتر بود.

و کمترین درصد فعال ماندن و رسیدن به مرحله ۴ سلولی به ترتیب مربوط به سویه های CD1 و Balb/C بود که مقادیر آن ها به ترتیب برابر با ۹۱/۳ و ۵۵/۲ درصد بود. تعداد جنین هایی که به مرحله ۴ سلولی رسیدند، در موش های CD1 نسبت به دیگر گروه ها مقایسه شد و به طور معنی داری افزایش داشت ($p < 0.05$). در مقایسه بین سایر سویه ها، در میزان تکوین جنین به مرحله ۴ سلولی، تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

میزان تبدیل شدن از مرحله ۴ سلولی به مرحله ۸ سلولی

با توجه به جدول ۵، در مورد تعداد تکوین جنین از مرحله ۴ سلولی به مرحله ۸ سلولی، ۵۰/۷ درصد از جنین های موش NMRI در گروه غیر فعال (متوقف شده در مرحله ۴ سلولی) و ۴۹/۳ درصد در گروه فعال (رسیده به تکوین ۸ سلولی)، ۲۳/۱ درصد از CD1 در گروه غیر فعال و ۷۶/۹ درصد در گروه فعال، ۳۴/۴ درصد از Balb/C در گروه غیر فعال و ۶۵/۶ درصد در گروه فعال و ۳۵/۷ درصد از C57 در گروه غیر فعال و ۶۴/۳ درصد در گروه فعال بودند.

از بین ۴ سویه موش، مقدار آماره Chi-square برابر با ۱۶/۴۶۳ و سطح معنی داری آن ۰/۰۰۱ بود که کمتر از ۰/۰۵ و نشان دهنده معنی دار بودن آن است. بیشترین و کمترین درصد فعال ماندن و رسیدن به مرحله ۸ سلولی به ترتیب مربوط به سویه های موش CD1 و NMRI و مقادیر آن ها به ترتیب برابر با ۷۶/۹ و ۴۹/۳ درصد بود. درصد تعداد جنین های مرحله ۸ سلولی در موش های CD1 نسبت به دیگر گروه ها به طور معنی داری افزایش نشان داد ($p < 0.05$). در مقایسه بین سایر سویه ها در میزان تکوین جنین به مرحله ۸ سلولی، تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

میزان تبدیل شدن از مرحله ۸ سلولی به مرحله بلاستوسیست

با توجه به جدول ۶، در مورد تعداد تکوین جنین از مرحله ۸ سلولی به مرحله بلاستوسیست، ۳۲/۴ درصد از جنین های موش NMRI در گروه غیر فعال (متوقف در مرحله ۸ سلولی) و ۶۷/۶ درصد در گروه فعال (تکوین تا مرحله بلاستوسیست)، ۳۳/۶ درصد از CD1 در گروه غیر فعال و ۶۶/۴ درصد در گروه فعال، ۴۲/۹ درصد از Balb/C در گروه غیر فعال و ۵۷/۱ درصد در گروه فعال و ۵۵/۶ درصد از C57 در گروه غیر فعال و ۴۴/۴ درصد در گروه فعال بودند.

جدول ۷. آمار تجربی چهار سویه موش بر اساس نرخ تبدیل شدن از مرحله دریافت تخمک تا بلاستوسیست

کل	C57	Balb/C	CD1	NMRI	
۴۹۹	۱۲۴	۱۲۰	۱۱۸	۱۳۷	غیرفعال
۸۱/۴ درصد	۹۶/۹ درصد	۹۰/۹ درصد	۶۱/۱ درصد	۸۵/۶ درصد	
۱۱۴	۴	۱۲	۷۵	۲۳	بلاستوسیست
۱۸/۶ درصد	۳/۱ درصد	۹/۱ درصد	۳۸/۹ درصد	۱۴/۴ درصد	
۶۱۳	۱۲۸	۱۳۲	۱۹۳	۱۶۰	کل
۱۰۰ درصد					

تحریک تخمک‌گذاری در سویه‌های مختلف درون‌زاد متفاوت است (۴، ۶). گزارش‌ها نشان می‌دهند که فاصله G (فاصله تزریق هورمون‌های گونادوتروپین PMSG و hCG) بهینه برای بلوغ کامل تخمک و تحریک تخمک‌گذاری متعاقب آن در موش‌ها ۴۰ تا ۵۰ ساعت است (۶، ۳۱). نتایج ضعیف‌تر در سویه C57 و همچنین Balb/C نشان می‌دهند که باید فاصله G مناسب‌تری تعیین شود. اثرات فیزیولوژیک LH بر بلوغ تخمک و اثرات آن در ازسرگیری میوز، پیش از این معرفی شده‌اند (۳۲). پاسخ‌های متفاوت در تعداد تخمک‌ها در بین سویه‌های مختلف، پس از تحریک هورمونی، ممکن است به دلیل اثرات فیزیولوژیکی مقادیر مختلف گنادوتروپین‌های در گردش خون مانند LH باشد که در پاسخ به هورمون Pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) در سویه‌های مختلف، متفاوت عمل می‌کند. همچنین ممکن است لازم باشد چرخهٔ فعلی در موش‌های با سویه‌های مختلف مورد توجه قرار گیرد. نتایج این تحقیق بر روی سویه‌های مختلف نشان می‌دهند که بالاترین میزان تشکیل 2PN در موش‌های CD1 مشاهده شده و نشان می‌دهد که در شرایط آزمایشگاهی یکسان، به نظر می‌رسد که این سویه موش مناسب‌تری برای مطالعات لقاح آزمایشگاهی است؛ اما ممکن است در شرایط آزمایشگاهی متفاوت، به طور مثال تغییر در محیط کشت، نرخ لقاح در بین سویه‌های مختلف تغییر کند. در مورد میزان زنده‌ماندن جنین در شرایط کشت آزمایشگاهی، بین مراحل مختلف کشت از مرحلهٔ ۲ سلولی تا بلاستوسیست، موش‌های مختلف مشاهدات متفاوتی نشان دادند. در مورد میزان تکوین تا مرحلهٔ ۲ سلولی جنین‌های NMRI و CD1 بیشترین تعداد زنده‌ماندن را نشان دادند و این موضوع نشان داد که در شرایط یکسان موش‌های برون‌زاد تا مرحلهٔ ۲ سلولی بهتر عمل کرده و بین دو موش برون‌زاد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اما در مورد تکوین تا مرحلهٔ ۴ سلولی و ۸ سلولی و میزان زنده‌ماندن جنین، موش CD1 بهترین و کارآمدترین جنین را داشته و

نتایج به‌دست‌آمده از نرخ تبدیل‌شدن در مراحل مختلف بین ۴ سویهٔ مختلف موش

از بین ۴ سویه موش، مقدار آماره Chi-square برابر با ۲۷۳/۸۸۶ و سطح معنی‌داری آن ۰/۰۰۲ بود که کمتر از ۰/۰۵ و نشان‌دهندهٔ معنی‌دار بودن آن است. به ترتیب، بیشترین تا کمترین درصد فعال ماندن و تکوین، مربوط به موش‌های CD1، NMRI، Balb/C و C57 بود که مقادیر آن‌ها به ترتیب برابر با ۳۸/۹، ۱۴/۴، ۹/۱ و ۳/۱ درصد بود و بیشترین میزان در سویهٔ CD1 دیده شد ($p < 0.05$).

بحث

در این تحقیق، اثر یک پروتکل یکسان تحریک تخمک‌گذاری متعارف (۲۹) (۴۸ G-interval یا تزریق گونادوتروپین‌ها با فاصلهٔ ۴۸ ساعت) بر تحریک تخمک‌گذاری چهار سویهٔ موش برون‌زاد NMRI و CD1 و همچنین درون‌زاد Balb/C و C57، مورد ارزیابی قرار گرفت. این مقایسه نشان داد که تحریک تخمک‌گذاری با پروتکل یکسان، نتایج متفاوتی از خود نشان می‌دهد و میزان تخمک‌گذاری به دنبال تحریک هورمونی به‌طور معنی‌داری در موش C57 در مقایسه با سه سویهٔ دیگر موش‌ها پایین‌تر بود. همچنین، تعداد تخمک گرفته‌شده در سویهٔ Balb/C نیز به‌طور معنی‌داری نسبت به دو سویهٔ NMRI و CD1 پایین‌تر بود و این مشاهدات، عدم کارآمدی پروتکل متعارف (از لحاظ نوع و دوز و فاصلهٔ تزریق هورمون) را در تحقیقات تولید مثلی مربوط به این دو سویه نشان می‌دهند.

گزارشات اندکی در مورد تعیین سویهٔ مناسب موش آزمایشگاهی برای تحریک تخمک‌گذاری، لقاح آزمایشگاهی و کشت جنین وجود دارد (۱۴، ۱۵، ۳۰). جمع‌آوری تعداد زیادی تخمک MII (متافاز ۲) یا جنین پیش از لانه‌گزینی، برای تکنیک‌های کمک‌باروری و تحقیقات تولید مثل، ضروری است (۱۲). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پاسخ به تیمار

مشاهدات و در صورت اجرای دستورالعمل مشابه و معمولی که در اکثر آزمایشگاه های تحقیقاتی تولید مثل انجام می شود، سویه مناسب برای تحقیقات کمک باروری در آزمایشگاه، سویه CD1 است.

با در نظر گرفتن نتایج تحریک تخمک گذاری و لقاح آزمایشگاهی در چهار نمونه درون زاد و برون زاد، نتیجه می گیریم که در تکنیک های کمک باروری، بهینه سازی تحریک تخمک گذاری، لقاح و کشت در مراحل مختلف جنینی برای هر سویه مهم است و در صورت استفاده از یک دستورالعمل یکسان، امکان نتیجه گیری مناسب و بهینه برای برخی سویه ها امکان پذیر نبوده و نیاز به استفاده بیشتری از حیوان آزمایشگاهی خواهد بود. احتمال می رود که در صورت نیاز به استفاده از سویه های C57 یا Balb/C، یک پروتکل کمک باروری که فاصله تزریق ۴۴-۵۰ G ساعته را مورد ارزیابی قرار داده و استفاده از محیط های کشت متفاوت در حین لقاح و محیط های کشت دیگری برای تکوین جنین، بتواند تولید رویان در شرایط آزمایشگاهی را بهبود بخشیده و امکان گرفتن نتیجه دلخواه با استفاده از حداقل تعداد حیوان آزمایشگاهی را فراهم کند.

به طور معنی داری از سایر گروه ها موفق تر بود. البته، میزان زنده ماندن جنین از ۸ سلولی به بلاستوسیست در بین سویه های مختلف تفاوت معنی داری نشان نداد. این موضوع نشان داد که نرخ زنده ماندن و تکوین در مراحل مختلف، نتایج متفاوتی دارد. در شرایط آزمایشگاهی، متناسب با مرحله جنینی مورد نیاز در تحقیقات، ضروری است که سویه مناسب برای نتیجه کارآمدتر و بهینه انتخاب شود تا میزان نیاز به حیوانات، همزمان با نتیجه بهتر، کاهش یابد. در این مطالعه نشان داده شد که علی رغم باور بر نتایج بهتر موش های درون زاد، در مطالعات تولید مثل در صورت نیاز به مرحله لقاح و تکوین تا مرحله ۸ سلولی، بهترین موش در این مطالعه، موش برون زاد CD1 بوده که در شرایط معمول آزمایشگاهی بیشترین نرخ لقاح و زنده ماندن جنین را نشان داد. البته، در صورت نیاز به جنین ۸ سلولی و مطالعه و دست ورزی بر روی جنین ۸ سلولی و تکوین به مرحله بلاستوسیست، بین موش های برون زاد و درون زاد تفاوتی مشاهده نشد. همچنین، ترتیب موش ها از لحاظ نرخ زنده ماندن در شرایط یکسان آزمایشگاه، از بیشترین به کمترین، به صورت CD1، NMRI، Balb/C و C57 است. این نکته نشان می دهد که با توجه به

REFERENCES

1. Kupka MS, Ferraretti AP, De Mouzon J, Erb K, D'Hooghe T, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2014;29:2099-113.
2. Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod* 2003;69:1109-17.
3. Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update* 2016;22:2-22.
4. Byers SL, Payson SJ, Taft RA. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology* 2006;65:1716-26.
5. Gates AH, Bozarth JL. Ovulation in the PMSG-treated immature mouse: effect of dose, age, weight, puberty, season and strain (BALB/c, 129 and C129F1 hybrid). *Biol Reprod* 1978;18:497-505.
6. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R, Editors. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. New York: Press Cold Spring Harbor: 2003.
7. Wilson ED, Zarrow M. Comparison of superovulation in the immature mouse and rat. *Reproduction* 1962;3:148-58.
8. Zarrow M, LEE CALDWELL A, Hafez E, Pincus G. Superovulation in the immature rat as a possible assay for LH and HCG. *Endocrinology* 1958;63:748-58.
9. Ozgunen K, Erdogan S, Mazmanoglu N, Pamuk I, Logoglu G, Ozgunen T. Effect of gonadotrophin dose on oocyte retrieval in superovulated BALB/c mice. *Theriogenology* 2001;56:435-45.
10. Spearow JL, Barkley M. Genetic control of hormone-induced ovulation rate in mice. *Biol Reprod* 1999;61:851-6.
11. Hashlamoun L, Killian G. Effects of timing of ovum recovery, cumulus cells, sperm pre incubation time, and pH on in vitro fertilization in C57BL/6 mice. *Arch Androl* 1985;15:159-71.
12. Martin-Coello J, Gonzalez R, Crespo C, Gomendio M, Roldan E. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). *Theriogenology* 2008;70:1004-13.
13. Kameyama Y, Arai K, Ishijima Y. Interval between PMSG priming and hCG injection in superovulation of the mongolian Gerbil. *J Mamm Ova Res* 2004;21:105-9.

14. Wu H, Chou C, Lin C-S, Huang M. Effects of glucose concentration on in vitro fertilization in BALB/c mice. *Reprod Domest Anim* 2003;38:470-4.
15. Kito S, Ohta Y. In vitro fertilization in inbred BALB/c mice I: isotonic osmolarity and increased calcium-enhanced sperm penetration through the zona pellucida and male pronuclear formation. *Zygote* 2008;16:249.
16. Uranga J, Arechaga J. Comparative analysis of in vitro development of outbred mouse embryos cultured in Krebs-Ringer or tyrode-derived media. *Reprod Nutr Dev* 1997;37:41-9.
17. Nakazawa T, Ohashi K, Yamada M, Shinoda S, Saji F, Murata Y, et al. Effect of different concentrations of amino acids in human serum and follicular fluid on the development of one-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1997;111:327-32.
18. Golkar-Narenji A, Gourabi H, Eimani H, Barekati Z, Akhlaghi A. Superovulation, in vitro fertilization (IVF) and in vitro development (IVD) protocols for inbred BALB/cJ mice in comparison with outbred NMRI mice. *Reprod Med Biol* 2012;11:185-92.
19. Tuttle AH, Philip VM, Chesler EJ, Mogil JS. Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nat Methods* 2018;15:994-6.
20. Jensen VS, Porsgaard T, Lykkesfeldt J, Hvid H. Rodent model choice has major impact on variability of standard preclinical readouts associated with diabetes and obesity research. *Am J Transl Res* 2016;8:3574.
21. Dekel Y, Glucksam Y, Margalit R. Novel fibrillar insulin formulations for oral administration: Formulation and in vivo studies in diabetic mice. *J Control Release* 2010;143:128-35.
22. Chia R, Achilli F, Festing MF, Fisher EM. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat genet* 2005;37:1181-6.
23. Johnson M. Laboratory mice and rats. *Mater Methods* 2012;2: 113.
24. Kabayama H, Takeuchi M, Tokushige N, Muramatsu S-i, Kabayama M, Fukuda M, et al. An ultra-stable cytoplasmic antibody engineered for in vivo applications. *Nat Commun* 2020;11:1-20.
25. Lu Y, Brommer B, Tian X, Krishnan A, Meer M, Wang C, et al. Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature* 2020;588:124-9.
26. Luther A, Urfer M, Zahn M, Müller M, Wang S-Y, Mondal M, et al. Chimeric peptidomimetic antibiotics against Gram-negative bacteria. *Nature* 2019;576:452-8.
27. Labonté B, Abdallah K, Maussion G, Yerko V, Yang J, Bittar T, et al. Regulation of impulsive and aggressive behaviours by a novel lncRNA. *Mol Psychiatry* 2020:1-14.
28. Patzke C, Brockmann MM, Dai J, Gan KJ, Grauel MK, Fenske P, et al. Neuromodulator signaling bidirectionally controls vesicle numbers in human synapses. *Cell* 2019;179:498-513.
29. Kidder BL. In vitro maturation and in vitro fertilization of mouse oocytes and preimplantation embryo culture. *Methods Mol Biol* 2014;1150:191-9.
30. Kito S, Hayao T, Noguchi-Kawasaki Y, Ohta Y, Hideki U, Tateno S. Improved in vitro fertilization and development by use of modified human tubal fluid and applicability of pronucleate embryos for cryopreservation by rapid freezing in inbred mice. *Comp Med* 2004;54:564-70.
31. Khalili MA, Anvari M. The effect of in vitro culture on cleavage rates and morphology of the in vivo-developed embryos in mice. *IJRM* 2007; 5: 17-22.
32. Sapienza C, Peterson AC, Rossant J, Balling R. Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete of origin. *Nature* 1987;328:251-4.