

مقایسه تکوین جنینهای موش در هم‌کشتی با سلولهای اپیتلیال نواحی آمپولا و ایستموس اویداکت هامستر و تأثیر عملکرد گنادوتروپین‌های تزریقی بر کیفیت اثر هم‌کشتی

حسین بهاروند M.Sc*، مجتبی رضازاده Ph.D**، محمد تقی الطریحی Ph.D***

* جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران - پژوهشکده رویان

** دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده علوم پزشکی - گروه علوم تشریحی

*** دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده علوم پزشکی - گروه علوم تشریحی

آدرس مکاتبه: تهران - صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵ - پژوهشکده رویان

چکیده

هدف: بررسی تأثیر سلولهای اپیتلیال نواحی مختلف اویداکت هامستر بر تکوین جنینهای موش نژاد N-MARY طی چهار روز هم‌کشتی و تأثیر عملکرد گنادوتروپینهای تزریقی بر کیفیت اثر هم‌کشتی

نوع مطالعه: تجربی

مواد و روشها: اویداکت هامسترها، ۲۴-۱۸ ساعت پس از تزریق HMG/HCG جدا شده و با محیط ۱۰% DMEM/Ham's F-12 + FCS فلاش شدند. براساس مشاهده توده کومولوس، اویداکتها به دو دسته تقسیم شدند. دسته ۱: اویداکتهایی که نسبت به گنادوتروپینها پاسخ نداده و به عبارتی فاقد توده کومولوس بودند. دسته ۲: اویداکتهایی که نسبت به گنادوتروپینها پاسخ داده و دارای کومولوس بودند. پس از تفکیک نواحی آمپولا و ایستموس اویداکتها، با استفاده از آنزیم کلاژناز، سلولهای اپیتلیالی جدا و در زیر میکروسکوپ اینورت انتخاب شده و کشت داده شدند. جنینهای دو سلولی موش در محیط ۱۰% T6+FCS روی تک لایه‌های سلولی آمپولا (A)، ایستموس (I) و گروه کنترل (C) کشت داده شدند و تکوین آنها طی ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. تعداد بلاستومر ۵۷ بلاستوسیت متعلق به همه گروههای آزمایشی و کنترل شمارش گردید.

یافته‌ها: دسته ۱: پس از ۹۶ ساعت، تعداد بیشتری از جنینها در گروههای هم‌کشتی از زونا پلوسیدا خارج شدند (Hatch) (A= ۶۴%، P<0.001، I= ۵۰%، P<0.05، C= ۳۶%).

علاوه بر این در ۲۴ ساعت اول کشت، تکوین جنینها در هم‌کشتی آمپولا بهتر از ایستموس بود (P<0.001). شمارش بلاستومرها نشان داد که تعداد بلاستومرها پس از ۹۶ ساعت در گروههای هم‌کشتی و بخصوص در گروه آمپولا، بیشتر از گروه کنترل است (P<0.001 برای A و P<0.05 برای I). دسته ۲: پس از ۹۶ ساعت، تعداد بیشتری از جنینها در گروه کنترل نسبت به گروههای هم‌کشتی به مرحله بلاستوسیت رسیدند (A= ۲۰%، I= ۲۷%، C= ۵۸% و P<0.001 نسبت به A و I).

نتیجه‌گیری: هم‌کشتی سلولهای اپیتلیال اویداکت هامستر و به خصوص سلولهای مشتق از ناحیه آمپولا، برای تکوین جنینهای موش در محیط آزمایشگاه مفید است و این تأثیر، تحت نفوذ وضعیت پاسخ هامسترها نسبت به گنادوتروپین‌های تزریقی است.

کل واژگان: هم‌کشتی، اویداکت هامستر، جنین موش، گنادوتروپین‌ها.

نمایانگر انجام عمل جفت‌گیری است. صبح روز بعد موشهای ماده پلاک مثبت، جدا شده و ۵۰-۴۸ ساعت پس از تزریق HCG موش به روش قطع نخاع (Cervical dislocation) کشته و اویداکت آنها جدا شد. سپس با فلاشینگ (Flushing) اویداکتها با محیط T6 حاوی ۱۰% FCS (سرم جنین گاوی، Gibco) جنینهای دو سلولی خارج شدند. تمام جنینهای حاصله با هم مخلوط شده و در گروه‌های مختلف کشت، بصورت تصادفی و تقریباً با تعداد مساوی پخش شدند.

* تهیه و کشت سلولهای اپیتلیال اویداکت هامستر

به منظور تهیه سلولهای اپیتلیالی اویداکت هامستر، به هر هامستر ماده نژاد Syrian با سن ۱۶-۱۲ هفته، بین ساعت‌های ۱۸-۱۶، ۱۵IU HMG (Serenio) تزریق شد. پس از ۲۴-۱۸ ساعت، هامسترها به روش قطع نخاع کشته شده و اویداکت آنها جدا شد. با فلاشینگ اویداکتها توسط محیط DMEM/Ham's F-10 (Sigma) حاوی ۱۰% FCS، کومولوس خارج شد. اویداکت‌هایی که دارای کومولوس بودند و به عبارت دیگر جانور به خوبی نسبت به هورمون پاسخ داده بود، از اویداکت‌هایی که فاقد کومولوس بودند و به عبارتی جانور نسبت به هورمون پاسخ نداده بود، تفکیک شده و هر کدام به طور جداگانه به روش ذیل کشت داده شد. در ابتدا نواحی آمپولا و ایستوس اویداکتها جدا شده و سپس هر ناحیه به طور جداگانه در آنزیم کلاژناز II (Sigma) ۰.۲۵٪، به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه و در شرایط ۳۷°C و ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. سپس با پیست کردن بافتها، سوسپانسیونهای سلولی تهیه شد. قابل ذکر است که باید از پیست کردن‌های متعدد اجتناب کرد زیرا باعث جدا شدن سلولهای اپیتلیالی از یکدیگر شده و غشاء پایه (basement membrane) آنها از بین می‌رود و کشت آنها را دچار مشکل می‌نماید. سوسپانسیون‌ها با محیط DMEM/Ham's F-12 حاوی ۱۰% FCS سانتریفوژ شدند (۳ دقیقه، ۵۰۰ rpm) و پلت (Pellet) حاصل با ۳ml از محیط قبلی، مخلوط شده و سوسپانسیون حاصله را در پتری ریخته و روی آن با روغن پارافین (Merk) پوشانده شد.

ورقه‌های سلولهای اپیتلیالی در زیر میکروسکوپ اینورت (invert) انتخاب شده و با کمک پیست از سطح پتری جدا شدند. این ورقه‌ها دارای مژه بوده و شکل سلولهای آن استوانه‌ای است. قابل توجه است که اغلب این ورقه‌ها بصورت وزیکول در می‌آیند، به طوریکه مژه‌های سلولهای آنها در خارج و غشاء پایه در سمت داخل قرار می‌گیرد (شکل ۱). ورقه‌ها و وزیکولهای جدا شده دوباره شسته شده (۳ دقیقه، ۱۵۰۰ rpm) و بصورت قطره‌های ۴۰-۲۰ μl در پتری و زیر روغن کشت داده شدند. کشتها در دمای ۳۷°C، ۵٪ CO₂ و شرایط مرطوب انکوبه شدند. بعد از چسبیدن اغلب وزیکولها و ورقه‌ها به کف پتری، محیط کشت تعویض شد. برای چسبیدن سلولهای اپیتلیالی به کف ظرف، باید از حرکت دادن ظرف طی ۵-۴ روز اول کشت خودداری نمود. ۲-۳

1. Human Menopausal Gonadotropin, Sereno
2. Human Chorionic Gonadotropin, Organon

مقدمه

از زمان انجام باروری آزمایشگاهی (IVF) در خرگوش در سال ۱۹۵۹ (۱) تا به امروز پیشرفتهای زیادی در روش IVF حاصل شده، با این حال میزان باروری حاصل از این روش پایین است. میزان پایین باروری به شرایط نامطلوب کشت و کیفیت پایین جنین برمی‌گردد؛ به طوری که تکوین (development) جنینها در محیط کشت (culture medium) به تأخیر می‌افتد (۲، ۳) و حتی در بعضی نژادها یا گونه‌ها، تکوین جنین در مرحله خاصی از تسهیم (cleavage) در محیط آزمایشگاهی متوقف می‌شود (۴). گذشته از این، توان زیستی (viability) جنینها کاهش می‌یابد (۵). بنابراین به منظور اجتناب از بروز چنین مشکلاتی، باید هرچه سریعتر جنین به مادر منتقل شود. به طور مثال جنین انسان در مرحله ۴ تا ۸ سلولی به رحم مادر منتقل می‌شود، اما بدنبال این انتقال، میزان لانه‌گزینی (implantation) جنینها بدلیل ناهماهنگی (asynchrony) بر هم کنش‌های (interactions) رحم و تروفواکتودرم کاهش می‌یابد (۶).

به منظور غلبه بر چنین مسائلی، سیستمهای مختلف کشت جنین طراحی شده‌است تا جنین برای مدت بیشتری (تا تشکیل بلاستوسیست) در محیط آزمایشگاهی تکوین یابد و بعد به مادر منتقل شود. در این سیستمها از اصلاح محیطهای کشت (۹، ۷)، کاهش درصد اکسیژن در زمان کشت (۱۰)، استفاده از محیطهای کشت متوالی (sequential media) (۱۱) و سیستمهای هم‌کشتی (co-culture) استفاده می‌شود.

در سیستمهای هم‌کشتی، جنین را همراه با سلولهای سوماتیک مختلفی نظیر دودمانهای سلولی (vero cell lines)، سلولهای اپیتلیال کلیه میمون سبز افریقای (۱۳، ۱۲)، MDBK سلولهای کلیه گاو (۱۵، ۱۴) و یا سلولهای گرانولوزا (۱۶)، رحم (۱۷) و یا اویداکت (۱۹، ۱۸) کشت می‌دهند. در هر حال تأثیر این سلولها بر جنین مفید گزارش شده است.

Powell و Rexroad نیز با هم‌کشتی جنینهای گوسفند در تک‌لایه‌های (monolayers) سلولی اویداکت، رحم و کلیه، رشد بهتری از جنینها را بخصوص در هم‌کشتی با سلولهای اویداکتی گزارش کرده‌اند (۲۰).

در این مطالعه، با تقلید از محیط *in vivo* و با استفاده از سلولهای اپیتلیال نواحی آمپولا و ایستوس اویداکت هامسترهای متأثر از گنادوتروپینها، هم‌کشتی آنها با جنینهای دو سلولی موش مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

* تهیه جنینهای دو سلولی موش

به هر موش ماده نژاد N-MARY با سن ۱۰-۸ هفته، ۵IU HCG هورمون HMG^۱، بین ساعت‌های ۱۸-۱۵ تزریق شد. پس از ۵۰-۴۸ ساعت، به هر کدام از آن موشها ۵IU HCG هورمون^۲ تزریق و هر موش ماده با یک موش نر در یک قفس گذاشته شد. پلاک واژنی



شدند. این دترجنت (detergent) احتمالاً با حذف سیتوپلاسم بلاستومرها سبب شفافتر شدن رنگ فلوروسنس می‌شود. در انتها جنینها با شستشوی مجدد با PBS، روی اسلاید حاوی اندکی گلیسرول قرار گرفته و با نور ماوراءبنفش در زیر میکروسکوپ فلوروسنس مشاهده شدند.

آزمایش ۱-

*** هم‌کشتی جنینهای دو سلولی موش با سلولهای اپیتلیال نواحی آمپولا و ایستموس اویداکت هامستر**
وقتی سلولهای اپیتلیال آمپولا و ایستموس حداقل ۶۰٪ کف قطره حاوی محیط کشت را پوشاندند، محیط ۱۰٪ T6+FCS جایگزین محیط DMEM/Ham's F-12 حاوی ۱۰٪ FCS شده و پس از ۲۴ ساعت هم‌کشتی جنینهای دو سلولی موش در شرایط مرطوب، ۵٪ CO₂ و دمای ۳۷°C انجام گرفت. گفته می‌شود که هم‌کشتی در ریز قطره‌ها بهتر از هم‌کشتی در محیطهای بزرگ است (۲۲). گروه کنترل تنها دارای ۱۰٪ T6+FCS بود که مانند گروه‌های هم‌کشتی در حجم ۲۰-۴۰ میکرولیتر و در زیر پارافین مایع تهیه شد. این گروه نیز ۲۴ ساعت قبل از کشت جنین تحت همان شرایط انکوبه شد. پس از کشت جنین در هر سه گروه آمپولا، ایستموس و کنترل، میزان تکوین جنینها هر ۲۴ ساعت یادداشت شد و ۹۶ ساعت پس از شروع کشت، تعداد بلاستومر بلاستوسیت‌های هر گروه شمارش شد.

آزمایش ۲-

* تأثیر هم‌کشتی اویداکت‌های فاقد کومولوس

سلولهای اپیتلیال نواحی آمپولا و ایستموس اویداکت‌هایی که نسبت به گنادوتروپین‌های HMG/HCG پاسخ نداده بودند، به طور جداگانه کشت شده و مانند آزمایش اول در هم‌کشتی، مورد استفاده قرار گرفتند.

* آنالیز آماری:

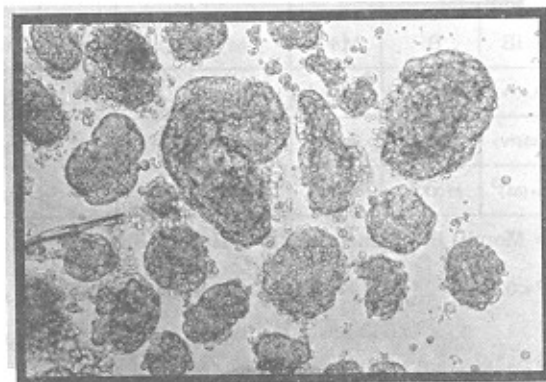
نتایج حاصل از تأثیر هم‌کشتیها بر تکوین جنینها نسبت به گروه کنترل در روزهای مختلف و مقایسه تکوین جنینها در هم‌کشتیهای آمپولا و ایستموس، به روش آزمون مربع کای بررسی شد. مقایسه میانگین شمارش بلاستومرها در هر گروه نیز پس از نرمال بودن داده‌ها با روش kolmogorov-Smirnov توسط آنالیز واریانس یکطرفه انجام شد. همگن بودن واریانس‌ها و مقایسه دو به دو مجموعه میانگین‌ها و انحراف معیارها به ترتیب به روشهای Bartlett و Tukey انجام شد.

یافته‌ها:

آزمایش ۱-

میزان تکوین جنینها در سه گروه کشت آمپولا، ایستموس و کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. درصد مورولاها پس از ۲۴ ساعت و میزان جنینهایی که پس از ۴۸ ساعت به مورولا یا بلاستوسیت رسیده‌اند به طور معنی‌داری در گروه‌های هم‌کشتی از کنترل بیشتر بود.

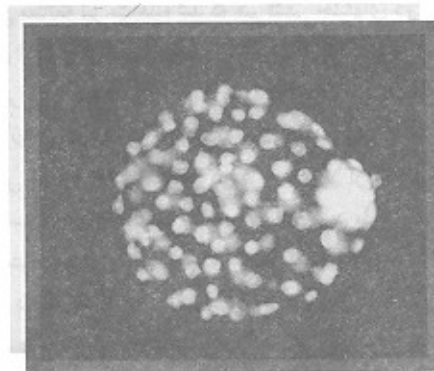
هفته بعد از آغاز کشت، ظرف کشت زیر ۷۰-۶۰ کف قطره بصورت تک لایه‌ای از سلولها پوشیده شده و آماده استفاده برای هم‌کشتی بود.



شکل ۱: وزیکولهای سلولهای اپیتلیالی اویداکت هامستر

* شمارش بلاستومرها

به منظور بررسی میزان تهیم، ۹۶ ساعت پس از آغاز کشت جنینها در محیط آزمایشگاهی، شمارش بلاستومرها انجام شد. تعداد بلاستوسیتها به روش Ebert و همکارانش شمارش شد (۲۱)؛ با این تفاوت که به جای رنگ Hoechst 33242 از رنگ Ethidium bromide استفاده شد. این رنگها بصورت intercalate بین دو رشته DNA قرار می‌گیرند و هنگامی که نمونه در زیر میکروسکوپ فلوروسنس با نور ماوراء بنفش مشاهده می‌شود، هسته با رنگ Ethidium bromide به رنگ قرمز در می‌آید. بدین ترتیب با شمارش هسته‌ها، تعداد بلاستومرهای هر بلاستوسیت مشخص می‌شود (شکل ۲).



شکل ۲: تصویر فلوروسنس یک بلاستوسیت که با Ethidium bromide رنگ‌آمیزی شده است.

روش کار بدین ترتیب بود که جنینها با محیط کشت بدون سرم یا بافر فسفات (PBS) شسته شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در معرض رنگ قرار گرفتند. سپس دوباره با محیط کشت بدون سرم یا PBS شسته شده و برای مدت ۳۰-۲۰ ثانیه در ۱٪ Triton X-100 قرار داده

جدول ۳: میزان تکوین جنینها پس از ۹۶ ساعت کشت در گروه کنترل و در

گروه‌های هم‌کشتی اویداکت‌های فاقد کومولوس

تعداد جنین	تکرار	۲۲h کشت	۲۸h کشت	۷۲h کشت	۹۶h کشت
تعداد جنین	تکرار	M	M+B	B	HB
۹۲	۲	۵۶(۶۱)	۸۲(۸۹)	۳۷(۴۰)	۱۸(۲۰)
۹۳	۲	۶۰(۶۵)	۸۶(۹۲)	۳۹(۴۲)	۲۵(۲۷)
۸۶	۲	۳۷(۵۵)	۷۴(۸۶)	۶۴(۷۴) ^a	۵۰(۵۸) ^a

M= Morula, B= Blastocyst, HB= Hatching Blastocyst

a: P<0.001

مقادیر داخل پرانتز نشان‌دهنده درصد می‌باشد.

مقادیر بصورت انحراف معیار \pm میانگین نشان داده شده‌اند.

بحث

هم‌کشتی به عنوان ابزاری مفید در رشد جنین قبل از لانه‌گزینی در محیط آزمایشگاهی است. در واقع اساس هم‌کشتی تقلید از محیط اویداکت است. با توجه به کاربرد هم‌کشتی در باروری آزمایشگاهی و انتقال جنین (IVF-ET)، مطالعات فراوانی با استفاده از سلولهای اپیتالی یا explant‌های اویداکتی (۲۳، ۲۵)، خرگوش (۲۶، ۲۷)، گاو (۲۹، ۲۸، ۲۵)، گوسفند (۲۰) و انسان (۳۱، ۳۴، ۱۹) انجام شده است. در تمام این مطالعات اثرات هم‌کشتی بر تکوین جنین، مفید گزارش شده است. Bongso و همکارانش با بکارگیری سلولهای اپیتالی اویداکت انسان، افزایش قابل ملاحظه‌ای را در لقاح، بلاستوسپون و میزان باروری جنین انسان گزارش کرده‌اند (۳۱، ۳۲، ۱۹). همچنین در مطالعه‌ای که قبلاً بر روی هم‌کشتی سلولهای اویداکت انسان بر جنین دو سلولی موش انجام داده بودیم، تأثیر مثبت آن را بر رشد جنین‌ها مشاهده کردیم (۳۳).

در این مطالعه نیز مشاهده شد که هم‌کشتی جنینهای دو سلولی موش با سلولهای اپیتالی نواحی آمپولا و ایستومس اویداکت هامستر در قیاس با گروه کنترل (۱۰% T6+FCS)، سبب بهبود درصد بلاستوسیت‌ها و همچنین آنها می‌شود. با رنگ‌آمیزی بلاستوسیت‌ها و شمارش هسته‌ها نیز مشخص شد که تعداد هسته‌ها در گروه آمپولا از ایستومس و کنترل نیز بیشتر است. تعداد هسته‌ها نشانگر تعداد بلاستومرها است و هر چه تعداد بلاستومر بیشتر باشد، کیفیت بلاستوسیت بهتر است (۳۰). این نتایج نشان داد که بلاستوسیت‌های با کیفیت بهتر، از هم‌کشتی با سلولهای اپیتالی آمپولای اویداکت بدست می‌آید. این یافته‌ها و نتایج دیگران (۳۳، ۳۴، ۳۰، ۲۹) نشان می‌دهد که احتمالاً تأثیر سلولهای اویداکتی بستگی به گونه جانوری ندارد. به عبارت دیگر می‌توان از تأثیر مفید سلولهای اپیتالی اویداکت یک گونه بر جنین گونه دیگر استفاده کرد. ولی به هر حال تاکنون مکانیسم یا مکانیسم‌های دقیق تأثیر هم‌کشتیها شناخته نشده است. اما ترشح فاکتورهای امبریوتروفیک نظیر گلیکوپروتئینها (۳۸، ۳۶)، فاکتورهای رشد (۳۹) و میتوزن (۴۱، ۴۰)، ترشح آنتی‌اکسیدنتهایی نظیر تارین و گلوکاتون (۴۴، ۴۲) یا تغییر ترکیبات محیط کشت نظیر تبدیل گلوکز به لاکتات و پیرووات

بدنبال ۷۲ ساعت کشت، درصد بلاستوسیت‌های بیشتری در آمپولا و ایستومس نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. $P<0.01$ برای A و $P<0.05$ برای ا).

به همین ترتیب درصد بلاستوسیت‌های خارج شده از زونا پلوسیدا (Hatching Blastocyst) پس از ۹۶ ساعت کشت در هم‌کشتیها، از گروه کنترل بیشتر بود ($P<0.001$ برای A و $P<0.05$ برای ا). در مقایسه تکوین جنینها بین گروه‌های هم‌کشتی آمپولا و ایستومس، سرعت تکوین جنینها در ۲۴ ساعت اول کشت در آمپولا بیشتر از ایستومس بود ($P<0.001$). و درصد همچنین بلاستوسیت پس از ۹۶ ساعت نیز در آمپولا از ایستومس بیشتر بود ($P<0.05$).

جدول ۱: میزان تکوین جنینها پس از ۹۶ ساعت کشت در گروه‌های هم‌کشتی و کنترل

تعداد جنین	تکرار	۲۲h کشت	۲۸h کشت	۷۲h کشت	۹۶h کشت
تعداد جنین	تکرار	M	M+B	B	HB
۱۱۲	۲	۱۰۷(۹۲) ^a	۱۰۹(۹۶) ^a	۱۰۲(۸۹) ^a	۷۳(۶۴) ^a
۱۱۸	۲	۸۴(۷۱) ^a	۱۱۳(۹۶) ^a	۹۲(۸۷) ^b	۵۹(۵۰) ^b
۱۰۵	۲	۵۳(۵۰)	۸۳(۷۹)	۶۹(۶۶)	۳۸(۳۶)

M= Morula, B= Blastocyst, HB= Hatching Blastocyst

مقادیر داخل پرانتز نشان‌دهنده درصد می‌باشد. a: P<0.001, b: P<0.05

۱۰

شمارش بلاستومرها نشان داد که تعداد بلاستومرها در هم‌کشتی با آمپولا بیشتر از گروه کنترل بوده است ($P<0.001$ برای A و $P<0.05$) (جدول ۲). در ضمن تعداد بلاستومر بلاستوسیت‌های موجود در هم‌کشتی آمپولا از ایستومس نیز بیشتر بود ($P<0.05$).

جدول ۲: تعداد بلاستومر بلاستوسیت‌ها در گروه‌های هم‌کشتی و کنترل پس از

۹۶ ساعت کشت

تعداد بلاستوسیت‌ها	تعداد بلاستومرها	تعداد بلاستوسیت‌ها
۲۱	۱۲۱ \pm ۳۰ ^a	آمپولا
۱۶	۹۵ \pm ۲۲ ^b	ایستومس
۲۰	۵۶ \pm ۲۰	کنترل

a: P<0.001 و b: P<0.05

مقادیر بصورت انحراف معیار \pm میانگین نشان داده شده‌اند.

آزمایش ۲:

میزان تکوین جنینها در گروه‌های هم‌کشتی اویداکت فاقد کومولوس و کنترل در جدول ۳ نشان داده شده است که به طور کلی میزان تکوین جنینها در گروه‌های هم‌کشتی مزبور از گروه کنترل کمتر بود.



حاصل نتوانند رشد و تکامل جنین‌های موش را حمایت کرده و حتی اثر منفی نیز در این بر هم کش داشته باشند.

Bavister و همکارانش (۵۳) نیز نشان دادند که جنین‌های هامستر با هم‌کشتی در اویداکت موش‌هایی که ۱۴-۳۲ ساعت پس از تزریق HCG بدست آمده‌اند، رشد می‌یابند ولی اگر این زمان طولانی‌تر شود، رشد جنین‌ها دچار مشکل می‌شود.

هم‌کشتی سلول‌های اپیتلیال اویداکت هامستر و بخصوص ناحیه آمپولا، تکوین جنین‌های موش را در محیط آزمایشگاهی به لحاظ بلاستولاسیون و تعداد بلاستومر بهبود می‌بخشد و پاسخ هامسترها نسبت به گنادوتروپین‌های تزریقی، در هم‌کشتی سلول‌های اپیتلیالی مشتق از اویداکت آنها، حائز اهمیت است.

تقدیر و تشکر

این مطالعه طرح مصوب شماره ۱۱-۴۶۲ دفتر مرکزی جهاددانشگاهی است و محل آن، بخش تحقیقات پژوهشکده روبان بوده است. نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر خود را از همکاری آقای باغستانی در امور آماری این مطالعه، ابراز می‌دارند.

منابع

1. Chang MC; fertilization of rabbit ova in vitro. Nature 184: 466, 1959
2. Harlow GM, Quinn P; Development of preimplantation mouse embryos in vitro and in vivo. Aust J Biol Sci, 35: 187-193, 1982.
3. Fisher B; Developmental retardation in cultured preimplantation embryos. J Reprod Fert, 79: 115-123, 1987.
4. Bavister BD; Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. Theriogenology, 26: 143-154, 1988.
5. Sakkas D, Batt PA, Cameron WN, Development of preimplantation goat (Capra hircus) embryos in vivo and in vitro. J Reprod fertil, 87: 359-365, 1989.
6. Menezo Y, Arnal F, Humeau C, Ducret L, Nicollet B; Increased viscosity in embryo transfer medium does not improve the pregnancy rates in I.V.F and ET. fertil steril, 25: 680-682, 1989.
7. Gardner DK, Sakkas D; Mouse embryo cleavage, metabolism and viability: role of medium composition. Hum Reprod, 8: 288-295, 1993.
8. Ho Y, Wiggle Sorth K, Eppig JJ, Schultz RM; Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: Augmentation by amino acids and analysis of gene expression. Mol Reprod Dev, 41: 232-238, 1995.
9. Gardner DK, Lane M; Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. Biol

(۲۳، ۴۵)، حذف مواد امبریوتوکسیک از محیط کشت و یا کاهش تانسین اکسیون (۴۸، ۴۵) می‌توانند در این زمینه مؤثر باشند؛ اگرچه تأثیر دو یا چند مکانیسم فوق به طور همزمان نیز بعید نیست.

به منظور افزایش اثر عوامل مؤثر، هم‌کشتیها در قطره‌های ریز (۴۰-۲۰) انجام شد. این عمل سبب بهبود تکوین جنین‌ها نسبت به هم‌کشتی جنین‌ها در محیط‌های بزرگ می‌شود (۲۲، ۱۲). از سوی دیگر در مطالعه حاضر مشاهده شد که میزان مورولا در ۲۴ ساعت اول کشت و بلاستوسیت‌های خارج شده از زوناپلوسیدا پس از ۹۶ ساعت، در گروه هم‌کشتی آمپولا بیشتر از ایستموس بود. کیفیت بهتر تکوین جنین در آمپولا نسبت به ایستموس می‌تواند به عملکرد بهتر سلول‌های آن در حذف شرایط منفی، بیشتر بودن سلول‌های ترشحی آمپولا (۴۹)، تفاوت در فراساختار (۵۰) و نوع ترشحات آمپولا و ایستموس (۵۱) مربوط باشد. در تأیید مسئله اخیر Way و همکارانش (۵۲) می‌افزایند که اسپرم‌های بیشتری پس از آنکوباسیون با مایع ایستموسی در مقایسه با مایع آمپولاری به زوناپلوسیدا متصل می‌شوند.

نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان می‌دهد که گنادوتروپین‌ها می‌توانند نحوه پاسخگویی سلول‌های اویداکت را تحت‌الشعاع قرار دهند بگونه‌ای که عدم عملکرد آنها باعث می‌شود که سلول‌های اویداکت

Reprod, 48: 377-385, 1993.

10. Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, and Tervit HR; Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. J Reprod Fert, 89: 573-578, 1990.

11. Lane M, Gardner DK; Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids, J Reprod. Fert, 109: 153-164, 1997.

12. Valojerdi MR, Nematollahi, Hosseini A, Mozdarani H; The effect of vero cell on development of one and two cell mouse embryos. J Middle East Fertility Society, 7: 35-41, 1997.

13. Menezo YJR, Guerin JF, Czyba, JC; Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayers of vero cell. Biol Reprod, 42: 301-306, 1990.

14. Myers M W, Broussard JR, Menezo YJR, Prough SG, Blakwell J, Godke PA, Thibodeaux JK; Established cell lines and their conditioned media support bovine Embryo development during in vitro culture. Hum Reprod, 9: 1927-1931, 1994.

15. Leppens G, Gardner DK, Sakkas D; Co-culture of 1-cell outbred mouse embryos on bovine kidney epithelial cells: effect on development, glycolytic activity, inner cell mass: trophoblast ratios and viability. Hum Reprod, 11: 598-603, 1996.

16. Broussard KR, Thibodeaux JK, Myers MW, Roussel



- JD, prough SG, Blackwell J, Godke RA, Frozen-thawed cumulus-granulosa cell support bovine Embryo development during co-culture. *Fertil Steril*, 62: 176-180, 1994.
17. Wiemer KE, Casey PI, devore D, Godke RA; The culture of equine embryos using a new fetal uterine monolayer culture system. *Theriogenology*, 29: 327, 1988.
18. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam SS; Coculture: A new lead in embryo improvement for assisted Reproduction. *Fertil Steril*, 59: 179-191, 1991
19. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam SS; Coculture techniques for blastocyst transfer and embryonic stem cell Production. *Assist Reprod Reviews*, 5: 106-114, 1995.
20. Rexroad and Powell; Co-culture ova with oviductal cells in medium 199. *J Anim Sci*, 66: 947, 1988.
21. Ebert KM, Hammer RE, Papaioannou VE, A simple method for counting in the preimplantation mouse embryo. *J Experimentia*, 41: 1207-1209, 1985.
22. Shebani R, Frasor J, Radwanska E, Binor Z, wood-Molo, Hibner M, Mack S, Ralins RG; Comparison of mouse embryo development in open and microdrop co-culture systems. *Hum Reprod*, 11: 2223-2229, 1996.
23. Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J, Menezo YJR; Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. *Hum Reprod*, 5: 737, 743, 1990.
24. Sakkas P, Trounson AO; Coculture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pregnancy. *J Reprod Fert*, 90: 109-118, 1990.
25. Hosoi Y, Minami N, Iritani A; Embryo culture in explanted oviducts in mice and cattle. *Horm Res*, 44: suppl2. 9-14, 1995.
26. Carney EW, Tbback C, Ellington JE, Foote RH; Co-culture of rabbit 2-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cell and other somatic cells. *Mol Repod Dev*, 27: 209-215, 1990.
27. Fukaya T, China s, Murakami T, Yajima A, Is direct cell-to-cell contact needed to improve embryonic development in co-culture?. *Tohoku J Exp Med*, 180: 225-232, 1996.
28. Eyestone WH, First NI, Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or conditioned medium. 85: 715-720, 1989.
29. Wiemer KE, Hoffman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlberger B, Fiore I, Cuervo M, Embryonic morphology and rate of implantation Of human embryos following coculture on bovine oviductal epithelial Cells. *Hum Reprod*, 8: 97-101, 1993.
30. Hoshi K, Kanno Y, Katayose H, Yanagida K, Suzuki R, Sato A, Coculture of mouse embryos with cryopreserved human Oviduct epithelial cells. *J Assist Reprod Genet*, 11: 367-372, 1994.
31. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam S; Improved fertilization rates of human oocytes in co-culture. *J Vitro Fertil Embryo Transfer*, 8: 216-221, 1991.
32. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S, Improved pregnancy rate after transfer embryo grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril*, 58: 569-574, 1992.
33. Baharvand H, Valojerdi MR, Hosseini A; Effect of co-culturing of feeder cells isolated from different regions of human oviduct on the mouse embryo. *development middle East Fertility Society J*, 1, Supp L: 23: Abstract, 1996.
34. Takeuchi K, Nagata Y, Sandow BA, Hodgen GD. Primary culture of human fallopian tube epithelial cells and co-culture of early mouse pre-embryos. *Mol Reprod Dev*, 32: 236-242, 1992.
35. Vlad M, Wziker D, Kwnedy RC, Nuclei number in human embryos Co-culture with human anpullavy cell, *Hum Reprod*. 11: 1978- 1986, 1996.
36. Nancarrow CD, Hill JL, Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct specific glycoproteins. *Cell Biol International*, 18: 1105-1114, 1994.
37. Lin LP, Chan ST, Ho PC, Yeung WS, Human oviductal cells produce high molecular weight factor(s) that improves the development of mouse embryos. *Hum Reprod*, 10: 2781-2786, 1995.
38. Minami N, Utsmi K, Iritani A; Effects of low molecular weight oviductal factors on the development of mouse one-cell embryos in vitro. *J Reprod Fert*, 96: 735-745, 1992.
39. Desai N, Goldfarb J; Co-culture human embryos may be subjected to widely different microenvironments pattern of growth factor/cytokine release by vero cells during the Co-culture interval. *Hum Reprod*, 13: 1600-1605, 1998.
40. Pulkinen MO; Oviductal function is critical for very early embryo life. *Annals med*, 27, 307-310, 1995.
41. Stojkovic M, Wolf E, Van Langendonck A, Van Steenbrugge A, Charpigny G, Reinaud P, Gandolfi F,



Brevini TAL, Memillod P, Terqui M, Brem G, Massip A; Correlaions between chemical parameters, mitogenic activity of bovine oviduct-conditioned medium. *Theriogenology*, *Theriogenology*, *Theriogenology*, 48: 659, 673, 1997.

42. Gardiner CS, Salmen JJ, Brandt CJ, Stover SK; Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol Reprod*, 59: 431-436, 1998.

43. Takahashi Y, Kanagawa H; Effects of glutamine, glycine and taurine on the development of in vitro fertilized bovine zygotes in a chemically defined medium. *J Vit Med Sci*, 60: 433-437, 1998.

44. Guerin P, Menezo YJR; Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. *Zygote*, 3: 333-343, 1995.

45. Bongso A, Fong CY; The effect of co-culture on human zygote development. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 5: 585-593, 1993.

46. Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR; Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized

in vitro. *J Reprod Fert*, 92: 125-131, 1991.

47. Bavister BD; Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Hum Reprod*, 7: 1339-1341, 1992.

48. Kim YB; vero cell co-culture and mouse embryo development. *Assist, Reprod, Reviews*, 6: 162-165, 1996.

49. Bongso A; Oviductal cells and conception. *Reprod Med Review*, 4: 31-41, 1995.

50. Abe H, Oikawa T; Regional differences in the ultrastructural features of secretory cells in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviductal epithelium. *J Anat*, 175: 147-158, 1991.

51. Neider GL, Macon GR; Uterine and oviductal protein secretion during early pregnancy in the mouse. *J Reprod Fert*, 81: 287-294, 1987.

52. Way AL, Schuler AM, Killian; Infieuce of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on sperm- egg binding and fertilization in vitro. *J Reprod Fert*, 109: 95-101, 1997.

53. Minami N, Bavister BD, Iritani A; Development of hamster two cell embryos in the isolated mouse oviduct in organ culture system. *Gamete Reseach*, 19: 235-240, 1988.

