Archive of SID

مقایسه به‌کارگیری دو محیط کشت متفاوت T_6 و RPMI در کشت همزمان جنینهای دو سلولی موش با سلولهای Vero

منصوره موحدین Ph.D.☆♦، مجتبی رضازاده Ph.D.☆، احمد حسینی Ph.D.★

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

چکیده

* **هدف:** بررسی آثار دو محیط کشت T_6 و RPMI در کشت همزمان جنینهای دو سلولی موش با رده سلولی Vero

* **مواد و روشها:** جنینهای دو سلولی موش پس از تحریک تخمک گذاری و جفت‌گیری از موشهای ماده به دست آمده و به چهار گروه (دو گروه شاهد و دو گروه آزمون) تقسیم شدند. جنینهای گروههای شاهد ۱ و ۲ به‌ترتیب در محیطهای T_6 و RPMI و جنینهای گروه آزمون ۱ و ۲ به‌ترتیب در محیطهای کشت همزمان $Vero+T_6$ و Vero+RPMI کشت داده شدند و رشد و تکوین جنینها در هر یک از گروهها به‌مدت ۹۶ ساعت با روش آماری χ^2 مقایسه شدند.

* **یافته‌ها:** نتایج نشان داد که کشت همزمان جنینها با استفاده از هر دو محیط کشت می‌تواند تکامل جنینها را نسبت به کشت در محیط روتین آزمایشگاهی بهبود بخشد. هر چند که تفاوتهای موجود میان محیط کشت T_6 و سیستم کشت همزمان $Vero+T_6$ معنی‌دار نبود اما میزان درصد بالاتری از جنینها در محیط کشت T_6 نسبت به کشت همزمان $Vero+T_6$ توانستند به مرحله خروج از زونا برسند. در همین حال محیط کشت T_6 نسبت به RPMI بهتر عمل کرده و تفاوتهای آماری معنی‌داری میان جنینهایی که در محیط T_6 کشت داده شدند نسبت به RPMI مشاهده شد. مقایسه کشت همزمان جنینها با سلول Vero در دو محیط کشت T_6 و RPMI هم نشان داد که غیر از مرحله خروج از زونا جنینها در سیستم کشت همزمان $Vero+T_6$ تکامل بهتری نسبت به سیستم Vero+RPMI داشتند.

* **نتیجه‌گیری:** بر اساس یافته‌های پژوهش می‌توان دریافت که هر چند کشت همزمان به تکامل جنین دو موش در محیط کشت کمک می‌کند اما به‌کارگیری محیطهای ساده نیز در کشت جنین مفید است و در صورت به‌کارگیری کشت همزمان می‌بایست به‌دنبال محیط کشتی بود که هم برای تکثیر سلولها مناسب باشد و هم به رشد و تکوین جنین کمک کند.

گل واژگان: کشت همزمان، جنین موش، محیط کشت

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

علیرغم آنکه در سالهای اخیر پیشرفتهای زیادی در تهیه محیطهای کشت جنینی صورت گرفته است اما هنوز در این زمینه مشکلات زیادی وجود دارد که از جمله می‌توان به ایست تکوینی وابسته به مرحله تکاملی خاص و از دست دادن قدرت ادامه حیات جنینهایی که برای مدتی در محیط کشت نگهداری شده‌اند؛ اشاره کرد که در نتیجه، امکان کشت طولانی مدت جنین قبل از انتقال از بین می‌رود (۱). از این رو است که انتقال جنین انسانی معمولاً در مراحل ۸-۴ سلولی صورت می‌گیرد.

اما مشکل دیگر آن است که انتقال در مراحل اولیه تکاملی باعث می‌شود که عدم همزمانی میان جنین و پذیرش رحم وجود داشته باشد لذا میزان لانه‌گزینی کاهش پیدا می‌کند (۲). به‌منظور غلبه بر این مشکلات، انواعی از سیستمهای کشت طراحی شده بتوان قبل از انتقال جنین، برای مدت زمان طولانی‌تری آن را در محیط کشت نگاه داشت. امروزه استفاده از تک لایه سلولی و سیستم کشت همزمان با سلولهای سوماتیک توسط بسیاری از محققین توصیه شده است (۳، ۴، ۵، ۶). سلولهای Vero که مشتق از اپی‌تلیوم کلیه میمون سبز آفریقایی است، به این دلیل انتخاب می‌شود که دارای منشا مشترک با سیستم تناسلی است و در ضمن از نظر هرگونه آلودگی ویروسی و باکتریایی نیز کنترل می‌شود.

Lai و همکارانش (۷) توانستند از آثار سودمند کشت همزمان Vero برای جنینهای دو سلولی موش بهره جسته و رشد و تکامل این جنینها را در محیط کشت بهبود بخشند. Valojerdi و همکارانش (۸) و نیز Nematollahi و همکارش (۹) هم با استفاده از کشت همزمان جنین موش با Vero بهبود در تکامل جنینهای منجمد شده را گزارش کردند. Menezo و همکارانش (۲) در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که کشت همزمان جنینهای انسانی با سلولهای Vero باعث بهبودی در تکامل آنها می‌شود، اما این محققین در کشت همزمان جنینهای تک سلولی موش با سلولهای Vero نتوانستند نتایج مشابهی به دست آورند. در عین حال کشت همزمان دارای ارزشهایی در IVF انسانی است که می‌توان به استفاده از روشهای کشت همزمان در تکامل بلاستوسیست و سپس انجماد آن اشاره کرد. امروزه اهمیت انجماد پری‌نوکلئوس و جنینهای مراحل اولیه تکامل (دو سلولی تا چهار سلولی) ثابت شده است. کشت همزمان جنین تا مرحله بلاستوسیست ممکن است توانایی جنین را برای زنده ماندن پس از انجماد بهبود بخشد (۱۰).

در کشت همزمان محیط کشت مورد استفاده نیز بسیار مهم است. به عنوان مثال Rexroad و همکارش (۱۱) نشان دادند که Ham's F-10 در کشت همزمان سلولهای لوله رحمی گوسفند بسیار ضعیف عمل می‌کند. Lai و همکارانش (۷) نیز به نتیجه رسیدند که HTF[1] برای رشد سلولها در کشت همزمان مناسب نیست اما برعکس DMEM/F-12[2] خیلی خوب عمل می‌کند و اگر ترکیب مساوی از این دو محیط کشت در ۲۴ ساعت اولیه رشد سلولها به‌کار رود در آن صورت سلولها قادر خواهند بود که با HTF تطابق پیدا کرده و سیستم برای تکامل جنین مناسب می‌شود. در عین حال DMEM/F-12 نیز برای رشد و تکثیر سلولهای Vero بسیار مناسب است اما برای تکامل جنینهای انسانی مفید نیست (۱۲) و از این نظر HTF بهتر عمل می‌کند (۱۳) که با سلولهای Vero همخوانی ندارد. به هر حال نیاز به یک محیط کشت ایده‌آل یا پروسه‌هایی که تطابق سلول با محیط کشت را بهبود بخشد، هنوز وجود دارد. در ضمن رشد بیش از حد تک لایه سلولی نیز دارای تأثیرات زیانباری بر تکامل جنینی است زیرا بسیاری از سلولهای لایه‌های اضافی دچار مرگ شده و مواد سمی به داخل محیط کشت آزاد می‌شود که در نهایت pH محیط بالا می‌رود که هم برای سلولهای Vero و هم برای جنینها مضر است (۷).

در پژوهش حاضر به مقایسه دو محیط کشت متفاوت T_6 و RPMI در کشت همزمان جنینهای دو سلولی موش با سلولهای Vero پرداخته شده است چرا که محیط T_6 یک محیط نمکی ساده و مناسب برای کشت جنین بوده و RPMI با سلولهای Vero همخوانی دارد و باعث تکثیر زیاد سلولها می‌شود.

مواد و روشها

* جمع آوری جنینهای دو سلولی موش

موشهای ماده از نژاد NMRI با سن ۸-۶ هفته با تزریق داخل صفاتی ۷/۵IU از hMG و ۴۸ ساعت بعد ۷/۵IU hCG تحریک تخمک گذاری شده و به صورت یک به یک در کنار موشهای نر قرار گرفتند. صبح روز بعد با مشاهده پلاک واژن و حصول اطمینان از وقوع حاملگی موشهای ماده از قفس نرها جدا شدند. موشهای ماده حامله ۴۸ ساعت پس از تزریق hCG به روش قطع نخاع گردنی کشته شده و به سرعت لوله‌های رحمی آنها جدا و به قطره‌ای از محیط T_6 یا RPMI که قبلاً آماده شده بود، انتقال یافتند. جنینهای به‌دست آمده به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. دو گروه اول برای کشت در محیط T_6 (گروه شاهد ۱) و هم‌کشتی در محیط T_6+Vero (آزمون ۱) در نظر گرفته شده و دو گروه بعدی نیز برای کشت در محیط RPMI (شاهد ۲) و هم‌کشتی در محیط RPMI+Vero (آزمون ۲) در نظر گرفته شدند.

* کشت سلولهای Vero

برای کشت سلولهای Vero با سلولاریته 1×10^5 سلول در میلی‌لیتر به‌ترتیب زیر عمل شد: با استفاده از محیط کشت DMEM (برای دو گروه اول) و RPMI (برای دو گروه دوم) قطرات ۱۰۰ میکرولیتری از سلول Vero در پتری‌دیش با قطر ۳۰ میلی‌لیتر قرار داده شده و روی آن با پارافین پوشانده شد. پس از آنکه حدود ۸۰ درصد کف قطره توسط سلولها پر شد، محیط DMEM با T_6 محتوی ۵۰mg/ml BSA[3] و محیط RPMI با محیط تازه، دارای ۱۰ درصد FCS[4] تعویض شد. پتری‌دیش‌ها به انکوباتور Co_2دار منتقل شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت قطره‌ها آماده دریافت جنین بودند.

1. Human Tubal Fluid
2. Dulbecco's Modified Eagle's Medium Ham's F-12
3. Bovine Serum Albumin
4. Fetal Calf Serum

www.SID.ir

بررسی آماری

میزان رشد و تکوین جنینها در هریک از گروههای آزمون و شاهد، روزانه به مدت ۹۶ ساعت بررسی شده و سپس با روش آزمون آماری χ^2 بین گروهها مقایسه شد.

یافته‌ها

نتایج پژوهش حاضر در جداول ۴-۱ خلاصه شده است:

در جدول ۱ مقایسه‌ای میان میزان رشد و تکوین جنینهای دو سلولی موش پس از کشت همزمان با Vero+T_6 و گروه شاهد صورت گرفته است. گروه شاهد ۱ شامل ۲۴۲ جنین دو سلولی بود که در محیط T_6 کشت داده شدند و گروه آزمون ۱ شامل ۳۷۰ جنین دو سلولی بود که در محیط هم کشتی Vero+T_6 کشت داده شده بودند.

در گروه شاهد ۱ میزان ۹۶ و ۸۹ درصد جنینهای به ترتیب به مرحله چهار سلولی و هشت سلولی رسیدند و برای گروه آزمون ۱ این مقدار به ترتیب ۹۵ و ۹۱ درصد بود که اختلاف موجود ظاهری بوده و معنی‌دار نبود. در گروه شاهد ۱ میزان ۷۸ و ۸۱ درصد جنینها به‌ترتیب به مرحله مورولا و بلاستوسیست رسیدند و در گروه آزمون ۱ این مقادیر ۸۹ و ۸۲ درصد بود که اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود. درحالی که در گروه شاهد ۱ میزان ۴۴ درصد جنینها توانستند به مرحله خروج از زونا برسند این مقدار برای گروه آزمون ۱ میزان ۳۳ درصد بود که تفاوت مشاهده شده از نظر آزمون آماری معنی‌دار بود ($P<0.01$).

جدول ۱: مقایسه میزان تکوین جنینهای دو سلولی موش از گروه شاهد ۱ و آزمون ۱

گروه	تکرار آزمایش	تعدادکلی جنینهای	چهار سلولی (٪)	هشت سلولی (٪)	مورولا (٪)	بلاستوسیست (٪)	خروج از زونا (٪)
شاهد ۱	۱۰	۲۴۲	۲۳۱ (۹۶)	۲۱۶ (۸۹)	۲۱۰ (۸۷)	۱۹۶ (۸۱)	۱۹۷ (۴۴)
آزمون ۱	۹	۳۷۰ (۹۵)	۳۵۰ (۹۱)	۳۳۶ (۸۹)	۳۳۰ (۸۲)	۳۰۳ (۸۳)	۱۲۳* (۳۳)

گروه شاهد ۱: جنین‌های کشت داده شده در محیط T_6

گروه آزمون ۱: جنینهای کشت داده شده در محیط هم کشتی Vero+T_6

*P<0.01

در جدول شماره ۲ مقایسه‌ای میان میزان رشد و تکوین جنینهای دو سلولی موش پس از کشت همزمان با Vero+RPMI و گروه شاهد انجام شده است. گروه شاهد ۲ شامل ۱۰۶ جنین دو سلولی موش بود که در محیط RPMI کشت داده شدند و گروه آزمون ۲ شامل ۱۲۲ جنین دو سلولی موش بود که در محیط کشت همزمان Vero+RPMI کشت داده شدند.

در گروه شاهد ۲ به ترتیب ۸۳ و ۷۶ درصد جنینها به مراحل تکامل چهار سلولی و هشت سلولی رسیدند و این مقادیر برای گروه آزمون ۲ و به‌ترتیب ۹۳ و ۸۳ درصد بود که اختلاف مشاهده شده برای مرحله چهار سلولی معنی‌دار بود ($P<0.01$). میزان درصد جنینهایی که به مراحل تکامل مورولا و بلاستوسیست رسیدند در گروه شاهد ۲ به ترتیب ۶۵ و ۸۵ درصد و در گروه آزمون ۲ به‌ترتیب ۷۵ و ۵۶ درصد بود که تفاوت مشاهده شده معنی‌دار نبود. در همین حال ۳۲ درصد از جنینهای گروه شاهد ۲ و ۳۸ درصد از جنینهای گروه آزمون ۲ به مرحله خروج از زونا رسیدند و تفاوت مشاهده شده معنی‌دار نبود.

جدول ۲: مقایسه میزان رشد و تکامل جنینهای دو سلول موش درگروه شاهد ۲ و آزمون ۲

گروه	تکرار آزمایش	تعدادکلی جنینهای	چهار سلولی (٪)	هشت سلولی (٪)	مورولا (٪)	بلاستوسیست (٪)	خروج از زونا (٪)
شاهد ۲	۵	۱۰۶	۸۸ (۸۳)	۸۱ (۷۶)	۶۹ (۶۵)	۶۱ (۵۸)	۳۴ (۳۲)
آزمون ۲	۵	۱۲۲	۱۱۳ (۹۳)	۱۰۱ (۸۳*)	۹۱ (۷۵)	۶۹ (۵۶)	۴۶ (۳۸)

گروه شاهد ۲: جنینهای کشت داده شده در محیط PRMI

گروه آزمون ۲: جنینهای کشت داده شده در محیط هم کشتی Vero+PRMI

*P<0.01

در جدول شماره ۳ مقایسه‌ای میان میزان رشد و تکوین جنینهای دو سلولی موش در دو محیط کشت متفاوت T_6 (گروه شاهد ۱) و PRMI (گروه شاهد ۲) صورت گرفته است. در حالی‌که در گروه شاهد ۱ میزان ۹۶ درصد جنینها به مرحله چهار سلولی رسیدند این مقدار برای گروه شاهد دوم ۸۳ درصد بوده و تفاوت مشاهده شده معنی‌دار بود ($P<0.001$).

در همین حال ۸۹ درصد جنینهای گروه شاهد ۱ و ۷۶ درصد جنینهای گروه شاهد ۲ به مرحله تکامل هشت سلولی رسیدند و تفاوت مشاهده شده همچنان معنی‌دار بود ($P<0.01$). در گروه شاهد ۱ به‌ترتیب ۸۷، ۸۱، ۴۴ درصد جنینها به مراحل تکاملی مورولا، بلاستوسیست و خروج از زونا رسیدند و این مقادیر برای گروه شاهد دوم به‌ترتیب ۶۵، ۵۸، ۳۲ درصد بوده و تفاوت موجود از نظر آزمون آماری معنی‌دار بود ($P<0.0001$).

جدول ۳: مقایسه رشد و تکامل جنینهای دو سلولی موش در محیط T_6 و RPMI

گروه	تکرار آزمایش	تعدادکلی جنینهای	چهار سلولی (٪)	هشت سلولی (٪)	مورولا (٪)	بلاستوسیست (٪)	خروج از زونا (٪)
شاهد ۱	۱۰	۲۴۲	۲۳۱ (۹۶)	۲۱۶ (۸۹)	۲۱۰ (۸۷)	۱۹۶ (۸۱)	۱۰۷ (۴۴)
شاهد ۲	۵	۱۰۶	۸۸** (۸۳)	۸۱* (۷۶)	۶۹*** (۶۵)	۶۱*** (۵۸)	۳۴*** (۳۲)

*P<0.01

گروه شاهد ۱: جنینهای دو سلولی کشت داده شده در محیط کشت T_6 **P<0.001

گروه شاهد ۲: جنینهای دو سلولی کشت داده شده در محیط کشت RPMI ***P<0.0001

در جدول شماره ۴ مقایسه‌ای میان میزان رشد و تکامل جنینهای دو سلولی موش پس از کشت همزمان با Vero در دو محیط کشت متفاوت T_6 (گروه آزمون ۱) و RPMI (گروه آزمون ۲) صورت گرفته است.

نتایج حاکی از آن است که در گروه آزمون ۱ به ترتیب ۹۵، ۹۱، ۸۹

www.SID.ir

Archive of SID

درصد جنینها به مراحل تکامل چهار سلولی، هشت سلولی و مورولا رسیدند و این مقادیر برای گروه آزمون ۲ به‌ترتیب ۹۳، ۸۳، ۷۵ درصد بود که تفاوت موجود غیر از مرحله چهار سلولی معنی‌دار بود ($P<0.05$). در گروه آزمون ۱ میزان ۸۲ درصد جنینها توانستند بلاستوسیست شوند و این مقدار برای گروه آزمون دوم ۵۷ درصد بود که تفاوت مشاهده شده معنی‌دار بود ($P<0.0001$) در همین حال ۳۳ درصد جنینهای گروه آزمون اول و ۳۸ درصد جنینهای گروه آزمون دوم توانستند به مرحله خروج از زونا برسند اما تفاوت مشاهده شده ظاهری بوده و از نظر آماری معنی‌دار نبود.

جدول ۴: مقایسه رشد و تکوین جنینهای دو سلول موش در محیط کشت همزمان Vero با استفاده از دو محیط کشت متفاوت T_6 RPMI

گروه	تکرار آزمایش	تعداد کل جنینهای	چهار سلولی (٪)	هشت سلولی (٪)	مورولا (٪)	بلاستوسیست (٪)	خروج از زونا (٪)
آزمون ۱	۹	۲۷۰	۲۵۰ (۹۵)	۲۲۶ (۹۱)	۲۳۰ (۸۹)	۲۰۳ (۸۲)	۱۲۳ (۴۳)
آزمون ۲	۵	۱۲۲	۱۱۳ (۹۳)	۱۰۱* (۸۳)	۹۱* (۷۵)	۶۹** (۵۶)	۴۶ (۳۸)

آزمون ۱: جنینهای دوسلولی کشت دادمشده در محیط هم‌کشتی $Vero+T_6$ *$P<0.05$

آزمون ۲: جنینهای دوسلولی کشت دادمشده در محیط هم‌کشتی Vero+RPMI **$P<0.0001$

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که کشت همزمان قادر است تکامل جنینهای دو سلولی موش را در محیط کشت بهبود بخشد. مشابه این نتیجه را بسیاری از محققین دیگر نیز به‌دست آوردند (۳، ۴، ۵، ۶، ۱۴). به‌نظر می‌رسد که سلولهای Vero در محیط کشت همزمان قادر به برداشتن عوامل مزاحم بوده و از این طریق به رشد و تکامل جنینها کمک می‌کنند (۱۵). در عین حال برخی از محققین بر این باورند که سلولهای Vero قادر هستند عوامل ممانعت کننده هچینگ را از محیط برداشته یا موادی ترشح کنند که از قطر زونا پلاسیداکم شده و در نتیجه خروج از زونا تسهیل شود (۱۶). اما نتایج پژوهش این نکته را تأیید نکرد چرا که درصد بالایی از هچینگ در سیستم کشت همزمان با Vero دیده نشد. هر چند که درصد بالایی از جنینها در محیط کشت همزمان $Vero+T_6$ در مقایسه با محیط T_6 به مراحل تکاملی پیشرفته مانند مورولا و بلاستوسیست رسیدند (به‌ترتیب ۸۲ و ۸۳ درصد در کشت همزمان و ۸۷ و ۸۱ درصد در محیط کشت T_6) اما در کشت همزمان تعداد کمتری به مرحله خروج از زونا رسیدند (۳۳ درصد در هم کشتی و ۴۴ درصد در محیط T_6) که احتمالاً علت همان اشکالی است که به کشت همزمان وارد می‌شود یعنی سلولها میزان بالایی از مواد مغذی موجود در محیط را برای تکثیر خود استفاده کرده (۷) و در زمانی که جنین نیاز به سطح بالای انرژی برای هچینگ داشت، مواد لازم در اختیار آن قرار نگرفت. به همین دلیل انتخاب نوع محیط کشت همراه با سلولها در سیستم کشت همزمان به‌منظور بالا بردن بازدهی آن بسیار مهم است (۱۷).

مقایسه به کارگیری دو محیط کشت متفاوت T_6 و PRMI در کشت همزمان Vero و جنینهای دو سلولی موش نشان داد که غیر از مرحله خروج از زونا، محیط کشت T_6 که یک محیط سادهٔ نمکی و مناسب برای کشت جنین است (۱۸) بهتر از محیط RPMI که نامناسب برای کشت جنین اما مناسب برای تکثیر و رشد سلولهای Vero است، عمل می‌نماید.

محققین دیگر نیز به این نتیجه رسیده‌اند که آثار مفید کشت همزمان در صورت استفاده از محیطهای کشت متفاوت یکسان نبوده و با انتخاب محیط کشت صحیح و استفاده از سرم مناسب می‌توان نتایج بهتری از کشت همزمان به‌دست آورد. Rexroad و Powell (۱۱) هم به این نتیجه رسیدند که DMEM برای رشد و تکثیر سلولی مناسب است و HTF برای رشد و تکامل جنین انسانی بسیار مفید است و استفاده از هر یک به‌تنهایی نمی‌تواند نتایج مطلوبی در کشت همزمان ارائه دهد اما ترکیبی از این دو هم برای رشد و تکثیر سلولی مناسب است و هم در رشد و تکوین جنین خوب عمل کند.

نکته قابل توجه آن است که علیرغم بهبودی تکامل جنینها در هم‌کشتی، درصد بالایی از هچینگ به‌دست نیامد و محیط کشت سادهٔ T_6 مناسب‌تر بود (۴۴ درصد خروج از زونا در محیط T_6 و ۳۳ درصد در محیط هم‌کشتی $Vero+T_6$). لذا به‌نظر می‌رسد که با توجه به معایب کشت همزمان مانند صرف دقت زیاد، هزینه بالا و احتمال آلودگی ویروسی و باکتریایی بهتر است از محیط کشتی استفاده شود که دارای اثرهای سیستم کشت همزمان باشد و همان‌طور که محققین دیگر نیز یادآور شدند (۲۰) باید مطالعات بیشتری صورت پذیرد تا مشخص شود که آیا واقعاً کشت همزمان چیزی بیش از یک محیط کشت مناسب و ایده‌آل برای تکامل جنین فراهم می‌کند یا خیر؟ بنابراین دقت در انتخاب و تهیه محیط کشت برای هر گونه و نژاد جانوری و احتمالاً به کارگیری محیطهای متغیر بر اساس نوع نیاز جنین در هر زمان از تکامل می‌تواند جانشین بسیار مناسبی برای هم‌کشتی باشد و تنها در صورت نیاز واقعی از کشت همزمان استفاده شود و در این صورت نیز از محیط کشتی استفاده شود که هم برای تکثیر سلول و هم برای تکامل جنینی مفید باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی ایران که کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این طرح را برمبنای قرارداد شماره ۲۶۳۲/۳۰/۱۹پ مورخ ۷۷/۱۰/۱۳ تأمین نمودند و همچنین از آقای حسین بهاروند که در انجام مراحل مختلف پژوهش ما را یاری کردند، ابراز می‌دارند.

References

1. Menezo Y, Arnal F, Humean C, Ducret L, Nicollet B: Increased Viscosity in embryo Trans fer medium does

www.SID.ir

Archive of SID

not improve The Pregnancy rates in IVF and ET. Fertil Stril 1984; 52: 680-682
2. Menezo Y, Guerin J, Czyba J: Improve-ment of human embryo development in vitro by Co-culture on monolayers of Vero cells. Biol Reprod 1990; 42: 301-306
3. Rexroad CE Jr: Co-culture of domestic animal embryos. Theriogenology 1989; 31: 105-114
4. Camous S, Heyman Y, Meziou W, Menezo Y: Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos culture with trophoblastic vesicles. J Reprod Fertil 1984; 72: 749-485
5. Heyman Y, Menezo Y, Chesne P, Camous S, Garnier V: In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. Theriogenology 1987; 27: 59-68
6. Kuzan FB, Wright RW Jr: Observations on the development of bovine morulae on various cellular and noncellular substrate. J Anim Sci 1982; 54: 811-816
7. Lai YM, Stein DE, Soong YK, et al: Evaluation of Vero cell co-culutre system for mouse embryos in various media. Hum. Reprod 1992; 7: 276-280
8. Valojerdi MR, Nematollahi N, Hosseini A, Mozdarani H: The effect of Vero cell on development of one and two cell mouse embryos. MEFS J 1997; 2(1): 35-41
9. Nematollahi N, Valojerdi MR: Effect of Vero cell Co-culture on the development of frozen thawed two cell mouse embryos. J Assis Reprod Genet (1999); 16(7): 380-384
10. Wiemer KE, Dale B, Hu Y, Steuerwald N, Maxson WS, Hoffman DI: Blastocyst development in co-culture: development and morphological aspects. Hum Reprod 1995; 10(12): 3226-3232
11. Rexroad CE Jr, Powell A: Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblast vesicles Theriogenology 1988; 24: 387-347
12. Sakkas O, Tronson Ao, Kola I: In vitro cleavagerates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in co-culture with oviduct cell. Reprod Fertil Dev 1989; 1: 127-136
13. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM: Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril 1985; 44: 493-498
14. Wiemer KE, Denniston RS, Amborski GF, White KL, Godke RA: A fetal fibroblast monolayer system of in vitro culture of bovine embryos. J Anima Sci 65 1987; (suppl 1): 122. Abstract
15. Stewart CI: Leukemia inhibitory factor and the regulation of premiplantation development of the mammalian embryo. Mol Reprod 1994; 39: 233-238
16. Wiemer KE, Cohen J, Amborski GF: In vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. Hum Reprod 1989; 45: 595-600
17. Pratt HPM, Muggleton- Harris AL: Cycling cytoplasmic factors that promote mitosis in the cultured 2-cell mouse embyros. Development 1988; 104: 115-120
18. Gardner DK, Lane M: Embryo Culture systems. In "In Vitro Fer tilization."Trounson A, Gardner DK (eds). 1993, pp 85-114
19. Bavister BD: Co-culture for embryos development: is it really necessary? Hum Reprod 1992; 7(10): 1339-1341
20. Plachot M: Co-culture of embryos and feeder cells. Hum Reprod 1996; 11(1): 35-42

www.SID.ir