دانشور
پزشکی

اثر محیط القا شده توسط سلول‌های کومولوس بر تکوین جنین‌های موش در محیط آزمایشگاه

نویسندگان: دکتر عباسعلی کریمپور[1]، دکتر امیراسماعیل نژادمقدم[1] و سیدسعید موسوی‌درکا[2]

۱. دانشیار گروه تشریح دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. پزشک عمومی
* نویسنده مسئول: Email: amalekshah@gmail.com

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال سیزدهم - شماره ۶۳
تیر ۱۳۸۵

تاریخ وصول: ۸۳/۱۲/۸
تاریخ پذیرش: ۸۴/۹/۵

چکیده

سابقه و هدف: اغلب مطالعاتی که به بررسی تأثیرات سیستم هم‌کشتی (co-culture)، از جمله هم‌کشتی سلول‌های کومولوس بر تکوین جنین پرداخته‌اند، تأثیر مثبت آن را مورد تأیید قرار داده‌اند. اما در خصوص تأثیر محیط القا شده (conditioned medium) توسط سلول‌های سوماتیک سیستم هم‌کشتی، مطالعات انجام پذیرفته کم‌تر است و همچنین یافته‌های گزارش شده متناقض هستند. هدف این مطالعه، بررسی تأثیر محط القا شده توسط سلول‌های کومولوس انسان بر تکوین جنین‌های موش است.

مواد و روش‌ها: جنین‌های مورد مطالعه از موش NMRI با سن ۸-۶ هفته پس از تحریک تخمدانی به‌دست آمدند. سلول‌های کومولوس از مایع فولیکولی زنانی که تحت عمل آسپیراسیون تخمدانی برای اقدامات درمانی نازایی قرار گرفته بودند تهیه شد. سلول‌های مزبور با روش سانتریفوژ از مایع فولیکولی جدا و با روش پرکل به‌طور نسبی از سلول‌های خونی جدا گردیدند و در محیط هامز F10 به‌مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند تا پوشش سلولی تک لایه ایجاد شود. محیط القا شده از سطح این پوشش جدا و پس از سانتریفوژ و فیلتر شدن مورد استفاده قرار گرفت. دو سری مطالعه طراحی و انجام پذیرفت. در سری اول ۳۱۷ جنین یک سلولی موش در محیط هم کشتی سلول‌های کومولوس در Ham's F10 (GC)، محیط هامز القا شده توسط سلول‌های هم‌کشتی (CM) و محیط هامز تنها (HF) به‌مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند. در سری دوم ۳۹۱ جنین دو سلولی موش در محیط‌های یاد شده به‌مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. مراحل مختلف تکوین جنین هر ۲۴ ساعت بررسی و ثبت گردید. مقایسه بین میانگین مراحل مورد مطالعه توسط آزمون کای دو انجام‌پذیرفت.

یافته‌ها: ۱۱، ۲۴ و ۱۴ درصد جنین‌های یک سلولی به ترتیب در محیط‌های HF، GC و CM مرحله توقف دو سلولی (two cell block) را پشت سرگذاشته، به مرحله ۴ سلولی رسیدند. این نسبت در گروه CM نسبت به گروه HF تفاوتی نداشت، اما به‌طور معنادار از گروه GC کم‌تر بود ($p<0/05$). همچنین میزان جنین‌هایی که به مرحله بلاستوسیت رسیدند در گروه CM تفاوتی با گروه HF نداشته، ولی به‌طور معنادار از گروه GC کم‌تر بوده است. در سری دوم، آزمایش‌های میزان جنین‌های دو سلولی‌ای که به مرحله بلاستوسیت رسیدند در گروه CM به‌طور معنادار از گروه HF بیش‌تر ($p<0/05$) و از گروه GC کم‌تر ($p<0/05$) بوده است.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های تحقیق می‌توان گفت که محیط القا شده توسط سلول‌های گرانولوزای انسان دارای اثر مثبت بر تکوین جنین‌های اولیه موش است، ولی تأثیر آن کم‌تر از سیستم هم‌کشتی این سلول‌ها بوده، نمی‌تواند جایگزین کاملی برای آن محسوب شود.

واژه‌های کلیدی: سلول کومولوس، سیستم هم‌کشتی، محیط القا شده جنین موش

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

علی‌رغم پیشرفت قابل ملاحظه که درتکنیک‌های لقاح آزمایشگاهی و کشت جنین پستانداران در محیط آزمایشگاه طی سالیان اخیر اتفاق افتاده، همچنان شرایط محیط کشت از شرایطی که جنین اولیه در داخل بدن از آن برخوردار است فاصله دارد و در نتیجه، میزان تکوین و نیز حاملگی متعاقب انتقال جنین‌های مزبور به داخل رحم کم‌تر از انتظار است. تلاش محققان برای ارتقای کیفیت شرایط محیط کشت جنین‌ها همچنان ادامه دارد. یکی از رویکردهای مهم برای نیل به این مقصود، استفاده از سیستم‌های هم‌کشتی (co-culture) است. در سالیان اخیر، مطالعات زیادی به بررسی اثر سیستم‌های هم‌کشتی‌سلول‌های سوماتیک مختلف از جمله سلول‌های فیبروبلاست، کومولوس، پوشش اپی‌تلیالی، لوله رحمی،کبد و کلیه (vero cells) بر تکوین جنین‌های اولیه پستانداران مختلف پرداخته و اغلب آن‌ها، تأثیر مثبت و امبریوتروفیک سیستم‌های مزبور را مورد تأیید قرار داده‌اند [۶-۱]. یکی از انواع مهم سیستم‌های هم‌کشتی که مورد بررسی و استفاده محققان قرار گرفته سیستم هم‌کشتی سلول‌های کومولوس است. مطالعات مختلف نشان داده که تک لایه سلول‌های کومولوس، از گونه‌های مختلف، میزان کلیواژ جنین‌های اولیه و تکوین آن‌ها تا مرحله بلاستوسیست و هچینگ و نیز کیفیت جنین‌ها را افزایش می‌دهد [۶-۴].

با آن‌که تأثیرات مثبت سیستم‌های هم‌کشتی بر تکوین جنین‌های اولیه مورد تأیید تقریباً تمام محققان جنین‌شناسی است، اما استفاده از آن در آزمایشگاه‌های IVF-ET کم‌تر مورد توجه قرار گرفت. به‌نظر می‌رسد مشکلات آماده‌سازی سیستم هم‌کشتی و زمان‌بر بودن آن از مهم‌ترین دلایل این امر باشد [۴]. محیط القا شده، عبارت از محیط کشتی است که سلول‌های سوماتیک در آن با انجام تقسیمات پی‌درپی، پوشش تک لایه‌ای (mono layer) از سلول‌ها را در کف ظرف محتوی محیط ایجاد می‌کند. این محیط، حاوی ترکیبات و موادی است که توسط سلول‌های تشکیل‌دهنده سیستم هم‌کشتی ترشح و به آن اضافه شده‌اند. مطالعات نشان داده که برخی از این مواد با آثار امبریوتروفیک و یا آنتی‌اکسیدانتی، شرایط محیط کشت را برای تکوین جنین‌های اولیه بهبود می‌بخشند [۴و۷]. در صورتی که محیط القا شده توسط سیستم هم‌کشتی، همان تأثیرات سیستم کشت مزبور را برتکوین جنین‌های اولیه داشته باشد، می‌تواند مورد توجه بیش‌تر قرار بگیرد؛ چرا که دیگر بسیاری از اشکالات سیستم هم‌کشتی را ندارد. می‌توان در فرصت مقتضی به اندازه کافی آن را تهیه و در شرایط مناسب (frozen) نگهداری و استفاده کرد. تأثیر محیط القا شده توسط پوشش تک‌لایه‌ای سیستم هم‌کشتی سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های اپی‌تلیالی لوله رحمی، سلول‌های Vero، اندومتر و گرانولوزا گونه‌های مختلف در برخی مطالعات مورد بررسی قرار گرفت؛ اما یافته‌های گزارش شده همسان نیست. بعضی محققان براساس یافته‌های خود محیط القایی را به اندازه سیستم هم‌کشتی همان سلول مؤثر دانسته [۱۱-۸]، و برخی دیگر، تأثیر مثبت محیط القا شده را تأیید کرده، اما آن را کم‌تر از سیستم هم‌کشتی گزارش کرده‌اند [۱۲،۷و۱۳]. در مقابل، مطالعات دیگری وجود دارند که یافته‌های آن‌ها تأثیر مثبت محیط القا شده را بر تکوین جنین تأیید نکرده، تفاوتی بین آن‌ها و محیط کشت القا نشده نمی‌بینند [۱۶-۱۴].

در این مطالعه، تأثیر محیط القا شده توسط سلول‌های کومولوس بر تکوین جنین‌های اولیه موش بررسی و با تأثیر سیستم هم‌کشتی این سلول‌ها مقایسه شده است.

مواد و روش ها

حیوان آزمایشگاهی و گردآوری جنین‌ها

جنین‌های مورد استفاده در این مطالعه از موش‌های سفید نژاد NMRI با سن ۸-۶ هفته تهیه شدند. موش‌های ماده تحت تحریک تخمدانی با ۷ واحد PMSG و ۴۸ ساعت بعد ۷ واحد hCG قرارگرفتند و سپس با موش‌های نر از همان نژاد در قفس گذاشته شدند. صبح

Archive of SID

www.SID.ir

روز بعد، وجود پلاک واژنی مورد بررسی قرار گرفت. جنین‌های ۱ و۲ سلولی به ترتیب در ساعات ۲۰ و ۴۸ بعد از تزریق hCG از لوله‌های رحمی موش‌های حامله با شستشو توسط محیط HTF حاوی HEPES خارج و در قطره‌ای درشت از همین محیط گردآورده شده، به‌طور تصادفی در قطرات محیط‌های مورد تجربه توزیع گردیدند.

جداسازی و کشت سلول‌های کومولوس و تهیه محیط القا شده

سلول‌های کومولوس از مایع فولیکولی زنانی که به‌منظور درمان نازایی تحت عمل آسپیراسیون تخمدانی قرار گرفتند تهیه شد. تحریک تخمدانی در این زنان با استفاده ازHMG و hCG انجام‌پذیرفت. برای جداسازی سلول‌های کومولوس از مایع فولیکولی و خارج کردن سلول‌های خونی از میان آن‌ها، از روش شرح داده شود توسط دیرنفلد (Dirnfeld) و همکاران او (۱۹۹۷) [۴] استفاده شد. به‌طور خلاصه، مایع فولیکولی آسپیره شده فولیکول‌های متعدد که نسبتاً شفاف و آغشتگی آن به خون کم بود جمع‌آوری و با سرعت ۱۰۰۰×g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد. پلاک تشکیل شده در ۳ میلی‌لیتر محیط HTF حاوی HEPES شناور گردیده، به لوله سانتریفوژ محتوی ۳ میلی‌لیتر پرکل ۴۰ درصد انتقال یافت و با سرعت ۳۰۰×g به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. این کار برای جداسازی سلول‌های خونی انجام‌پذیرفت. در این عمل، سلول‌های خونی به ته لوله انتقال یافته، سلول‌های گرانولوزا به‌طور عمده در منطقه بین محیط کشت و پرکل تجمع می‌یابند. سلول‌های کومولوس از منطقه مزبور گردآوری شده، در محیط هامز F10 حاوی ۱۰ درصد سرم آلومیناز انسان با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰×g و به مدت ۱۰ دقیقه شستشو می‌گردید. این مرحله دو بار تکرار می‌شد. پس از شستشو، پلاک سلول‌های کومولوس در محیط هامز F10 شناور شده، با استفاده از لام‌نئوبار، تراکم آن در حد 1×10^5 تنظیم و با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو، زنده بودن سلول‌ها کنترل می‌گردید و آنگاه جهت کشت در قطرات ۱۰۰ میکرولیتری در ظروف کشت گذاشته می‌شد. سطح قطرات محیط کشت توسط روغن معدنی پوشانده می‌شد. ظروف کشت به انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷°C و فشار CO_2 ۵ درصد انتقال داده می‌شدند. ۴۸ ساعت بعد، در حالی که پوشش تک لایه‌ای سلول‌های کومولوس در قطرات کشت ایجاد می‌شدند از تعدادی از این قطرات برای کشت جنین و از تعدادی دیگر برای تهیه محیط القا شده استفاده می‌شد. برای این کار محیط کشت قطرات هم کشتی کشیده شده، پس از سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰×g به‌مدت ۱۰ دقیقه و فیلتر کردن با استفاده از فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲µ برای کشت مورد استفاده قرار گرفته یا فریز می‌شدند تا در موقع مقتضی مورد استفاده قرار گیرند.

محیط‌های مورد تجربه

دو مجموعه از آزمایش‌ها طراحی و اجرا شد. در دسته اول، تعداد ۳۱۷ جنین تک سلولی موش طی ۶ سری در قطرات هم‌کشتی سلول‌های کومولوس (GC)، محیط هامز F10 القا شده توسط سلول‌های کشت کومولوس کشت یافته (CM)، و محیط هامز F10 معمولی و القا نشده (HF) به‌مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند و هر ۲۴ ساعت، مراحل تکوین جنین‌ها بررسی و ثبت گردید.

در دسته دوم، تعداد ۳۹۱ جنین دو سلولی موش که مرحله توقف رشد دو سلولی را پشت سر گذاشته بودند، طی ۶ سری در محیط‌های مورد اشاره به‌مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند و مراحل تکوین جنین‌ها بررسی و ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نسبت جنین‌هایی که به مراحل مورد نظر، از جمله بلاستوسیست و هچینگ رسیدند درهر یک از گروه‌های مورد تجربه تعیین و با استفاده از آزمون آماری کای دو با هم مقایسه شدند. میزان $p<0/05$ به‌عنوان سطح معنادار بودن در نظر گرفته شد.

Archive of SID

www.SID.ir

یافته‌ها

تجربه اول

مقایسه تکوین جنین‌های یک سلولی در گروه‌های مختلف مورد تجربه در جدول ۱ آورده شد. تفاوتی بین نسبت جنین‌هایی که به مرحله ۲ سلولی رسیدند در گروه‌های کشت سه‌گانه دیده نمی‌شود؛ اما نسبت جنین‌هایی‌که مرحله توقف دوسلولی را پشت سرگذاشته به مرحله ۴ سلولی رسیدند در گروه CM به‌طور معنادار کم‌تر از گروه GC بود (p<۰/۰۵) و تفاوتی را با گروه HF نشان نداد.

همچنین نسبت بلاستوسیست نیز در گروه CM (۰/۹ درصد) کم‌تر از گروه GC (۳/۶ درصد) بود (p<۰/۰۵)، ولی تفاوت معناداری با گروه HF نداشت.

تجربه دوم

جدول ۲ یافته‌های مربوط به کشت جنین‌های دو سلولی را در گروه‌های مورد تجربه نشان می‌دهد. نسبت بلاستوسیست در گروه‌های CM، GC و HF به ترتیب ۸۶، ۷۹ و۷۳ درصد بوده است. این نسبت در گروه CM به‌طور معنادار بیش‌تر از گروه HF (p<۰/۰۵) و کم‌تر از گروه GC بوده است (p<۰/۰۵). نسبت هچینگ بلاستوسیست در گروه CM با دو گروه دیگر، تفاوتی را نشان نمی‌دهد.

بحث

این مطالعه به‌منظور مقایسه اثر محیط القا شده توسط سلول‌های کومولوس وسیستم هم‌کشتی این سلول‌ها بر تکوین جنین‌های اولین موش انجام پذیرفت.

یافته‌های این مطالعه نشان داد که محیط کشت القا شده در مقایسه با محیط کشت شاهد (القا نشده) شرایط مناسب‌تری را برای تکوین جنین‌های اولیه موش فراهم می‌آورد، اما در مقایسه با سیستم هم‌کشتی، قدرت کم‌تری را در تکوین جنین‌ها به نمایش می‌گذارد. توان محیط القا شده برای رد کردن جنین‌های یک سلولی از مرحله بحرانی توقف (block) دو سلولی، بدون آن‌که تفاوتی با محیط شاهد داشته باشد، به‌طور معنادار پایین‌تر از سیستم هم‌کشتی بوده، اما وقتی که از

جدول ۱ تکوین جنین‌های ۱ سلولی موش در محیط هم‌کشتی سلول‌های کومولوس (GC)، محیط کشت القا شده توسط سلول‌های کومولوس (CM) و محیط هامز F10 (HF)

گروه‌های مورد تجربه	تعداد دفعات تکرار	تعداد جنین‌های ۱ سلولی	تعداد جنین‌های ۱ سلولی (٪)	تعداد جنین‌های ۸-٤ سلولی (٪)	تعداد بلاستوسیست سلولی (٪)
GC	۶	۱۱۰	۱۰۶ (۹۶)	۲۶ (۲۳/۶) [a]	۴ (۳/۶) [a]
CM	۶	۱۱۷	۱۱۳ (۹۷)	۱۷ (۱۴/۵) [b]	۱ (۰/۹) [b]
HF	۶	۹۰	۸۹ (۹۹)	۱۰ (۱۱/۱) [b]	۰ (۰) [b]

ab معنادار نسبت به هم در یک ستون (p<۰/۰۵).

جدول ۲ تکوین جنین‌های ۲ سلولی موش در محیط هم‌کشتی سلول‌های کومولوس (GC)، محیط کشت القا شده توسط سلول‌های کومولوس (CM) و محیط هامز F10 (HF)

گروه‌های مورد تجربه	تعداد دفعات تکرار	تعداد جنین‌های ۲ سلولی	تعداد جنین‌های بلاستوسیست(٪)	تعداد جنین‌های هچینگ (٪)
GC	۶	۱۳۴	۱۱۶ (۸۶) [a]	۶۴ (۵۵) [a]
CM	۶	۱۳۲	۱۰۵ (۷۹) [b]	۵۱ (۴۸) [b]
HF	۶	۱۲۵	۹۱ (۷۳) [b]	۴۱ (۴۴) [b]

ab معنادار نسبت به هم در یک ستون (p<۰/۰۵).

Archive of SID

www.SID.ir

جنین دو سلولی‌ای که مرحله بحرانی توقف رشدی دو سلولی را پشت سرگذاشته‌اند استفاده شد، در محیط CM، نسبت بالاتری از جنین‌ها در مقایسه با محیط شاهد به مرحله بلاستوسیست رسیدند؛ اما این نسبت در مقایسه با گروه هم‌کشتی همچنان پایین‌تر بوده است.

در جستجو و مرور مقالات منتشر شده فقط دو مطالعه یافتیم که در آن‌ها تأثیر محیط القا شده توسط سلول‌های گرانولوزا با سیستم هم‌کشتی این سلول‌ها بر تکوین جنین‌ها بررسی و مقایسه شده است [۱۱و۱۳]. کوبایاشی (Kobayashi) و همکاران او (۱۹۹۲) گزارش کردند که محیط القا شده توسط سلول‌های گرانولوزای گاو (bovine) از توان برابر با سیستم هم کشتی این سلول‌ها در حمایت از تکوین جنین‌های اولیه گاو برخوردار است [۱۱]. اما مائدا (Maeda) و همکارانش (۱۹۹۶) که آن‌ها نیز اثر محیط القا شده و پوشش تک لایه سلول‌های گرانولوزای گاو (bovine) را بر جنین‌های یک سلولی همین حیوان بررسی کردند، نشان دادند که محیط القا شده از قدرت کم‌تری در حمایت از تکوین جنین‌ها، در مقایسه با گروه هم‌کشتی برخوردار است؛ اما نسبت به محیط کشت دست نخورده و القا نشده، شرایط مناسب‌تری را فراهم می‌آورد [۱۳].

یافته‌های ما گزارش مائدا و همکارانش را مورد تأیید قرار می‌دهد، اما با یافته‌های محققانی که گزارش کردند محیط القا شده و سیستم هم‌کشتی سلول‌های گرانولوزا [۱۱]، سلول‌های اپی‌تلیالی اویداکت [۱۰-۸]، و سلول‌های کبد موش صحرایی بوفالو [۸] از قدرت برابر در حمایت از تکوین جنین‌های اولیه برخوردارند، موافق نیست. همچنین نتایج این مطالعه نمی‌تواند گزارش‌هایی را که در آن‌ها توان محیط القا شده توسط سلول‌های سوماتیک مختلف در حمایت از تکوین جنین برابر و یا کم‌تر از محیط کشت دست نخورده و القا نشده ارزیابی شده‌اند [۱۶-۱۴] تأیید کند.

گرچه براساس مطالعات مختلف، این واقعیت موردپذیرش قرارگرفته‌که تأثیرات مثبت سیستم‌های هم‌کشتی بر تکوین جنین‌های اولیه پستانداران، مستقل از نوع و منشأ سلول‌های سوماتیک ایجادکننده پوشش تک لایه‌ای است [۱۷]، اما با توجه به گزارش‌هایی که نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل ملاحظه در تعیین تأثیر محیط القا شده حاصل از سلول‌های مختلف بر تکوین جنین‌ها هستند می‌توان تصور کرد که چون نوع و میزان سیتوکین‌های ترشح شده توسط سلول‌های سوماتیک در محیط کشت متفاوت است، محیط‌های القا شدهٔ به‌دست آمده از سیستم‌های کشت سلول‌های مزبور نیز متفاوتند و برخلاف سیستم‌های مستقیم هم‌کشتی، بسته به نوع سلول سوماتیک و نوع محیط کشت مورد استفاده برای ایجاد سیستم هم‌کشتی، از توان متفاوتی در حمایت از تکوین جنین‌های اولیه برخوردارند.

پوشش تک لایه‌ای سلول‌های کومولوس، ترکیبات مختلفی از جمله استرویید‌ها [۱۷]، سیتوکین‌های مختلف مانند اینترلوکین-۱ [۱۸] و اینترلوکین-۶ [۱۸] و Tumor necrosis factor (TNF) [۱۸]، و فاکتورهای رشد مختلف همانند فاکتور رشد شبه انسولین (IGF) [۴]، و فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) [۱۹] و فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) [۲۰] را در محیط کشت ترشح می‌کند. تصور می‌شود تأثیرات مفید محیط القا شده سلول‌های گرانولوزا بر تکوین جنین به تمام یا برخی از این فاکتورها مربوط است.

براساس یافته‌های این تحقیق که توان محیط القا شده را کم‌تر از سیستم مستقیم هم‌کشتی ارزیابی کرد می‌توان گفت که فقط بخشی از تأثیر مثبت یک سیستم هم‌کشتی به‌دلیل فاکتورهای هومورال آزاد شده توسط سلول‌های سوماتیک کشت یافته است و در ایجاد توان سیستم هم‌کشتی در حمایت از تکوین جنین‌های اولیه، مکانیسم‌های دیگری همانند واکنش‌های متقابل (interactions) ناشی از تماس مستقیم جنین با سلول‌های سوماتیک پوشش تک‌لایه‌ای [۲۱] نیز می‌تواند دخیل باشد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری می‌توان گفت که گرچه محیط القا شده سلول‌های کومولوس انسان دارای تأثیر مثبت بر تکوین جنین‌های اولیه است، اما نمی‌تواند جانشین کاملی برای سیستم مستقیم هم‌کشتی محسوب شود.

Archive of SID

www.SID.ir

تقدیر و تشکر

این تحقیق حاصل پروژه پژوهشی مصوب در شـورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به شماره ثبت ۴۹- ۷۹ است. بدین‌وسیله از کلیه کسانی که مـا را در اجرای این پروژه یاری دادنـد بخصـوص خـانم دکتـر سوده بحرالعلومی قدردانی می‌شود.

منابع

1. Park JS, Han TM, Lee CS, Kim SJ, Kim YH, Lee KJ, Lee KS, Lee KK. Improved development of DNA-Injected Bovine embryos co-cultured with mouse embryonic fibroblast cells. Animal Reproduction Science, 2000; 59:13-22.

2. Duszewska AM, Reklewski Z, Pienkowki M, Karasiewiez J, Modlinski JA. Development of bovine embryos on vero/ BRL cell monolayers (Mixed co-culture). Theriogenology, 2000; 54: 1239-1247.

3. Spandorfer SD, Barmat LI, Navarro J, Liu HC, veeck L, Rosenwaks Z. Importance of the biospy date in autologous endometrial cocultures for patients with multiple implantation failures. Fertil Steril, 2002; 77(6): 1209- 1213.

4. Dirnfeld M, Goldman S, Gonen Y, Koifman M, calderon I, Abramovici H. Asimplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. Fertil Steril, 1997; 67(1): 120- 122.

5. Malekshah KA, Esmailnejad MA. Follicular fluid and cumulus cells synergistically improve mouse early embryo development in vitro. J Reprod Develop, 2005; 51(2) (in press).

6. Freeman MR, Whitworth CM, Hill GA. Granulosa cell Co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in vitro fertilization. Hum Reprod, 1995; 10: 408-14.

7. Menck MC, Guyader-Joly C, Peyot N, Le bourhis D, Lobo RB, Renard JP, Heyman Y. Benficial effects of vero cells for developing IVF bovine eggs in two different coculture systems. Reprod Nutr Dev, 1997; 37: 141-150.

8. Hernandez-Ledezma JJ, Villanueva C, Sikes JD, Reberts RM. Comparison of co- culture and conditioned medium on expansion and hatching in vitro- derived bovine blastocysts. Theriogenology, 1995, 43(1): 233.

9. Liu LP, Chan ST, HO PC, Yeung WS. Human oviductal cells produce high molecular weight factor(s) that improves the development of mouse embryo. Hum Reprod, 1995; 10(10): 2781-2786.

10. Eyestone WH, First WL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J Reprod Fertil, 1989; 85(2): 715-720.

11. Kobayashi K, Takagi Y, Satoh T, Hoshi H, Oikawa T. Development of early embryos to the blastocyst stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. In Vitro Cell Dev Biol, 1992; 28A(4): 225-229.

12. Stojkovic M, Wolf E, Van Langendonckt A, Vansteenbrugge A, Charpigny G, Reinaud P, Gandolfi F, Brevini TAL, Mermillod P, Terqui M, Brem G, Massip A. Correlations between chemical parameters, mitogenic activity and conditioned medium. Theriogenology, 1997; 48: 659- 673.

13. Maeda J, Kotsuji F, Negami A, Kamitani N, Tominaga T. In vitro development of bovine embryos in conditioned media from bovine granulosa cells and vero cells cultured in exogenous protein- and amino acid-free chemically defined human tubal fluid medium. Biol Reprod, 1996; 54(4): 930- 936.

14. Poulin S, Laforest JP, Fortier MA, Perras E, sirard MA. Effects of conditioned media on porcine embryos at different stages of development. Theriogenoboy, 1997; 47: 1337- 1345.

15. Massip A, Mermillod P, Van Langendonckt A, Reichenbach HD, Lonergan P, Berg U, Carolan C, De Roover R, Brem G. Calving outcome following transfer of embryos produced in vitro in different conditions. Animal Reproduction Science, 1996; 44: 1-10.

16. Thompson JG, Duganzich D. Analysis of culture systems for bovine in vitro embryo production reported in abstracts of the proceedings of the international embryo transfer society (1991- 1995). Theriogenology. 1996, 45: 195.

17. Fabbri R,Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Cecconi S, Nottola SA, Motla Ventorali, Flamignic. Human embryo development and pregnancies in an homologous granulosa coculture system. J Assist Reprod Genet, 2000; 17(1): 1-12.

18. Zolti M, Ben-Rafael Z, Meirom R, Shemesh M, Bider D, Mashiach S, Apte RN. Cytokine involvement in oocytes and early embryos. Fertil Steril, 1991; 56(2): 265- 272.

19. Schotanus K, Hage WJ, Vanderstichele H, Hurk RV. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine prenatal follicles. Theriogenology, 1997; 48: 471- 483.

20. Kim IC, Schomberg DW. The production of transforming growth factor-beta activity by rat granulosa cell cultures. Endocrinology, 1989;124(3):1345-1351.

21. Joo BS, Kim MK, Na YJ, Moon HS, Lee KS, kim HD. The mechanism of action of co-culture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. Fertil Steril, 2001; 75(1): 193- 199.

Archive of SID

www.SID.ir