پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هجدهم شماره ۶۷ آذر و دی سال ۱۳۸۷ (۴۹-۴۳)

مطالعه مرفومتریک جنین های مرحله قبل از لانه گزینی موش: مقایسه جنین های تکوین یافته در محیط داخل [In vivo] و خارج بدن [In vitro]

عباسعلی کریم پور[۱] سمیه بحرالعلومی[۲] آیلر کلته[۲]
امیر اسماعیل نژاد مقدم[۳] فرشته طالب پور[۴]

چکیده

سابقه و اهداف : مطالعه جنین های مرحله قبل از لانه گزینی بدلیل اهمیت کشت و انتخاب آنها برای انتقال به رحم در درمان ناباروری و نیز در تکثیر حیوانات اهلی، مطالعه ای مهم قلمداد می شود. با مقایسه کمّی جنینهای (In vitro) و (In vivo) احتمالاً می توان به معیارهای مرفولوژیک دقیق تری جهت انتخاب جنین های با کیفیت بهتر دست یافت.

مواد و روش ها: جنین ها از موشهای NMRI پس از تحریک تخمدانی بدست آمدند. جنین های مراحل ۱، ۲، ۴ و ۸ سلولی، مرولا و بلاستوسیست به ترتیب در ساعات ۱۸، ۳۶، ۵۲، ۶۰، ۷۲ و ۹۶ بعد از تزریق hCG از بدن حیوانات حامله خارج شده و با جنین های همان مرحله که درIn vivo رشد کرده بودند، مقایسه شدند. قطر خارجی و داخلی جنین ، قطر پرده شفاف و تعداد بلاستومرهای بلاستوسیست کامل، شاخص های کمّی مورد مطالعه در این تحقیق بودند.

یافته ها: قطر خارجی،قطر داخلی و قطر پرده شفاف در اووسیت و زیگوت موش به ترتیب ۹۹/۹ ، ۷۵/۴ و ۴/۹ میکرومتر بوده است. این اندازه ها تا مرحله بلاستوسیست اولیه (Early blastocyst) در هر دو گروه In vitro وIn vivo بدون تغییر معنی دار بوده است. اما در مرحله بلاستوسیست کامل اندازه جنین نسبت به مراحل قبل بطور معنی داری بزرگتر ($P<0.05$) و قطر پرده شفاف بطور معنی داری کمتر شده است ($P<0.05$). این تفاوت در هر دو گروه In vitro وIn vivo نسبت به مراحل قبل وجود داشت. همچنین اندازه بلاستوسیست کامل در گروه In vivo (۱۱۶/۵ میکرومتر) بطور معنی داری از بلاستوسیست کامل In vitro (۱۰۴/۳میکرومتر) بزرگتر بوده است ($P<0.05$). تعداد بلاستومرها در گروه In vivo در مقایسه با گروه In vitro بطور معنی دار بیشتر بوده است ($P<0.05$). جنین ها درIn vitro بطور متوسط در ساعت ۱۱۰ بعد از تزریق hCG به مرحله بلاستوسیت کامل رسیدند در حالی که این زمان درIn vivo حدود ساعت ۹۶ بوده است.

استنتاج: بر اساس یافته های این مطالعه می توان گفت که تا قبل از مرحله بلاستوسیست نمی توان با معیار قطر جنین و قطرپرده شفاف کیفیت جنین ها را تعیین کرد ولی در مرحله بلاستوسیست قطر جنین و تعداد بلاستومرها احتمالا می تواند تعیین کننده کیفیت جنین باشد. همچنین سرعت تقسیم جنین و زمان رسیدن به مرحله بلاستوسییت نیزمی تواند مهم باشد.

واژه های کلیدی: مرفومتری جنین، جنین اولیه موش، بلاستوسیست، پرده شفاف

مقدمه

مرحله قبل از لانه گزینی (Preimplantation period) مرحله ای مهم از مراحل تکوین جنین در پستانداران می باشد. در این مرحله سلول تخم پس از چندین تقسیم که به تقسیمات کلیواژی معروف است، به بلاستوسیست

این تحقیق طی شماره ۴-۸۰ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

مولف مسئول: دکتر عباسعلی کریم پور: ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
Email: amalekshah@ yahoo.com

۱. دکترای بافت و جنین شناسی، عضو مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی و استاد دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳. دکترای علوم تشریح، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۴. کارشناس ارشد علوم تشریح و بافت شناسی، مربی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت : ۸۷/۸/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۷/۱۰/۱۶ تاریخ تصویب: ۸۷/۱۱/۹

www.SID.ir

تبدیل شده و سپس شروع به لانه گزینی در اندومتر رحم می کند. سهولت نسبی کشت جنین های مرحله مزبور در محیط های کشت ، مطالعه دقیق فرایند تکوین آنها را امکان پذیر ساخت. محدوده تحمل جنین های اغلب پستانداران در شرایط غیر اپتیمال کشت نسبتا وسیع است بگونه ای که ممکن است اغلب جنین ها به رشد خود تا مرحله بلاستوسیت ادامه دهند، اما مطالعات مختلف نشان داده است که بسیاری از تخمک ها و جنین های رشد یافته در محیط خارج از بدن، حتی اگر از لحاظ مرفولوژی کاملا طبیعی بنظر برسند ممکن است دچار تغییرات نامحسوسی در سطح مولکولی و ساختمانی شده باشند که صلاحیت آنها را جهت ادامه رشد در مراحل بعدی تکوین با مشکل مواجه می سازد (۱). استفاده از روشهای مختلف لقاح خارج رحمی برای درمان ناباروری در انسان طی دهه های اخیر، اهمیت مطالعه تکوین جنین های مرحله قبل از لانه گزینی را دوچندان کرده است. با وجود پیشرفت های قابل توجه در تولید محیط های کشت و تلاش برای نزدیک تر کردن شرایط محیط خارج به محیط طبیعی داخل بدن، هنوز نمی توان صلاحیت بقاء (Viability) جنین های تکوین یافته در محیط کشت را با جنین های همان مرحله که در داخل بدن تکوین یافتند برابر دانست. به همین دلیل انتخاب مناسب ترین جنین ها برای انتقال به رحم هم در روشهای تکثیر آزمایشگاهی حیوانات اهلی و هم در روش های درمان ناباروری در انسان همچنان از مسائل مطرح و مهم می باشد(۴،۳،۲). در حال حاضر در آزمایشگاه، این انتخاب با استفاده از معیار های مرفولوژیک همانند نمای ظاهری، یک دست بودن اندازه بلاستومرها، کمتر بودن تعداد تکه های (Fragments) سلولی ، تعداد و پراکندگی پیش سازهای هستکی صورت می پذیرد(۲،۴،۵). با وجود آسان بودن ارزیابی جنین با استفاده از معیار های مرفولوژیک، کارآیی این معیارها در تعیین صلاحیت تکوینی جنین کامل نبوده و تلاش برای دستیابی به معیارهای دقیق تری و در عین حال غیر تهاجمی و عملی، باشند همچنان از زمینه های مهم تحقیقات جنین شناسی کاربردی می باشد (۸،۷،۶). مقایسه مرفومتریک (کمّی) جنین های تکوین یافته در محیط کشت (In vitro) با جنین های رشد یافته در محیط طبیعی داخل بدن (In vivo)، علاوه بر ارزش نظری، می تواند معیارهایی را دست دهد که دستمایه تحقیقات بیشتر برای رسیدن به معیارهای دقیق تر برای انتخاب جنین های با کیفیت بالاترجهت انتقال به رحم در کلینیک های درمان ناباروری و یا مراکز اصلاح نژاد و تکثیر حیوانات اهلی شود. این مقایسه بر این فرض مبتنی است که شرایط In vitro در هر صورت در مقایسه با شرایط داخل بدن (In vivo) محیطی پایین تر از حد نرمال (Suboptimal) می باشد (۱)؛ مسلم است که جنین های رشد یافته که در این شرایط بسته به میزان تفاوت شرایط محیط کشت با شرایط نرمال داخل بدن، از لحاظ خصوصیات فنوتیپی کمی و کیفی می توانند تفاوت هایی را با جنین های رشد یافته در داخل بدن نشان دهند. بدیهی است هر چه جنین های رشد یافته در محیط کشت فنوتیپ نزدیک تری در مقایسه با جنین های داخل بدن نشان دهند از کیفیت بالاتر و صلاحیت رشد مناسب تری برخوردارند و منطقی است که تصور کنیم که شاخص های کمی و مرفومتریک از دقت بالاتری برای این منظور برخوردارند. اگرچه بسیاری از شاخص های کمّی و مرفومتریک مانند اندازه بلاستوسیست و تعداد بلاستومرها در مطالعات مختلف در کنار سایر اهداف مورد توجه قرار گرفتند (۹،۳،۱،۱۱،۱۰)؛ اما تا آنجا که ما جستجو کردیم مطالعات مستقلی که در آنها مشخصات مرفومتریک جنین های مرحله قبل از لانه گزینی در دو گروه In vivo و In vitro انداره گیری و مورد مقایسه قرار گرفته باشد نادر است.

در مطالعه حاضر برخی از مهمترین شاخص های مرفومتریک در جنین های مرحله قبل از لانه گزینی

Archive of SID

www.SID.ir

موش در دو گروه In vivo و In vitro اندازه گیری و با هم مقایسه شدند.

مواد وروش ها

حیوان آزمایشگاهی و گرفتن جنین ها

برای تهیه جنین از موش های سفید NMRI (موسسه رازی تهران) استفاده شد. سن حیوانات ۶ تا ۱۰ هفته و نگهداری آنها در شرایط دمایی ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت نور، آب و غذای کافی بوده است. برای تهیه جنین به حیوانات ماده، ۷ واحد هورمون HMG (سرونو، ایتالیا) و ۴۸ ساعت بعد ۷ واحد hCG (سرونو، ایتالیا) به روش داخل صفاقی تزریق شد. بلافاصله بعد از تزریق hCG هر حیوان ماده با یک سر موش نر بالغ از همان گونه در یک قفس جفت گذاری شده و صبح روز بعد، با معیار پلاک واژنی، حیواناتی که جفت گیری کردند جدا کرده و برای گرفتن جنین مورد استفاده قرار گرفتند.

برای گرفتن جنین های ۱، ۲، ۴ و ۸ سلولی، موش های حامله به ترتیب در ساعات ۱۸، ۳۶، ۵۲ و ۶۰ پس از تزریق hCG به روش قطع نخاع گردنی کشته شده و لوله های رحمی آنها خارج و به محیط کشت HTF حاوی بافر HEPES انتقال داده شدند. سپس با تزریق مقدار اندکی محیط به داخل لوله رحمی (Flushing) جنین ها خارج و به قطره های کشت انتقال داده شدند. اندازه گیریهای مرفومتریک بلافاصله پس از این مرحله انجام می شد. جنین های مراحل مرولا و بلاستوسیست کامل (Expanding blastocyst) حیوانات حامله به ترتیب در ساعات ۷۲ و ۹۶ پس از تزریقhCG کشته شدند؛ سپس رحم آنها خارج و به محیط کشت منتقل شده در نهایت و با تزریق محیط کشت به شاخهای رحمی جنین ها خارج و جمع آوری می شدند.

برای کشت و بدست آوردن جنین ها در مراحل مختلف محیط آزمایشگاه (In vitro)، جنین های ۲ سلولی (Late 2-cell) در ساعت ۴۶ از بدن حیوان خارج و به محیط کشت Ham's F10 حاوی ۱۰درصد سرم آلبومینار انسانی (HAS) منتقل شدند و بمدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ ، فشار ۵درصد CO2 کشت داده شدند. در ساعت ۲۴و ۴۸ کشت، به ترتیب تعدادی از جنین های ۴-۸ سلولی و مرولا از محیط کشت خارج و به محیطی جدید انتقلال داده شده و بلافاصله اندازه گیریهای لازم انجام می شد. در پایان ۷۲ ساعت بلاستوسیست های کامل از جنین هایی که به این مرحله نرسیدند جدا و ابتدا شاخص های مورد نظر در آنها اندازه گیری و سپس برای شمارش بلاستومر ها مورد استفاده قرار می گرفتند.

اندازه گیری مرفومتریک

قطر خارجی و داخلی جنین، قطر پرده شفاف (Zona pellucida) و تعداد بلاستومر های بلاستوسیست شاخص های کمی مورد مطالعه در این تحقیق بودند. برای اندازه گیری قطر جنین ها از میکروسکوپ حاوی صفحه مدرج چشمی (Ocular micrometer) استفاده شد. این صفحه بر روی عدسی چشمی نصب شد و با توجه به مدرج بودن براحتی می توان ابعاد جنین و قطر پرده شفاف را اندازه گیری کرد. برای هر یک از ابعاد مورد نظر حداقل سه اندازه گیری در محور های مختلف انجام شد و میانگین آن به عنوان اندازه واقعی ثبت شد.

برای شمارش بلاستومرها، بلاستوسیست به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه در قطره ای از محلول ۱ درصد سیترات سدیم قرار داده شد و سپس به سطح یک لام میکروسکوپی منتقل شد و با استفاده از مخلوط اتانل- اسید استیک فیکس و در محیط هوای آزمایشگاه خشک گردید. پس از فیکس کردن، رنگ آمیزی بلاستوسیست ها با استفاده از رنگ گیمسا انجام و شمارش بلاستومرها انجام پذیرفت.

بررسی آماری

برای مقایسه آماری قطر جنین ها و ضخامت پرده شفاف در مراحل مختلف و گروههای In vivo و In vitro از آزمونهای آماری ANOVA و Tukey استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه تعداد بلاستومرها در دو گروه In vivo و In vitro با استفاده از آزمون T-student انجام شد.

یافته ها

قطر خارجی و داخلی و قطر پرده شفاف در اووسیت موش به ترتیب ۹۹/۹ ، ۷۵/۴ و ۴/۹ میکرومتر بوده است . این اندازه ها در مراحل مختلف تکوین جنین اولیه شامل مراحل دوسلولی، چهارسلولی، هشت سلولی، مرولا و بلاستوسیست اولیه (شروع بلاستولاسیون) در هر دو گروه In vivo و In vitro تغییر معنی داری پیدا نمی کند. همچنین اندازه جنین ها در مراحل یاد شده تفاوتی را بین دو گروه In vivo و In vitro نشان نمی دهد(جدول شماره۱).

جدول شماره ۱: مقایسه شاخص های مرفومتریک (میانگین و انحراف معیار) جنین های اولیه موش در شرایط In vivo و In vitro

شاخص های مرفومتریک[1] / مرحله و شرایط تکوین جنین(N)	قطر خارجی	قطر داخلی	قطر پرده شفاف (زونا)	تعداد بلاستومر
اووسیت (۱۰)	۹۹/۹ ±۳/۳	۷۵/۴± ۶/۶	۴/۹± ۰/۶	–
۲سلولی (۴۹)	۹۸ /۹±۳/۸	۷۳/۶± ۴/۵	۴/۶± ۰/۵	–
In vivo (۲۲)	۹۷/۹ ±۳/۲	۷۶/۱± ۵/۵	۴/۷± ۰/۷	
۴ سلولی In vitro(۴۵)	۹۹/۱±۵/۱	۷۵/۲± ۳/۸	۴/۵± ۰/۴	–
In vivo(۳۱)	۹۸/۸ ±۲/۰	۷۶/۵±۵/۹	۴/۹± ۰/۶	
۸ سلولی In vitro(۳۸)	۱۰۰±۲/۷	۷۸/۶± ۵/۰	۴/۳± ۰/۳	–
In vivo(۳۱)	۹۷/۱± ۳/۰	۷۷/۳± ۵/۳	۴/۶± ۰/۶	
مرولا In vitro(۴۲)	۹۹/۱± ۴/۳	۷۹/۵± ۴/۹	۴/۳± ۰/۴	–
In vivo(۲۰)	۹۹/۰± ۵/۴	۸۲/۷± ۷/۸	۴/۴± ۰/۶	
بلاستوسیست اولیه In vitro(۳۰)	۱۰۲/۷± ۴/۵	۸۰/۶± ۶/۸	۴/۳±۰/۷	–
In vivo(۳۶)	[a] ۱۱۶/۵± ۶/۵	[a] ۱۰۸/۹± ۶/۵	[c] ۳/۱± ۰/۶	[d] ۴۸/۸±۱۱/۲
بلاستوسیست کامل In vitro(۲۱)	[b] ۱۰۴/۳±۷/۴	[b] ۹۹/۲± ۵/۲	۳/۶±۰/۶	[e] ۴۳/۳± ۴/۵

[a] تفاوت معنی دار در مقایسه با اندازه های متناظر مراحل قبل در همان ستون (P<۰/۰۵).
[b] تفاوت معنی دار در مقایسه با اندازه های متناظر مراحل قبل در همان ستون (P<۰/۰۵)
[c] تفاوت معنی دار در مقایسه با اندازه های متناظر مراحل قبل در همان ستون (P<۰/۰۵)
[ab] تفاوت معنی دار در مقایسه با یکدیگر(P<۰/۰۵)
[de] تفاوت معنی دار در مقایسه با یکدیگر(P<۰/۰۵)
N = تعداد

اما در مرحله بلاستوسیست کامل(Expanding or full blastocyst)، قطر خارجی، قطر داخلی و قطر پرده شفاف در گروه In vivo به ترتیب ۱۱۶/۵ ، ۱۰۸/۹ و ۳/۱ میکرومتر بوده است. اندازه جنین در این مرحله بطور معنی داری نسبت به مراحل قبل افزایش پیدا کرد (P<۰/۰۱) ؛ در حالی که قطر پرده شفاف بطور معنی داری کمتر شده است (P<۰/۰۵)همچنین ابعاد مزبور در بلاستوسیست های کامل گروه In vitro به ترتیب ۱۰۴/۳، ۹۹/۲ و ۳/۶ میکرومتر بوده است. این اندازه ها نیز نسبت به مراحل قبل از خود تفاوت معنی داری نشان می دهند (P<۰/۰۵) .اندازه جنین ها در مرحله بلاستوسیست کامل در گروه In vivo در مقایسه با بلاستوسیست های کامل گروه In vitro بزرگ تر بوده که این اختلاف در خصوص قطر خارجی معنی دار بوده است (P<۰/۰۵).کاهش قطر پرده شفاف در گروه In vivo نسبت به گروه In vitro معنی دار نبوده است.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

مقایسه اندازه جنین ها در مراحل مختلف رشد قبل از لانه گزینی نشان داد که اندازه آنها از مرحله اووسیت و جنین یک سلولی (سلول تخم، Zygote) تا مرحله آغاز بلاستولاسیون تغییر قابل ملاحظه ای پیدا نمی کند؛ اما وقتی بلاستولاسیون کامل شد اندازه بلاستوسیست کامل و توسعه یافته بطور معنی داری از جنین های مراحل قبل از خود بزرگ ترمی باشد. از این لحاظ جنین های In vitro نیز شرایطی مشابه با جنین های In vivo دارند. این موضوع در مطالعات قبلی، در جنین های گاو (۱۲) ، خوک (۱۳) و اسب (۱۴) هم نشان داده شد. از آنجا که در تقسیمات اولیه جنین (تقسیمات کلیواژی) اندازه بلاستومر ها در فاصله بین تقسیمات به مقدار ناچیزی بزرگ تر می شود عدم تفاوت اندازه کلی جنین در هر مرحله نسبت به مرحله قبل قابل درک می باشد. Sakkas و همکارانش (۱۹۸۹) نشان دادند که در جنین های بز در ۳ یا ۴ تقسیم اول بعد از لقاح سرعت تقسیم کند بوده و زمان هر سیکل تقسیم ۲۴ تا ۳۶ ساعت می باشد اما در تقسیمات بعدی این زمان به ۱۰ تا ۱۲ ساعت کاهش می یابد (۱۵). به نظر می رسد این وضعیت با مختصری تفاوت در مورد جنین های اولیه پستانداران دیگر نیز صادق باشد. افزایش سریع تقسیمات در مراحل منتهی به بلاستوسیست، سبب می شود که تعداد بلاستومر ها در مرحله بلاستوسیست کامل بحدی برسد که اندازه و حجم جنین را بطور معنی داری افزایش دهد. به عبارت دیگر اندازه جنین در مراحل پایین تر هم نسبت به مرحله قبل خویش افزایش پیدا می کند اما این افزایش ناچیز بوده و اختلاف معنی داری را ایجاد نمی کند؛ اما در مرحله بلاستوسیست کامل بدلیل افزایش قابل ملاحظه تعداد بلاستومر ها افزایش نهایی اندازه جنین معنی دار می شود.

کاهش قطر پرده شفاف در نتیجه افزایش تعداد بلاستومرها و افزایش حجم جنین نشانگر انعطاف پذیری نسبی این پرده می باشد. این کشیدگی و کاهش ضخامت، به سوراخ شدن پرده مزبور بدنبال تاثیر آنزیم های پروتئولیتیک مترشحه از سلول های تروفوبلاست در قطب رویانی و خروج تدریجی جنین و شروع لانه گزینی آن در اندومتر کمک می کند.

یافته های این مطالعه همچنین نشان داد که جنین های اولیه در شرایط In vivo حدود ۲۴ ساعت زودتر از جنین های رشد یافته در In vitro به مرحله بلاستوسیست کامل می رسند. همچنین بلاستوسیست های In vivo بلاستومرهای بیشتری داشته و از اندازه بزرگتری نیز برخوردارند. این تفاوت در مطالعات قبلی هم نشان داده شد (۳،۹،۱۶،۱۷). مطالعه فوق ساختمانی (Ultrastructural) بلاستوسیست ها نشان داد که در شرایط In vivo تراکم حجمی میتوکندری و سایر اندامک های دخیل در متابولیسم بلاستومر ها در مقایسه با شرایط In vitro افزایش می یابد؛ همچنین نسبت حجمی هسته به سیتوپلاسم که یک شاخص مهم نشان دهنده میزان فعالیت سلولی است در بلاستومرهای بلاستوسیست های In vivo در مقایسه با In vitro افزایش پیدا می کند؛ در مقابل تراکم حجمی قطره های لیپیدی و نیز واکوئول در سیتوپلاسم بلاستومرهای جنین های In vitro بیشتر می شود که نشان دهنده نوعی تغییر نامطلوب سیتوپلاسمی در این سلول هاست (۱۸). افزایش فعالیت متابولیک بلاستومرها و عدم وقوع تغییرات نامطلوب سیتوپلاسمی در آنها در شرایط In vivo می تواند توجیه کننده سرعت بالاتر تقسیم سلولی در این سلول ها باشد. سرعت بالاتر تقسیم جنین ها در شرایط In vivo در مقایسه با In vitro موید این نظریه است که سلول های پوششی لوله رحمی و رحم علاوه بر ایجاد شرایط متابولیک لازم برای رشد و تمایز جنین اولیه، احتمالا با تاثیرات القایی خود از طریق ترشح سیتوکین های مختلف این رشد و نمو را تنظیم

Archive of SID
www.SID.ir

می کنند. در تایید این نظر برخی محققان نشان دادند که با استفاده از سیستم کشت کمکی (Co-culture) به جای محیط های کشت ساده، می توان سرعت رشد و تقسیم سلولی در جنین های اولیه را افزایش داد بگونه ای که بلاستوسیست های حاصل از کشت در محیط Co-culture از لحاظ سرعت رشد و تعداد بلاستومر ها تفاوتی را با بلاستوسیست های بدست آمده از In vivo نشان نمی دهند (۱۹).

بر اساس یافته های این مطالعه می توان گفت که تا قبل از مرحله بلاستوسیست، نمی توان با معیارهای اندازه جنین و ضخامت پرده شفاف کیفیت جنین های رشد یافته در محیط آزمایشگاه را تعیین کرد، ولی در مرحله بلاستوسیست معیارهای اندازه جنین، ضخامت پرده شفاف و تعداد بلاستومرها می توانند تعیین کننده باشند. بر این اساس می توان گفت که جنین هایی که از اندازه بزرگتر، پرده شفاف نازکتر و بلاستومرهای بیشتری برخوردارند، احتمالا دارای کیفیت بالاتری نیز می باشند. همچنین سرعت رشد جنین می تواند معیاری قابل ملاحظه برای تعیین کیفیت جنین باشد؛ بگونه ای که جنین هایی که سریعتر به مرحله بلاستوسیست برسند احتمالا از کیفیت بهتری برخوردارند.

References

1. Kim DH, Ko DS, Lee HC, Lee HJ, Park WI, Kim SS, et al. Comparison of maturation, fertilization, development and gen expression of mouse oocytes grown in vitro and in vivo. J Assist Reprod Genet 2004; 21(7): 233-240.

2. Lan KC, Huang FJ, Lin YC, Kung FT, Hsieh CH, Huang HW, et al. The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo survival on day 5. Hum Reprod 2003; 18(6): 1299-1306.

3. Wright jr RW, Ellington J. Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. Theriogenol 1995; 44(8): 1167-1189.

4. Salamets A, Granskog CH, Suikkar AM, tutinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. Hum Reprod 2001; 16(10): 2177-2181.

5. Conaghan J, Hardy K, Handyside AH, Winston RM, Leese HJ. Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. J Assist Reprod Genet 1993; 10(1): 21-30.

6. Petersen CM, Mauri AL, Ferreira R, Baruffi RLR, Franco JG. Embryo selection by the first cleavage parameter between 25 and 27 hours after ICSI. J Assisst Reprod Genet 2001; 18(4): 211-214.

7. Van Montfoot APA, Dumoulin JCM, Kester ADM, Evers JLH. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. Hum Reprod 2004; 19(9): 2103-2108.

8. Milki AA, Hinckley MD, Gebheard J, Dasing D, Westphal LM, Bebr B. Accuracy of day-3 criteria for selecting the best embryos. Fertil Steril 2002 77: 1191-1195.

9. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Sharpiro BS. Quantitative grading of a

Archive of SID

www.SID.ir

human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. Fertil Steril 2002; 76(6): 1157-1167.

10. Kim DH, Kim MK, Lee HC, Ko DS, Park WI, Kwon HC, Lee HJ. Effect of partial laser assisted hatching on mouse embryos. Korean J Fertil Steril 2001; 28(2): 147-154.

11. Michael H, Friedrich S, Hendrik S , Franca R, Markus G , Dawit T, Danyel J , Ernst T, Josef G, Karl S. Bovine blastocyst diameter as a morphological tool to predict embryo cell counts, embryo sex, hatching ability and developmental characteristics after transfer to recipients. Reprod Fertil Develop 2006; 18(5): 551-557.

12.Linder GM, Wright RW. Morphological evaluation of bovine embryos. Theriogenol 1983; 20: 407-416.

13. Linder GM, Wright RW. Morphological aspects of the development of swine embryos in vitro. J Anim Sci 1978; 46: 711-716.

14. Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R. Development of hours embryos up to twenty-two days after ovulation: observation on fresh specimens**.** J Anat 1982; 135: 191-209.

15. Sakkas D, Batt PH, Cameron AWN. Development of preimplantation goat embryos in vivo and in vitro. J Reprod Fertil 1989; 87: 359-365.

16. Holm P, Booth PJ, Callesen H. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. Reprod 2002; 123: 553-565.

17. Pomar FJR, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B, Roelen BAJ. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. Theriogenol 2005; 63: 2254-2268.

18. Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural morphometry of bovine blastocyst produced in vivo or in vitro. Biol Reprod 2001; 64: 1375-1385.

19. Azadbakht M, Valojerdi MR, Mowla SJ. Development of mouse embryos co-cultured with polarized or non-polarized uterine epithelial cells using sequential culture media. Anim Reprod Sci 2007; 100: 141-157.

Archive of SID

www.SID.ir