غلبه بر کولاپس شدن بلاستوسیستها و بهبود تکوین جنینها در محیطهای کشت متوالی

حسین بهاروند M.Sc.[☆♦]، مجتبی رضا زاده ولوجردی Ph.D.[☆]

☆پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی و ناباروری

♦تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه پژوهشی، بالینی جنین شناسی

چکیده

* **هدف:** بهبود تکوین جنینهای تک سلولی موش تا مرحله بلاستوسیست و جلوگیری از کولاپس شدن بلاستوسیستهای آنها

* **مواد و روشها:** ۲۴ ساعت پس از تزریق هورمون کوریونی انسانی (hCG) جنینهای تک سلولی از موشهای دارای پلاک واژنی اخذ شده و پس از ساخت محیطهای کشت متوالی R_1 و R_2 و تهیه فیبروبلاست جنین موش و رده سلولهای vero، در شرایط ذیل کشت شدند:

آزمایش ۱ و۲: جنینهای تک سلولی موش ۴۸ ساعت در محیط R_1 کشت شده و سپس به محیط R_2 منتقل شدند، تا سه روز دیگر رشد یابند (گروه ۱) همچنین تعدادی از جنینهای تک سلولی موش ۴۸ ساعت در محیط R_1 به همراه رده سلولهای vero (گروه ۲) یا R_1 به همراه فیبروبلاستهای جنین موش (گروه ۳) کشت شده و سپس به محیط R_1 دارای سلولهای vero یا R_1 دارای فیبروبلاستهای جنین موش منتقل شدند تا سه روز دیگر رشد یابند.

آزمایش ۳ و ۴: جنینهای تک سلولی به مدت ۴۸ ساعت در R_1 کشت شده و سپس به R_1 حاوی vero (گروه ۴) یا R_2 حاوی فیبروبلاست جنین موش (گروه ۵) منتقل شدند تا سه روز دیگر رشد یابند.

آزمایش ۵: محیطهای R_2 که روی سلولهای vero یا فیبروبلاستهای جنین موش بمدت ۲۴ و ۴۸ ساعت Conditioned شده بودند تهیه شده و پس از عبور فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر در ۲۰°C- منجمد شدند. سپس جنینهای تک سلولی موش به مدت ۴۸ ساعت در R_1 و سپس به محیطهای Conditioned R_2 فوق منتقل شدند تا سه روز دیگر رشد یابند.

* **یافته‌ها:** مقایسه تکوین جنینها در روز پنجم در گروههای ۱ و ۲ و ۳ تفاوت معنی داری را نشان نداد و به ترتیب (۵۹ و ۵۴ و ۵۲ درصد) از جنینهای تک سلولی به هچینگ بلاستوسیست (در حال خروج از زوناپلوسیدا) یا بلاستوسیست هچ شده رسیدند (آزمایش ۱ و ۲) اما درصد بیشتری از جنینها در گروه (۴ و ۵) به مرحله هچینگ بلاستوسیست و یا بلاستوسیست هچ شده رسیدند (۷۱ و ۷۱ درصد) که هیچ کدام کولاپس نشده بودند (آزمایش ۳ و ۴) از طرفی افزودن محیط Conditioned-R_2 سبب بهبود هچینگ بلاستوسیستها و بلاستوسیستهای هچ شده نشد [(۲۴ و ۴۸ ساعته از vero ۴۷ و ۴۲ و ۳۱ و ۲۰ درصد فیبروبلاست (آزمایش ۵)].

* **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که در صورتی که جنینهای تک سلولی در ۴۸ ساعت اول تکوین در محیطهای کشت متوالی و پس از آن در محیطهای کشت متوالی همراه با هم کشتی، کشت یابند، درصد بیشتری از آنها به مرحله هچینگ بلاستوسیست یا بلاستوسیست هچ شده می‌رسند و محیطهای Conditioned در بهبود تکوین جنینها مؤثر نیستند.

گل واژگان: هم کشتی، کشت بلاستوسیست، محیطهای کشت متوالی، کولاپس شدن بلاستوسیست

نشریه پزشکی یاخته، سال سوم، زمستان ۸۰، شمارهٔ ۱۲، صفحات ۲۱۸-۲۰۹ تاریخ وصول: ۷۹/۱۰/۱۷، تاریخ پذیرش: ۸۰/۱۰/۳

مقدمه

به نظر می‌آید که با تقلید از شرایط in vivo و انتقال جنین در مراحل پیشرفته نظیر بلاستوسیست، میزان لانه گزینی افزایش می‌یابد. بطوریکه با انتقال بلاستو سیستها در دامها این افزایش به ۶۰ درصد می‌رسد (۱). در حالیکه با انتقال جنینهای چند سلولی ، میزان لانه‌گزینی بسیار کمتر است. گزارشات اخیر در مورد انسان نیز نشان می‌دهد که میزان لانه‌گزینی با انتقال بلاستوسیست افزایش می‌یابد (۵ - ۲).

از طرفی، کشت جنین تا مرحله بلاستوسیست مشکل می‌باشد، بطوریکه مشاهده شده است که با کشت جنین در محیطهای کشت رایج توان زیستی (viability) جنینهایا توان لانه‌گزینی آنها پس از انتقال به رحم کاهش می‌یابد (۶، ۷) علاوه بر این متابولیسم جنینها نیز در محیط کشت کم می‌شود (۸) بطوریکه ترن‌اور (turn over) پروتئینها شتاب گرفته و کیفیت سیستمهای انتقال متابولیتی آسیب می‌بیند (۹) و سرعت تکوین و تسهیم جنینها کاهش می‌یابد (۱۰، ۱۱). که گاه، نهایت این کاهش، توقف در تکوین جنین گونه‌های مختلف پستانداران در محیط آزمایشگاهی یا ایست تکوینی (develapmental block) می‌باشد (۱۲).

مشاهدات و نقایص مزبور در محیطهای کشت نشان می‌دهد که در شرایط کشت آزمایشگاهی نکته یا نکاتی را در نظر نگرفته‌ایم. برای رفع این عیوب روشهای مختلفی در پیش گرفته شده است. یک روش مهم هم کشتی (Co-culture) یا کشت همزمان جنین بر سلولهای سوماتیک است. بطور کلی و تاکنون هم کشتی در سه قالب استفاده از وزیکولهای تروفوبلاستی، جنین جوجه و تک لایه‌های سلولهای سوماتیکی (۱۳) مانند رده‌های سلولهای با منشاء غیر دستگاه تولید مثلی همچون سلولهای تجاری vero (سلولهای کلیه میمون سبز آفریقایی) (۱۴)، MDBK (سلولهای کلیه گاو) (۱۵) فیبروبلاستهای جنین موش (۱۶) و یا سلولهای کشت اولیه primary) (culture با منشأ از دستگاه تولید مثلی مانند سلولهای گرانولوزا (۱۷)، رحم (۱۸) و اویداکت (۱۹، ۲۰) انجام شده است. تقریباً در تمام این روشها، هم کشتی، سبب بهبود تکوین جنینها نسبت به محیط کشت گروه کنترل شده است و علاوه بر این سرعت تسهیم و توان لانه‌گزینی جنینها افزایش می‌یابد.

روش مهم دیگر که اخیراً رواج یافته است ، استفاده از محیطهای کشت متوالی (sequential culture media) است که بر اساس نیازهای جنین در مراحل مختلف تکوین آن و همچنین تغییر متابولیتهای مسیر تولید مثلی ماده تهیه می‌شوند. به عنوان مثال غلظت گلوکز از اویداکت به سوی رحم افزایش می‌یابد، در حالی که غلظت پیروات و لاکتات به موازات آن کاهش می‌یابد (۲۱، ۲۲) و در این مسیر جنین برای تأمین انرژی تا قبل از مرحله ۸ سلولی - مورولا، بیشتر از چرخه کربس به عنوان مرحله تامین انرژی استفاده می‌کند و از آن زمان به بعد از گلیکولیز هم استفاده خواهد کرد (۲۳). از طرفی بکارگیری اسیدهای آمینه غیر ضروری ایگل (Eagle) تا مرحله ۸ سلولی - مورولا در محیط کشت و استفاده از همه اسیدهای آمینه از آن مرحله به بعد سبب افزایش توان لانه گزینی جنینها پس از انتقال به رحم می‌گردد (۲۴).

بر همین اساس نیز محیطهای $G_{1.2}$ و $G_{2.2}$ به عنوان محیطهای کشت متوالی طرح ریزی شدند و محیطهای R_1 و R_2 معادلهای آنها می‌باشند (۲۵). محیط، G_1/R_1 دارای گلوکز کم، پیروات و لاکتات زیاد، اتیلن دای آمین تترا استیک اسید (EDTA) اسیدهای آمینه غیر ضروری ایگل و گلوتامین است و برای ۴۸ ساعت اولیه کشت جنین به کار می‌روند. در مقابل محیط $G2/R_2$ دارای گلوکز زیاد، پیروات و لاکتات کم و همه اسیدهای آمینه و ویتامینهای ایگل هستند که برای کشت جنین از مرحله ۸ سلولی به بعد به کار می‌روند. با استفاده از این محیطها گزارش شده است که بیش از ۴۰ درصد جنینهای انسانی به مرحله بلاستوسیست می‌رسند و میزان لانه گزینی انتقال بلاستوسیست به ۲۵- ۲۰ درصد می‌رسد. این در حالی است که با انتقال جنینهای در حال تسهیم به رحم مادران، میزان لانه گزینی ۷ درصد گزارش شده است (۵ - ۲).

یکی از مشکلات این محیطها آن است که جنینها در مرحله بلاستوسیست کولاپس می‌شوند (۲۵، ۲۶). در فرآیند کولاپس شدن، حفره بلاستوسل از بین رفته یا کوچک می‌شوند و جنین در مرکز زوناپلوسیدا جمع می‌شود ، هچینگ بلاستوسیستها یا بلاستوسیستهای در حال خروج از زوناپلوسیدا به داخل زوناپلوسیدا برمی‌گردند. در این فرآیند، ظاهر بلاستوسیست شبیه مورولای متراکم شده است، این در حالی است که در روز چهارم کشت جنینهای تک سلولی، بلاستوسیستها سالم هستند. اما با یک روز کشت بیشتر در روز پنجم کولاپس می‌شوند. اغلب بلاستوسیستهای کولاپس در ادامه رشد در روزهای دیگر دژنره می‌شوند و بنابراین، فرآیند مزبور در اغلب موارد برگشت‌ناپذیر است. این در حالی است که کولاپس شدن بلاستوسیست به ندرت در محیط کشت ساده T6 در روز پنجم مشاهده می‌شود. یک راه برای بهبود نتایج کشت جنین تابلاستوسیست، تلفیق دو روش هم‌کشتی و محیطهای کشت متوالی است که توسط Bongso (1998) و Fong (۲۷) انجام گردید و بیان شد که نتایج حاصل از تلفیق این دو روش با نتایج استفاده از محیط کشت متوالی برابراست. در حال حاضر به نظر می‌آید از آنجا که محیط اول کشتهای متوالی (R_1 یا G_1) محیطی ساده می‌باشد و محیطی مناسب برای کشت همزمان سلولهاو یا جنین نیست شاید بهتر است که در ابتدا جنینها برای مدت ۴۸ ساعت اول در R_1 یا G_1 کشت شوند و سپس جنینها به محیط کمپلکس که به نظر می‌آید بدلیل داشتن کربوهیدراتها، همهٔ اسیدهای آمینه و ویتامینهای ایگل مناسب کشت سلولها و جنین است منتقل شوند تا مشخص شود که آیا این روش بر تلفیق همزمان محیطهای کشت متوالی و هم‌کشتی برتری دارد.

مواد و روشها

ساخت محیطهای کشت متوالی R_1 و R_2

ساخت محیطهای کشت متوالی بر اساس مطالعه (۲۵) قبلی بود.

* تحریک تخمک‌گذاری

جنینها از موشهای ماده (NMRI با سن ۱۲-۱۰ هفته به‌دست آمدند.

به این ترتیب که تخمدان موشهای ماده، در ساعت ۱۲-۱۱ با تزریق ۹ iu هورمون منوپوز انسانی (HMG, Organon) تحریک شدند. پس از ۴۸ ساعت به همان موشها ۹iu هورمون کوریونی انسانی (hCG, Organon) تزریق گردید و به‌صورت تکی و یا دوتایی در کنار یک موش نر قرار داده شدند. صبح روز بعد پلاک واژنی در موش ماده نمایانگر انجام نر جفت‌گیری بود.

* تهیه جنینهای تک سلولی

۲۵-۲۴ ساعت پس از تزریق hCG اویداکت موشها از بدنشان بیرون آورده شده و با تزریق محیط کشت R_1 به داخل آنها (عمل فلاشینگ، flushing)، جنینهای تک سلولی از سوی دیگر خارج گردیدند. سپس تمام جنینهای تک سلولی در یک قطره جمع شده و بطور تصادفی و به تعداد تقریباً برابر در قطره‌های حاوی محیط کشت توزیع شدند.

* تهیه تک لایه های سلولی vero و ریز قطره‌های حاوی آنها

رده سلولهای vero به صورت منجمد از انستیتوپاستور ایران تهیه شدند. در ابتدا ویال حاوی سلول ذوب شده (دمای ۳۷°C) و سپس دو بار با محیط کشت DMEM/Ham´s F-12 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) (Gibco) شستشو شدند و در فلاسک کشت ۲۵cm² کشت گردیدند. ۴-۳ روز بعد، سلولها، کف ظرف را پوشاندند. بدنبال آن و پس از حذف محیط کشت، به فلاسک، ۳ml آنزیم تریپسین /EDTA (Gibco, ۰/۲g / ۰/۵g) افزوده شد. باکنده شدن سلولها از کف ظرف به آن DMEM/Ham´s F-12+ ۱۰% FCS اضافه گردید و پس از دو بار شستشوی سلولها فطراتی (حدود ۵۰ میکرولیتر) و حاوی حدود ۱۰۰۰ سلول در کف پتری دیش (Falcon) گذاشته شد. ۳-۲ روز بعد اغلب کف قطره توسط سلولها اشغال شده و آماده هم کشتی با جنینها بود. تعداد چهار subculture از هر فلاسک برای هم کشتی مناسب است و بدنبال چهارمین subculture لازم است که سلولها را منجمد کرده و بعد از انجماد مورد استفاده قرار داد (۲۸). لازم به ذکر است که روی قطره‌ها روغن معدنی (Merk,d= ۰/۸۸ g/ml) ریخته می شد و روز قبل از هم کشتی محیط کشت قطره‌ها با R_2 یا R_1 عوض می‌شد.

* تهیه تک لایه‌های فیبروبلاستهای جنینهای موشی و قطره‌های حاوی آنها

تهیه فیبروبلاستهای جنینهای موش بر اساس روش Hogan و همکاران (۲۹) انجام شد که به شرح زیر است:

به موشهای ماده باسن ۱۲ - ۱۰ هفته ،۹iu هورمون HMG و پس از ۴۸ ساعت ۹ iu هورمون hCG تزریق گردید و با موشهای نر جفت گذاشته شدند. روز بعد وجود پلاک واژنی بیانگر انجام عمل جفت‌گیری بود و روز صفر محسوب شد. ۱۳/۵ روز بعد موشهای حامله به روش نخاعی کردن کشته شده و جنینهای آنها از رحم خارج شدند و در یک پتری دیش ۱۰ سانتیمتری حاوی محیط کشت DMEM/ Ham´s F-12 (sigma) بدون سرم گذاشته شدند. سپس باکمک تیغ جراحی اندامهای حرکتی و سر قطع گردید و اندامهای داخلی خارج شدند. باقیمانده جنینها در لوله استریل ۱۰ ml حاوی محیط کشت DMEM/Ham´s F-12 ریخته شده و چند بار شستشو داده شدند. بدنبال آن جنینها به پتری دیش ۱۰ سانتیمتری منتقل شده و باکمک تیغ جراحی ، قطعه قطعه شدند. مخلوط مزبور به لوله حاوی ۶ ml تریپسین /EDTA (اتیلن دای آمین ترا استیک اسید) (۰/۵ g / ۰/۲ g Gibco) محلول در محلول بافر فسفات (PBS) فاقد کلسیم و منیزیم منتقل شدند. مجموعه فوق بر یک شیکر گذاشته شده (دمای ۳۷° سانتیگراد) و پس از ۱۰ دقیقه ۲ ml از مخلوط روئی برداشته شد و به جای آن ۲ ml تریپسین /EDTA به لوله حاوی بافتهای جنینی اضافه گردید. ۲ ml مخلوط روئی در لوله‌ای دیگر ریخته شده و هم حجم آن DMEM/Ham s F-12 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) (Gibco) اضافه شد. این عمل چند بار دیگر (۴ بار) انجام شد و سپس لوله حاوی مخلوطهای روئی جمع آوری شده ، سانتریفوژ گردید (۱۵۰۰ دور بر دقیقه) و یک بار دیگر در محیط حاوی ۱۰ درصد FCS شستشو شد. پس از تهیه سوسپانسیونی از سلولها در محیط (DMEM/Ham´s F-12 + ۱۰ درصد FCS)، سلولها در فلاسک ۲۵ cm² (Falcon) ریخته شدند. روز بعد محیط کشت تعویض شده و این عمل به صورت یک روز در میان انجام شد تا آنکه سلولها کف ظرف را بپوشانند. سپس subcultare باکمک آنزیم تریپسین /EDTA انجام گردید. سلولهای دیگری نیز غیر از سلولهای فیبروبلاستی در کشتهای اولیه دیده می‌شوند، اما این سلولها در subcultare ابقاء نمی‌شوند.

تهیه ریز قطره‌های حاوی این سلولها مانند ریز قطره‌های حاوی سلولهای vero بود.

* انجماد و ذوب سلولهای vero و فیبر و بلاستهای جنین موش

پس از کنده شدن سلولها از کف ظرف توسط تریپسین /EDTA با محیط DMEM/Ham´s F-12+ ۱۰% FCS دو بار شستشو شدند (۱۵۰۰ دور بر دقیقه) و سپس در ضد یخ دای متیل سولفوکسید (DMSO) و FCS به نسبت (۹FCS: ۱DMSO) سوسپانسیون گردیدند پس از تقسیم سلولها در ویالهای انجماد (Nunc)، آنها را به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰°C- گذاشته و بعد به داخل نیتروژن مایع منتقل شدند.

* تهیه محیطهای R_2 conditioned سلولهای vero و فیبربلاستی جنین موش

با پر شدن کف فلاسکهای ۲۵ cm² از سلولهای vero یا فیروبلاستی جنین موش محیط روئی تخلیه شده و در هر فلاسک ml ۳ محیط تازه R_2 ریخته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت محیطهای R_2 conditioned از فلاسکهای متفاوت برداشته شد. دبریهای سلولی محیط مزبور با عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر

(millipore) گرفته شده و پس از قسمت کردن نمونه‌ها (aliqute)، آنها را منجمد کرده و در °۲۰- سانتیگراد نگهداری شدند. روز قبل از کشت جنین ، یک نمونه از آنها بر کف بطری دیش (Falcon) گذاشته شده و روی آن روغن معدنی (g/ml ۰/۸۸ =d. Merk) ریخته شده و در انکوباتور مرطوب °۳۷ سانتیگراد و دارای ۵ درصد گاز کربنیک گذاشته شد.

* کشت جنینهای تک سلولی در گروههای مختلف

آزمایش ۱: جنینهای تک سلولی موش به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت R_1 کشت شده و سپس به محیط کشت R_2 منتقل شدند تا سه روز دیگر رشد یابند (گروه ۱).

آزمایش ۲: جنینهای تک سلولی موش ۴۸ ساعت در محیط کشت R_1 به همراه رده سلولهای vero (گروه ۲) یا R_2 به همراه فیبروبلاستهای جنین‌های موشی (گروه ۳) کشت شده و سپس به محیط R_2 دارای سلولهای vero یا R_2 دارای فیبروبلاستهای جنین موش منتقل شدند تا سه روز دیگر رشد یابند.

آزمایش ۳: جنینهای تک سلولی موش به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت R_1 تنها کشت شد. و سپس به محیط کشت R_2 حاوی سلولهای vero (گروه ۴) یا R_2 حاوی فیبروبلاستهای جنین موش (گروه ۵) منتقل شدند تا سه روز دیگر رشد یابند.

آزمایش ۴: جنینهای تک سلولی موش به مدت ۴۸ ساعت در R_1 و سپس به محیطهای Conditioned R_2 سلولهای veroیی یا فیبروبلاستی که به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت Conditioned شده بودند منتقل شدند تا سه روز دیگر رشد یابند.

* ارزیابی جنینها

ارزیابی جنینها به طور ۲۴ ساعته و به مدت ۵-۴ روز با میکروسکوپ اینورت (Wilovert, Hund) و بزرگنمایی ۱۰× انجام شد. جنینها بر اساس موارد ذیل دسته بندی شدند: جنینهای ۸ سلولی؛ جنینهای ۸-۵ سلولی جزء این دسته قرار می‌گرفتند، مورولا: جنینهای متراکم شده (compacted) که فاقد حفره بلاستوسل بودند، بلاستوسیست؛ جنینهایی که دارای حفره بلاستوسل بودند (اندازه حفره مهم نبود و این حفره می‌توانست کوچک و یا بزرگ باشد). بلاستوسیست گسترش یافته (expanded): بلاستوسیستی بود که بلاستوسل در کل جنین محاط بود و اندازه جنین نسبت به حالتهای قبلی بزرگتر شده بود. هچینگ بلاستوسیست، بلاستوسیستهایی بودند که دارای بیرون زدگی واضحی از زوناپلوسیدا بودند. بلاستوسیستهای هچ شده؛ بلاستوسیستهایی بودند که به طور کامل از زوناپلوسیدا خارج شده بودند. بلاستوسیستهای کولاپس؛ بلاستوسیستهایی بودند که ساختار بلاستوسیستی آنها فرو ریخته بود، بلاستوسل از بین رفته و یا در حال از بین رفتن بود و سلولها در مرکز جمع شده بودند و یا هچینگ بلاستوسیستهایی بودند که علیرغم پاره کردن بخشی از زوناپلوسیدا به داخل زوناپلوسیدا برگشته بودند. ظاهر این بلاستوسیستها شبیه مورولای متراکم است.

* تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه میزان تکوین جنینها در روزهای مختلف با آزمون مربع کای و فیشر انجام گردید.

یافته‌ها

* مقایسه تکوین جنینها در گروههای هم کشتی و کنترل

مقایسه تکوین جنینها در گروههای هم کشتی و کنترل در جدول ۱ آمده است. مقایسه تکوین جنینها طی دو روز اول کشت در محیط R_1 نشان داد که میزان تکوین جنینها به مورولا یا مورولا + جنینهای هشت سلولی در R_1 به R_2 (گروه۱) [(R_1+vero) به (R_2+vero) (گروه ۲)]، [(فیبروبلاست +R_1) به (فیبروبلاست + R_2)(گروه۳)]، [به (R_1 + veroR_2) (گروه۴)]، [R_1 به (فیبروبلاست + R_2) (گروه ۵)]، اختلاف معنی داری وجود ندارد. به همین ترتیب مشاهده گردید که اگر جنینها پس از ۴۸ ساعت به R_2 (گروه ۱) یا R_2 به همراه سلولهای vero (گروههای ۲و۴) یا R_2 به همراه سلولهای فیبروبلاست (گروه ۳و۵) کشت شوند ، در روز سوم کشت در صد مشابهی از جنینها به بلاستوسیست یا بلاستوسیست به علاوه مورولا می‌رسند.

در روز چهارم کشت نیز درصد هچینگ بلاستوسیستها (HgB) یا مجموع HgB و بلاستوسیست متسع (ExB) در هر پنج گروه تفاوت معنی داری نداشت. اما در روز پنجم کشت مشاهده شد که ۵۹ درصد از جنینها در گروه R_2 تنها (گروه۱) به مرحله هچینگ بلاستوسیست یا بلاستوسیست هچ شده رسیدند که از این تعداد ۴۴ درصد کولاپس شده بودند و تنها ۱۵ درصد ظاهری طبیعی داشتند (دارای حفره بلاستوسل و در حال خروج از زوناپلوسیدا بودند). این در حالی بود که در گروه R_1 به (R_2 دارای سلولهای vero) (گروه ۴) یا(R_2 دارای فیبروبلاست جنین موش) (گروه۵) به ترتیب ۷۱ و ۷۲ درصد جنینها به مرحله هچینگ بلاستوسیست یا بلاستوسیست هچ شده رسیدند و هیچکدام از بلاستوسیستها کولاپس نشدند ($P< 0.001$). در گروههای (R_2 دارای vero) یا (R_1 دارای فیبرلاست) (گروه۲و۳) نیز در صد مجموع بلاستوسیستهای هچ شده و هچینگ به ترتیب ۵۴ و ۵۲ درصد بود که از گروههای ۴ و ۵ کمتر بود. ($P< 0.001$ در مقایسه با گروه ۴ و ۵) اما در این گروهها نیز بلاستوسیست کولاپس شده مشاهده نشد.

مقایسه تکوین جنینها در گروههای ۲ و ۳ نیز طی ۵ روز کشت اختلاف معنی داری را نشان نداد.

* مقایسه تکوین جنینها در محیطهای Conditioned R_2 متفاوت

مقایسه تکوین جنینها در R_1 (در ۴۸ ساعت اول) و پس از انتقال به ConditionedR$_2$ ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته vero (گروه۱و۲) وفیبروبلاست (گروه ۳و۴) در جدول ۲ نشان داده شده است. تکوین جنینها در ۴۸ ساعت اول کشت در محیط R_1 در گروههای مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. پس از انتقال جنینها به Conditioned

جدول ۱: تکوین جنینها در گروههای هم‌کشتی و کنترل

گروه	تکرار	۰ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		۱۲۰ ساعت	
		۱سلولی	۲سلولی	M	M+۸سلولی	B	M+B	HgB	ExB+HgB	HgB+HdB	ExB+HB
۱	۵	۶۱	۶۰	۳۲(۵۳)	۴۲(۶۹)	۲۷(۴۴)	۵۲(۸۵)	۲۱(۳۵)	۴۶(۷۵)	۹(۱۵)+ ۲۷c(۴۴)= ۳۶(۵۹)	
۲	۴	۴۴	۴۲	۱۸(۴۰)	۲۹(۶۷)	۱۸(۴۰)	۳۸(۸۶)	۱۸(۴۱)	۳۱(۷۰)	۲۴(۵۴)	
۳	۴	۴۶	۴۵	۱۸(۳۹)	۲۸(۶۱)	۲۰(۴۳)	۳۹(۸۵)	۱۶(۳۴)	۳۳(۷۱)	۲۴(۵۲)	
۴	۱۱	۱۳۸	۱۳۶	۵۸(۴۲)	۸۲(۵۹)	۴۳(۳۱)	۱۲۱(۸۸)	۵۲(۳۸)	۱۰۱(۷۳)	۹۸(۷۱)	
۵	۶	۵۶	۵۶	۲۴(۴۳)	۳۷(۶۶)	۱۷(۳۰)	۵۱(۹۱)	۲۳(۴۱)	۴۳(۷۷)	۴۰(۷۱)	

مقادیر داخل پرانتز نشانهنده درصد است

c: کولاپس شده یا در حال کولاپس، M: مورولا، B: بلاستوسیست، HgB: هچینگ بلاستوسیست، HdB: بلاستوسیست هچ شده، ExB: بلاستوسیست متسع، گروه ۱: R_1به R_2، گروه ۲: R_1+vero به R_2+vero، گروه ۳: فیبروبلاست+R_1 به فیبروبلاست + R_2، گروه ۴: R_1 به R_2+vero، گروه ۵: R_1 به فیبروبلاست + R_2

جدول ۲: تکوین جنینها در محیطهای conditioned R_2 متفاوت

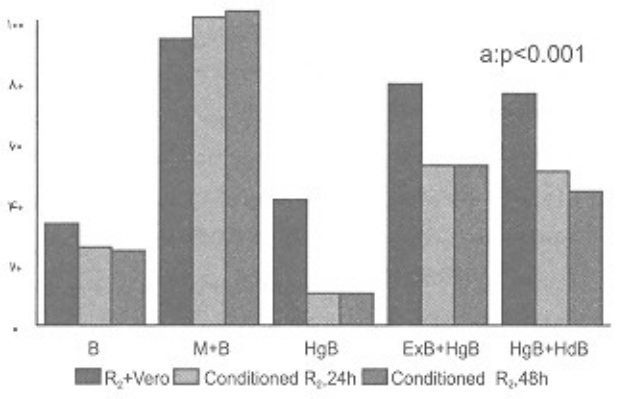
گروه	تکرار	۰ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		۱۲۰ ساعت	
		۱سلولی	۲سلولی	M	M+۸سلولی	B	M+B	HgB	ExB+HgB	HgB+HdB	ExB+HB
۱	۵	۶۱	۶۰	۳۲(۵۳)	۴۲(۶۹)	۲۷(۴۴)	۵۲(۸۵)	۲۱(۳۵)	۴۶(۷۵)	۹(۱۵)+ ۲۷c(۴۴)= ۳۶(۵۹)	
۲	۴	۴۴	۴۲	۱۸(۴۰)	۲۹(۶۷)	۱۸(۴۰)	۳۸(۸۶)	۱۸(۴۱)	۳۱(۷۰)	۲۴(۵۴)	
۳	۴	۴۶	۴۵	۱۸(۳۹)	۲۸(۶۱)	۲۰(۴۳)	۳۹(۸۵)	۱۶(۳۴)	۳۳(۷۱)	۲۴(۵۲)	
۴	۱۱	۱۳۸	۱۳۶	۵۸(۴۲)	۸۲(۵۹)	۴۳(۳۱)	۱۲۱(۸۸)	۵۲(۳۸)	۱۰۱(۷۳)	۹۸(۷۱)	
۵	۶	۵۶	۵۶	۲۴(۴۳)	۳۷(۶۶)	۱۷(۳۰)	۵۱(۹۱)	۲۳(۴۱)	۴۳(۷۷)	۴۰(۷۱)	

مقادیر داخل پرانتز نشانهنده درصد است

c: کولاپس شده یا در حال کولاپس، M: مورولا، B: بلاستوسیست، HgB: هچینگ بلاستوسیست، HdB: بلاستوسیست هچ شده، ExB: بلاستوسیست متسع گروه ۱: R_1به R_2 conditioned ۲۴ ساعته vero گروه ۲: $R_1$2 به R_2 conditioned ۴۸ ساعته vero گروه ۳: R_1 به R_2 conditioned ۲۴ ساعته فیبروبلاست گروه ۴: R_1 به R_2 conditioned ۴۸ ساعته فیبروبلاست

R2 باز هم اختلاف معنی داری در تکوین جنینها در روز سوم در رسیدن به بلاستوسیست (B) یا مجموع مورولا و بلاستوسیست (M+B)مشاهده نمی‌شود. در روز چهارم اختلافی در هچینگ بلاستوسیستها (HgB) و مجموع هچینگ بلاستوسیستها و بلاستوسیستهای متسع مشاهده نمی‌گردد.

به همین ترتیب در روز پنجم مجموع بلاستوسیستهای هچ شده (HdB) و هچینگ (HgB) در گروه چهارم کمتر از گروههای ۱ و ۲ می‌باشد ($P < 0.001$ در مقایسه باگروه ۱، $P < 0.01$ در مقایسه باگروه ۲). همچنین میزان HgB+HdB در روز پنجم بین گروههای R2 conditioned ۲۴ ساعته veroیی (گروه ۱) و ۲۴ ساعته فیبروبلاستی (گروه ۳) تفاوت معنی‌داری را داشت (به ترتیب ۴۷ درصد در مقابل ۳۱ درصد، $P < 0.05$) ولی تفاوتی در HgB+HdB روز پنجم گروه ۲ و ۳ مشاهده نشد (۴۲ درصد در مقابل ۳۱ درصد). در عین حال میزان بلاستوسیستهای سالم در روز پنجم در R_1 conditioned مربوط به سلولهای vero بیش از R_2 conditioned مربوط به فیبروبلاست است [۲۴ ساعته ۳۴ درصد در مقابل ۷ درصد ($P < 0.001$) ، ۴۸ ساعته ۲۶ درصد در مقابل ۳ درصد ($P < 0.001$)].



نمودار ۱: مقایسه تکوین جنینها در گروههای conditioned R_2-24h,R_2+vero conditioned R_2-48h

این مقایسه نشان می‌دهد که در روز اول انتقال جنینها به R_2 اختلاف معنی داری در تکوین جنینها (بلاستوسیستها یا مجموع بلاستوسیستها و مورولاها) وجود ندارد. اما باگذشت ۴۸ ساعت از انتقال جنینها، در صد زیادی از جنینها درگروه R_2 هم‌کشتی به HgB یا ExB+HgB رسیدند و در روز سوم انتقال جنینها به گروههای مختلف با در صد زیادتری از جنینها درگروه R_2+vero در مقایسه باconditioned R2 ۲۴ ساعته یا ۴۸ ساعته به HgB+HdB رسیدند (۷۱ درصد در مقابل ۴۷ و ۴۲ درصد $P < 0/001$). این در حالی است که در روز پنجم در گروه هم

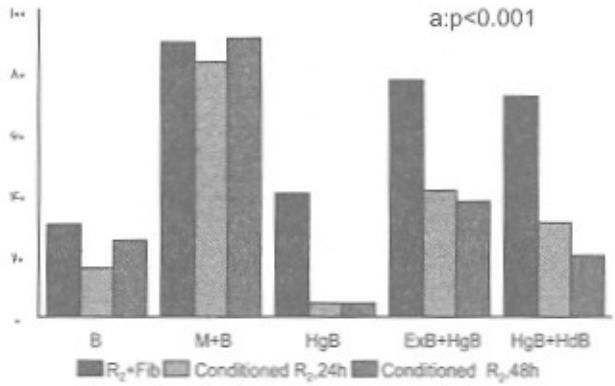
* مقایسه تکوین جنینها در گروه هم کشتی veroیی و conditioned R_2 ۲۴ و ۴۸ ساعته

مقایسه تکوین جنینها درگروههای هم کشتی veroیی R_1 conditioned ۲۴ و ۴۸ ساعته در نمودار ۱ آمده است.

کشتی بلاستوسیست کولاپس شده نداشتیم ولی در گروههای conditioned R2 ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته به ترتیب ۱۳ و ۱۶ درصد از جنینها کولاپس شدند ($P< 0.001$).

* مقایسه تکوین جنینها در گروه هم کشتی فیبروبلاستی و conditioned R2 ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته

مقایسه تکوین جنینها در گروه هم کشتی فیبروبلاستهای جنین موش (گروه ۱) و Conditioned R_2 ۲۴ ساعته (گروه۲) و ۴۸ ساعته (گروه۳) سلولهای مزبور در نمودار۲ آمده است.



نمودار ۲: مقایسه تکوین جنینها در گروههای فیبروبلاست+R_2، Conditioned R_2-24h، Coditioned R_2-48h

این مقایسه نشان می‌دهد که ۲۴ ساعت پس از انتقال جنینها به گروههای ۱ و ۲ و ۳ اختلاف معنی داری در رسیدن جنینها به بلاستوسیست (B) یا بلاستوسیست و مورولا (B+M) مشاهده نمی‌شود. پس از گذشت ۴۸ ساعت درصد زیادی از جنینها در گروه ۱ به هچینگ بلاستوسیست رسیدند [۴۱ درصد در مقابل ۵ درصد (گروه۲)، و ۳ درصد (گروه ۳)، $P< 0.001$]. در همان زمان نیز مجموع هچینگ بلاستوسیستها و بلاستوسیستهای متسع (ExB+HgB) در گروه ۱ از دو گروه دیگر بیشتر بود [۷۷ درصد در مقابل ۴۱ درصد (گروه۲) و ۳۹ درصد (گروه۳) $P< 0.001$] در روز سوم پس از انتقال جنینها به گروههای مذکور اولاً در صد بیشتری از جنینها در گروه ۱ به مرحله هچینگ بلاستوسیست یا بلاستوسیست هچ شده رسیدند [(HgB+HgB) ۷۱ درصد در مقابل ۳۱ درصد (گروه ۲) و ۲۰ درصد (گروه ۳)، $P< 0.001$] و ثانیاً هیچکدام از بلاستوسیستها در گروه۱، کولاپس نشدند ولی در همان زمان ۲۴ درصد و ۱۷ درصد HgB+HdB در گروه ۲و۳ کولاپس گردیدند ($P< 0.001$)].

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بلاستوسیست ، هچینگ بلاستوسیست و بلاستوسیستهای هچ شده، بین دو سیستم محیطهای کشت متوالی R_2 و R_1 و تلفیق (vero و R_1) یا (فیبروبلاست و R_1) و سپس انتقال جنینها به (R_2+vero) یا (فیبروبلاست+R_2) تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. این نتایج با تجربه انجام شده توسط Bongso و Fong (۲۷) مطابقت دارد. ایشان با کشت جنینهای انسانی در محیطهای کشت متوالی S_2 و S_1 و مقایسه نتایج آن با تکوین جنینها در محیطهای کشت متوالی مزبور همراه با رده سلولی vero گزارش کردند که در هر دو حالت میزان تشکیل بلاستوسیستها و تعداد بلاستومر آنها تقریباً برابر است.

از سوی دیگر در مطالعهٔ حاضر دیده شد که در صد زیادی (۴۴ درصد) از هچینگ بلاستوسیستها و بلاستوسیستهای هچ شده در روز پنجم کشت در محیط R_2 کولاپس شدند. این رخداد در کشت جنینهای موشی در محیط کشت متوالی $G_{1,1}$ و $G_{2,2}$ تجاری (IVF Scanvinavian Science Sweden) نیز مشاهده شد (۲۵) که بیانگر آنست که هنوز هم محیطهای کشت متوالی موجود بطور کامل توانائی و پویایی لازم در تکوین جنین در محیط آزمایشگاهی را ندارند (۳۰). طی فرآیند کولاپس شدن ، هچینگ بلاستوسیستها یا بلاستوسیستهای در حال خروج از زوناپلوسیدا به داخل زوناپلوسیدا برگشتند و حفره بلاستوسل کوچک شده و گاه بطور کامل از بین می‌رفت و در نهایت بلاستومرها شروع به استحاله (degeneration) می‌کردند. این در حالی بودکه در گروههای هم کشتی (سلول سوماتیک +R_1) و (سلول سوماتیک + R_2) رخداد مزبور مشاهده نشد.

فرآیند کولاپس شدن می‌تواند با مجموعه اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری در محیط کشت R_2 در ارتباط باشد (۲۶) به طوری که ممکن است یک یا چند اسید آمینه در غلظت ایگل مورد استفاده مضر باشند و بنابراین اثرات مفید سایر اسیدهای آمینه پوشانده (mask) شود ممکن است که بعضی از اسیدهای آمینه سمی باشند (۳۴ - ۳۱) و حتی اگر هم چنین نباشند، ممکن است که برای یک سیستم انتقالی با هم رقابت کنند و جذب سایر اسیدهای آمینه مورد نیاز جنین را متوقف کنند (۳۹ - ۳۵) و بدین ترتیب با انباشته شدن یک یا چند اسید آمینه در جنین سبب ممانعت از تکوین جنین شوند.

از سوئی به نظر می‌رسد که منبع ماکرومولکولی افزودنی به محیط کشت در فرآیند کولاپس شدن بلاستوسیستها مؤثر باشد بطوریکه مشاهده شده که اگر در R_1 و R_2 از آلبومین سرم گاوی فراکسیون V فاقد اسیدهای چرب استفاده شود، میزان کولاپس شدن بلاستوسیستها بطورقابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (۲۶) زیرا بعضی از منابع ماکرومولکولی سمی هستند (۴۰، ۴۱).

با این احوال، وقتی که پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت جنینهای تک سلولی، جنینها از R_1 تنها به R_2 همراه با تک لایهٔ سلولهای vero یا فیبروبلاست جنین موشی منتقل شدند، در صد زیادی از جنینها به مرحله هچینگ بلاستوسیست یا بلاستوسیست هچ شده رسیدند (۷۱ و۷۱ درصد)، در ضمن آنکه در این شرایط بلاستوسیست کولاپس شده وجود نداشت. اثر مثبت هر دو نوع سلول و این نکته که از گونه‌های مختلف جانوری استخراج شده‌اند، بیانگر آن است که سیستمهای هم کشتی به گونه جانوری و یا به نوع سلول خاص بستگی نداردو البته باید توجه داشت که ممکن است بعضی سلولها بر بعضی سلولهای دیگر ارجح

لازم به ذکر است که برتری این روش در آن است که در صد زیادی از جنینها به مرحله هچینگ بلاستوسیست یا بلاستوسیست هچ شده رسیدند، بدون آنکه بلاستوسیستی کولاپس شود و این میزان بیشتر از میزانی است که با استفاده از محیطهای کشت متوالی و یا به همراه هم با سلولهای سوماتیک دیگر (فیبروبلاست یا vero) به دست آمد.

همچنین مقایسه این روش با تحقیقات محققین دیگر (۴۳) نشان می‌دهد که میزان تکوین جنینها بسیار بهبود یافته است. قبلاً نیز تاثیر مثبت سلولهای vero و فیبروبلاستی جنین موش در محیطهای رایج گزارش شده است (۱۴، ۱۶، ۲۸، ۴۴، ۴۵). بطوریکه دیده شده است که جنینهای هم کشتی شده با vero یا فیبروبلاست جنین موش دارای بلاستوسیست و تعداد بلاستومر بیشتری بوده و همچنین Fragmentation آنها کمتر از جنینهای کشت یافته در محیطهای متداول است.

Wetzels و همکارانش (۴۶، ۴۷) نیز با بکارگیری سلولهای فیبرویلاستی جنین انسان بر جنینهای موش اثر مثبتی را در غلبه بر ایست تکوینی نشان داده بودند. علاوه بر این گزارش کردند که جنین نژادهای موشی که فاقد ایست تکوینی هستند پس از هم کشتی دارای تعداد سلول بیشتر، متابولیسم اسید آمینه‌ای و پتانسیل هچینگ بیشتری هستند اما محققان یاد شده در مطالعه‌ای دیگر گزارش کردند که با هم کشتی جنینهای انسانی کیفیت تکوین و لانه گزینی تغییر نمی‌یابد (۴۸). احتمال دارد که در این زمینه مکانیسمهای متفاوتی وجود داشته باشد.

Menezo و همکارانش نیز با استفاده از هم کشتی سلولهای vero میزان بلاستوسیستهای انسانی بیشتری در مقایسه باکنترل بدست آوردند (۲۸). در هم کشتی جنینهای گاو با فیبروبلاستهای جنین موش نیز درصد بلاستوسیست بیشتری بدست آمد (۱۶، ۴۴).

یک مشکل مهم طی هم کشتی آنست که محیط کشت باید هم مناسب تکوین جنین و هم مناسب رشد سلولها باشد که توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است (۴۹، ۵۰) در این مطالعه در ۴۸ ساعت اول کشت از محیط R_1 و در ۷۲ ساعت دیگر کشت از R_2 به همراه سلولهای سوماتیک استفاده شد.

این محیطها به عنوان محیطهای کشت متوالی و مخصوص تکوین جنین ساخته شده‌اند به طوریکه با استفاده از معادلهای تجاری آنها($G_{2.2}$ و $G_{1.1}$) میزان بلاستوسیست و لانه گزینی جنینها پس از انتقال به رحم افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابد. از سوی دیگر محیط R_2 یا $G_{2.2}$ به عنوان محیطهای کمپلکسی که دارای نمکها ، کربوهیدرانها، اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری و ویتامینهای ایگل می‌باشند می‌توانند برای کشت سلولها نیز مورد استفاده واقع شوند. اما به نظر می‌آید که محیط R_1 یا $G_{1.2}$ که دارای نمکها، کربوهیدراتها (گلوکزکم) اسیدهای آمینه غیر ضروری است چندان مناسب رشد سلولها نمی‌باشد.

ولی مشخص نیست که چگونه سلولها در هم کشتی سبب بهبود تکوین جنینها می‌شوند. احتمال دارد که سلولهای هم کشتی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی (O_2, pH, CO_2) محیط *in vitro* را پایدار کنند. این سلولها گونه‌های واکنشگر اکسیژن را با تجلی ژنهای آنزیمهای آنتی اکسیدانت کاتالازو سوپراکسیددسیموتاز کاهش داده، سبب بهبود رشد جنینها می‌شوند همچنین نشان داده شده که هم‌کشتیها با تغییر متابولیتهای موجود در محیط کشت سبب تغییر متابولیسم جنین و بهبود آن می‌شود (۵۱، ۵۲).

از طرفی تولید و ترشح آنتی اکسیدانتها (۵۳)، گلیکوپروتئینها و فاکتورهای رشد می‌تواند در بهبود تکوین جنینها مؤثر باشد. Goldford و Desai (۵۴) نشان دادند که اینترلوکین - ۶، فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) و فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (LIF) از سلولهای vero در محیط کشت رها می‌شوند. اثرات میتوژنی این فاکتورها و فاکتورهای رشد دیگری نظیر فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) ، فاکتور رشد ترانسفورمیک (TGFX1B)B,X) بر تکوین جنین در محیط آزمایشگاهی درگونه‌های زیادی گزارش شده است (۵۵، ۵۷).

با این‌حال مکانیسم دقیقی که بیانگر نحوه اعمال نفوذ سلولها بر جنین باشد شناخته نشده است به عبارت دیگر مشخص نیست که آیا سلولها به واسطه تماس سلول یا از طریق ترشحات خاص بر جنین اعمال نفوذ می‌کنند.

اما در مطالعه حاضر با بکارگیری محیطهای R_2 conditioned ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته سلولهای veroیی یا فیبروبلاستی مشاهده شد که نه تنها کیفیت تکوین جنینها بهبود نیافت بلکه میزان بلاستوسیستها (هچینگ و هچ شده) کاهش یافت. عدم اثر محیطهای Conditioned بر جنینهای پستانداران قبلاً نیز گزارش شده است [مثلاً محیطهای conditioned: vero بر جنینهای تک سلولی موش (۴۴)، سلولهای رحم گاو بر مورولای گاو (۵۸) اویداکت گوسفند بر جنینهای تک سلولی گوسفند (۵۹)]. این در حالی است که نشان داده شده محیطهای Conditioned تک لایه‌های اویداکتی پستانداران، تکوین جنین پستانداران را بهبود می‌بخشد (۶۰، ۶۱) (مثلاً محیط Conditioned با سلولهای اویداکت گاو مانند هم کشتی بر جنینهای تک سلولی گاو اثر مثبت دارد).

در توجیه این موضوع باید گفت که احتمالاً عوامل امبریوتروفیک بعد از مدت کوتاهی و یا پس از انجماد و ذوب تخریب می‌شوند و به مواد امبریوتوکسیک تبدیل می‌گردند. هر چند احتمال هم دارد که در اینجا به اتصال مستقیم جنین به سلولها نیاز باشد. بطوریکه در هم کشتی جنین خوک با تک لایه‌های اندومتر رحم مشاهده شده است که اگر بین جنین و سلولها فیلتری بگذاریم که به مواد اجازه عبور دهد و در عین حال از اتصال مستقیم سلولها و جنین جلوگیری کند، رشد جنینها به خوبی انجام نمی‌شود.

توجیه دیگر آن است که مواد مترشحه از این سلولها دارای نیمه عمر کوتاهی هستند و با پردازش محیطهای Conditioned، این مواد از بین می‌روند و دیگر اثری بر تکوین جنین ندارد. یک راه برای حل این فرضیه ، بکارگیری فیلتر بین جنین‌هاو سلولها است بطوریکه Fukaya و همکارانش (۶۲) با گذاشتن microporous membrane که دارای روزنه‌هایی با قطر ۰/۴۵ میکرو متر بود و به یونها ، لیپو پروتئینها و سایر مواد با وزن کم اجازه عبور می‌داد ، در بین جنینهای موش و تک لایه‌ای از سلولهای اپیتلیال اویداکت خرگوش گزارش کرد که تکوین

جنینها با گروه کنترل هم‌کشتی فاقد فیلتر تفاوتی نمی‌کند و پیشنهاد کرد که این مواد ترشحی سلولهای سوماتیک هستند که در بهبود و تکوین جنین مؤثرند.

بدین ترتیب، نتایج مطالعه نشان می‌دهد در صورتیکه در ۴۸ ساعت اول کشت زیگوتها، از محیط اول محیطهای کشت متوالی (R_1) استفاده کرد و بعد جنینها را به محیط دوم محیطهای کشتی متوالی (R_2) دارای سلولهای vero یا فیبروبلاست جنین موش منتقل کرد، تکوین جنینها به هچینگ بلاستوسیست یا بلاستوسیست هچ شده به نحو چشمگیری بهبود می‌یابد و کولاپس شدن بلاستوسیستها از بین می‌رود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح «ساخت محیطهای متوالی و انتقال بلاستوسیست» مصوب شورای علمی پژوهشکده رویان و دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی است. بدین وسیله نویسندگان فرض ذمهٔ خود می‌دانند که از همکاری بی دریغ آقای دکتر نصر اصفهانی، آقای دکتر سعید کاظمی آشتیانی و آقای عبدالحسین شاهوردی تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Iritani A: Current status of biotechnological studies in mommalina reproduction. Fertil Steril 1988; 50: 543-550

2. Fong CY,Bongso A, Ng SC: Blastocyst transfer after enzymatic treatment of the zona pellucida: improving IVF and understanding implantation. Hum Reprod 1998; 2926-2932

3. Gardner DK, Vella P, Lane M: Culture and transfer of human blastocysts incerase implantation rates and reduces the need for successful blastocyst development and pregnancy. Hum Reprod 1998; 13: 169-177

4. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, schoolcreaft WB: Blastocyst score affects implantation and prenancy outcom: towards a single blastocyst transfer. Fertil Steril 2000: 73: 1155-1158

5. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK: Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. Hum Reprod 1998; 13: 169-177

6. Hoppe PC, Coman OR: Reduced suvival inutero from transferred mouse blastocysts comapred with morulae. Gamete Res 1983; 7: 161-167

7. Binkerd PE, Anderson GB: Transfer of cultur rabbit embryos. Gamete Res 1979; 2: 65-73

8. Jung T: Protein synthesis and degradation in non-cultured and vitro cultured rabbit blastocysts. J Reprod Fertil 86: 1989; 507-512

9. Jung T, Fischer B, Beier H: Quantitative aspects of protein synthesis in non-cultured and cultured rabbit blastocyst. Hum Reprod 1987; 2: 23-29

10. Harlow GM, Quinn P: Development of preimplantion mouse embryos *in vitro* and *in vivo*. Aust J Biol Sci 1982; 35: 187-193

11. Fisher B: Development retardation in cultured priemplantion embryos. J Reprod Fert 1987; 79: 150-123

12. Bavister BD: Role of oviductal secretions in embryo growth *in vivo* and *vitro*. Theriogenilogy 1988; 26: 143-154

13. Thibodeaux JK, Godke RA: *In vitro* enhancement of early-stage embryos with co-culture. Arch pathol lab Med 1992; 116: 364-372

14. Veiga A, Torello MJ, Menezo Y, Basqets O, Coroleu B, Barric ON: Use of co-culture of human embryos on vero cells to improve clinical implatation rate. Hum Reprod 1999; 14: 112-120

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

16. Park JS, Han YM, Lee CS, Kim SJ, Kim YH, Lee KJ KS, LEE KK: Improved development of DNA injection embryos co-cultured with mouse embryonic fibroblast cells. Anim Reprod Sci 2000; 28: 13-22

17. Fabbri, R, Procu E, Marsella T, Primavera MR, Cecconi; S Noottalo SA, Motta PM, Vetoroli S, Flamigni C: Human embryo development and peregnancies in an homologous granulosa cell co-culture system. J Assist Reprod Genet 2000; 17: 1-12

18. Goff AK, Smith LC: Effect of steroid treatment of endometrial cells on blastosyst development during co-culture. Theriogenology 1998; 49: 1021- 1030

۱۹. بهاروند حسین، رضازاده ولوجردی مجتبی، حسینی احمد: تأثیر هم‌کشتی سلولهای اپیتیال، آمپولا و ایسموس اویداکت انسان بر جنینهای دو سلولی موش. نشریه پزشکی یاخته ۱۳۷۸؛ شماره ۲: صفحات ۱۴-۹

۲۰. بهاروند حسین، رضازاده ولوجردی مجتبی، الطریحی تقی: مقایسه تکوین جنینهای موش در هم‌کشتی با سلولهای اپی‌تلیال نواحی آمپولاوایتموس اویداکت هاستر و تاثیر عملکرد گنادوتروپینهای تزریقی بر کیفیت اثر هم‌کشتی. نشریه پزشکی یاخته ۱۳۷۸؛ شماره ۱: صفحات ۱۳-۷

21. Gardner DK, Leese HJ: Concentrations of nutrients mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. J Reprod Fertil

1990; 88: 360-368
22. Gardner DK, Lane M, Galeron I, Leeton J: Environment of the preimplantation human embryos *in vivo*: metabolite analysis of cumulus cells. Fertil Steril 1996; 65: 349-353
23. Clough JR: Energy metabolism during mammalian embryogenesis. Biochem Soc Trans 1985; 13: 77-79
24. Lane M, Gardner DK: Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. J Reprod Fertil 1997; 109: 153-164
۲۵. بهاروند حسین ، رضازاده ولوجردی مجتبی: مقایسه تکوین جنینهای موش در محیطهای کشت متوالی ساخته شده R1 و R2 (رویان ۱ و ۲) و معادلهای تجاری G1.2 و G2.2. مجله پزشکی حکیم، در دست چاپ
۲۶. بهاروند حسین ، رضازاده ولوجردی مجتبی: عاملهای موثر در کولاپس شدن بلاستوسیست در محیطهای کشت متوالی. مجله پزشکی کوثر، در دست چاپ
27. Fong CY, Bongso A: Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential culture media with and without co-culture. Hum Reorod 1998; 14: 774-781
28. Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC: Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of vero cells. Biol Reprod 1990; 42: 301-306
29. Hogan B, Constantin F, Lacy E: Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual, cold spring Harbor laboratory, New York, USA 1994
30. Bavister, BD. Benefits of prolonged embryo culture. Hum Reprod 2000(Abs); 1: 37-38
31. Mckiernan SH, Clayton MK, Bavister BD: Analysis of stimolatory and inhibitory amino for development of hamster 1-cell embryos *in vitro*. Mol Reprod Dev 1995; 42: 188-199
32. Gardner DK, Lane M: Amino acids ammonium regulate mouse embryo development in culture. Biol Reprod 1993; 48: 377-385
33. Thompson JG, Simpson AC, pugh PA, Tervit HR: Development of sheep embryos *in vitro*: Comparison between different protein sources and incubation vessels. Proc Aust Soc Reprod Biol 1991; 23: 62
34. Liu Z, Foot E: Effects of amino acids an development of IVM/IVF bovine embryos in a simple protein free medium. Hum Reprod 1995; 10: 2985-2991
35. Van Winkle LJ, Campione AL: Functional changes in cation-prefering amino acid transport during development of premplantion mouse conceptuses. Biochem Biophys Act 1990; 1028: 165-173
36. Carney EW, Bavister BD: Stimolatory and inhibitory effects of amino acids on the development of hamster eight embryos *in vitro* fertil. Embryo Trasfer 1987; 4: 162-167
37. Van Winkle LJ, Dickinson HR: Differences in amino acids content of preimplantation mous conceptuses. Biochem Biophys Acea 1990; 1028: 165-173
38. Van Winkle LJ, Dickinson HR: Differences in amino acid confent of preimplatation mouse embryos that develop *in vitro* versus *in vivo* effects of five amino acids that are aboundant in oviductal secretions. Boil Reprod 1995; 52: 96-104
39.Sellens MH, stein S, sherman ML: Protein and free amino acid content in preimplantation mouse embryos and in blastocysts under vavious culture conditions. J Reprod Fertil 1981; 61: 307-315
۴۰. بهاروند حسین ، رضازاده ولوجردی مجتبی: مقایسه تأثیر شش ماکرومولکول افزودنی مختلف به محیط کشت بر میزان تکوین و تسهیم جنینهای تک سلولی موش. مجله پزشکی یاخته ۱۳۷۸؛ ۳: صفحات ۲۴-۱۷
41. Bavister BD: Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. Hum Update 1995; 1: 91-148
42. Ouhibi N, Hamidi J, Gullaud J, Menezo Y: Co-culture of I-cell mouse embryos on different cell supports. Hum Reprod 1990; 5: 737-743
۴۳. موحدین منصوره، رضازاده ولوجردی مجتبی، حسینی احمد: مقایسه بکارگیری دو محیط کشت متفاوت RPMZ, T6 در کشت همزمان جنینهای دو سلولی موش با سلولهای vero. مجله پزشکی یاخته ۱۳۷۹؛ ۵: صفحات ۲۵-۱۹
44. Rexroad CE Jr, Powell AM: Development of ovine embryos co-cultured on oviductal cellsembryonic fibroblasts or STO cell monolayers. Biol Reprod 1993; 49: 789-793
45. Wetzels AMM: punt van der zalm APEM Bastiaans LA. The effects of human skin fibroblasts on human sperm motility and mouse zygote development. Hum Reprod 1992; 7: 852-856
46. Wetsels AMM, van der Auwera J, Bastiaans BA: Sperm function changes and fetilization *in vitro* in co-culture with human skin fibrolasts. Hum Reprod 1995; 10: 137-141
47. Wetzels AMM: Fertilization and embryo development in *in vitro* co-culture-basic and clinical aspects. Thesis, University of Niymegen, Nijmegen, The Netherlands, 1995
48. Wetzels AMM, Bastiaans BA, Hendrikes JCM, Goverde HJM, punt-van der zalm APEM, Verbeet JGM: The effect of co-cullture with human fibroblasts

on human embryo development *in vitro* and implantation. Hum Reprod 1998; 13: 1325-1330
49. Menezo YJR, Janny L, Khatchadorian: Gamete and embryo quality. The proceeding if the fourth oranon, Round table conference, Thessalioniki, Greece, the parthenon publishing group, 1993, pp 139-155
50. Rexroad CE, Powell AM: Co-Culthure of ovine eggs with oviductel cells and trophoblastic vesicles. Theriogenology 1988; 29: 387-397
51. Bongso A, Fong CY: The effect of co-cultore on human zygote development. Curr Opin Obstet Gynecol 1993; 5: 585-593
52. Watson AJ, Watson PH, Warnes D, Walker SK, Armstrong DT, seamark RF: Preimplantation development of *in vitro* matored and *in vitro* fertilized ovine zygotes: comparison between co-culture on oviduct epithelial cell monolayers and cultare under low oxygen. Biol Reprod 1994; 50: 715-724
53. Guerin P, Menezo YJR: Hypotaurine and- taurine gamete and embryo environments: de nove synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. Zygote 1995; 3: 333-343
54. Desai N, Goldfrb J: Co-cultured 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 1998; 13: 1600-1605
55. Paria B, Day S: Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions amony embroys and role of growth factors. Proc Nat Acad SciUSA 1990; 87: 4756-4760
56. Dardik A, Schultz R: Blastocoel expansion in the preimplation mouse embryo: stimuulatory effect of TGFand EGF. Development 1991; 113: 919-930
57. Larson R,Ignotz G, Garriew: Platelet derivedembryosgrowthfactor (PDGF) stimulates development of bovine during the fourth cell cycle. Development 1992; 821-826
58. Kuzan AB, Wright RW, Jr: Blastocyst expansion,hatching and attachment of porcine embryosco-cultored with bovine fibroblasts *in vitro*. Anim Reprod Sci 1982; 5: 57-62
59. Rexroad CE, Jr, Powell A: Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. J Anim Sci 1988; 66: 947-952
60. Wang WL, Jiang HS, Lu KH, Gordon I: Effect of condition medium and glucose concentration on the *in vitro* development of early bovine embryos. Theriogenelegy 1990; 33: 343-350
61. Rieger D, Grisart B, Semple E, Van langendonckt A, Betteriday KJ, Dessy F: comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell co-culture and medium on the development and metabolic activity of caffle embryos. J Reprod Fertil 1995; 105: 91-98
62. Fukaya T, Chida S, Murakami T, Yajima A: Is direct cell-to cell contact needed to imorove embryonic clevelopment in co-cultore. Tohoku J EXP Med 1996; 180: 225-232