

مقایسه به کارگیری دو محیط کشت متفاوت T₆ 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 ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

چکیده

هدف: بررسی آثار دو محیط کشت T₆ 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 جفت گیری 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 به ترتیب در محیطهای T₆ و RPMI و جنینهای گروه آزمون ۱ و ۲ به ترتیب در محیطهای کشت همزمان Vero+T₆ و Vero+RPMI کشت داده شدند و رشد و تکوین جنینها در هر یک از گروهها به مدت ۹۶ ساعت با روش آماری χ^2 مقایسه شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کشت همزمان جنینها با استفاده از هر دو محیط کشت می تواند تکامل جنینها را نسبت به کشت در محیط روتین آزمایشگاهی بهبود بخشد. هر چند که تفاوتی موجود میان محیط کشت T₆ و سیستم کشت همزمان Vero+T₆ معنی دار نبود اما میزان درصد بالاتری از جنینها در محیط کشت T₆ نسبت به کشت همزمان Vero+T₆ نتوانستند به مرحله خروج از زونا برسند. در همین حال محیط کشت T₆ نسبت به RPMI بهتر عمل کرده و تفاوتی آماری معنی داری میان جنینهایی که در محیط T₆ کشت داده شدند نسبت به RPMI مشاهده شد. مقایسه کشت همزمان جنینها با سلول Vero در دو محیط کشت T₆ و RPMI هم نشان داد که غیر از مرحله خروج از زونا جنینها در سیستم کشت همزمان Vero+T₆ تکامل بهتری نسبت به سیستم Vero+RPMI داشتند.

نتیجه گیری: بر اساس یافته‌های پژوهش می توان دریافت که هر چند کشت همزمان به تکامل جنین دو موش در محیط کشت کمک می کند اما به کارگیری محیطهای ساده نیز در کشت جنین مفید است و در صورت به کارگیری کشت همزمان می بایست به دنبال محیط کشتی بود که هم برای تکثیر سلولها مناسب باشد و هم به رشد و تکوین جنین کمک کند.

کل واژگان: کشت همزمان، جنین موش، محیط کشت

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 می توان به ایست تکوینی وابسته به مرحله تکاملی خاص و از دست دادن قدرت ادامه حیات جنینهایی که برای مدتی در محیط کشت نگهداری شده اند؛ اشاره کرد که در نتیجه، امکان کشت طولانی مدت جنین قبل از انتقال از بین می رود (۱). از این رو است که انتقال جنین انسانی معمولاً در مراحل ۴-۸ سلولی صورت می گیرد.

اما مشکل دیگر آن است که انتقال در مراحل اولیه تکاملی باعث می شود که عدم همزمانی میان جنین و پذیرش رحم وجود داشته باشد لذا میزان لانه گزینی کاهش پیدا می کند (۲). به منظور غلبه بر این مشکلات، انواعی از سیستمهای کشت طراحی شده بتوان قبل از انتقال جنین، برای مدت زمان طولانی تری 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 اپی تلیوم کلیه میمون سبز آفریقایی است، به این دلیل انتخاب می شود که دارای منشا مشترک با سیستم تناسلی است و در ضمن از نظر هر گونه آلودگی ویروسی و باکتریایی نیز کنترل می شود.

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. Menezes و همکارانش (۲) در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که کشت همزمان جنینهای انسانی با سلولهای Vero باعث بهبودی در تکامل آنها می شود، 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 می توان به استفاده از روشهای کشت همزمان در تکامل بلاستوسیت و سپس انجماد آن اشاره کرد. امروزه اهمیت انجماد پری نوکلئوس و جنینهای مراحل اولیه تکامل (دو سلولی تا چهار سلولی) ثابت شده است. کشت همزمان جنین تا مرحله بلاستوسیت 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 می کند. Lai و همکارانش (۷) نیز به نتیجه رسیدند که HTF^۱ برای رشد سلولها در کشت همزمان مناسب نیست اما برعکس DMEM/F-12^۲ خیلی خوب عمل می کند و اگر ترکیب مساوی از این دو محیط کشت در ۲۴ ساعت اولیه رشد سلولها به کار رود در آن صورت سلولها قادر خواهند بود که با HTF تطابق پیدا کرده و سیستم برای تکامل جنین مناسب می شود. 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 می کند (۱۳) که با سلولهای Vero همخوانی ندارد. به هر حال نیاز به یک محیط کشت ایده آل 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 لایه های اضافی دچار مرگ شده و مواد سمی به داخل محیط کشت آزاد می شود که در نهایت pH محیط بالا می رود که هم برای سلولهای Vero و هم برای جنینها مضر است (۷).

در پژوهش حاضر به مقایسه دو محیط کشت متفاوت T₆ و RPMI در کشت همزمان جنینهای دو سلولی موش با سلولهای Vero پرداخته شده است چرا که محیط T₆ یک محیط نمکی ساده و مناسب برای کشت جنین بوده و RPMI با سلولهای Vero همخوانی دارد و باعث تکثیر زیاد سلولها می شود.

مواد و روشها

* جمع آوری جنینهای دو سلولی موش

موشهای ماده از نژاد NMRI با سن ۶-۸ هفته با تزریق داخل صفاغی 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 ترها جدا شدند. موشهای ماده حامله ۴۸ ساعت پس از تزریق hCG به روش قطع نخاع گردنی کشته شده و به سرعت لوله های رحمی آنها جدا و به قطره ای از محیط T₆ یا RPMI که قبلاً آماده شده بود، انتقال یافتند. جنینهای به دست آمده به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. دو گروه اول برای کشت در محیط T₆ (گروه شاهد ۱) و هم کشتی در محیط Vero+T₆ (آزمون ۱) در نظر گرفته شده و دو گروه بعدی نیز برای کشت در محیط RPMI (شاهد ۲) و هم کشتی در محیط Vero+RPMI (آزمون ۲) در نظر گرفته شدند.

* کشت سلولهای Vero

برای کشت سلولهای Vero با سلولاریته ۱×۱۰^۵ سلول در میلی لیتر به ترتیب 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 پتری دیش با قطر ۳۰ میلی لیتر 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 T₆ محتوی ۵۰ mg/ml BSA^۱ و محیط RPMI با محیط تازه، دارای ۱۰ درصد FCS^۲ تعویض شد. پتری دیشها به انکوباتور CO₂ دار منتقل شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت قطره ها 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

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 کمترین گروهها مقایسه شد.

یافته‌ها

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

در جدول ۱ مقایسه‌ای میان میزان رشد و تکوین جنینهای دو سلولی موش پس از کشت همزمان با Vero+T₆ و گروه شاهد صورت گرفته است. گروه شاهد ۱ شامل ۲۴۲ جنین دو سلولی بود که در محیط T₆ کشت داده شدند و گروه آزمون ۱ شامل ۳۷۰ جنین دو سلولی بود که در محیط هم‌کشتی Vero+T₆ 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 به ترتیب به مرحله مورولا و بلاستوسیت رسیدند و در گروه آزمون ۱ این مقادیر ۸۹ و ۸۲ درصد بود که اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود. در حالی 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	تعداد جنینهای تکوین	چهار سلولی (%)	هشت سلولی (%)	مورولا (%)	بلاستوسیت (%)	خروج از زونا (%)
شاهد ۱	۱۰	۲۴۲	۹۶ (۲۴)	۸۹ (۲۲)	۲۱۰ (۵۲)	۱۹۶ (۴۹)	۱۹۷ (۵۰)
آزمون ۱	۹	۳۷۰	۹۵ (۲۶)	۸۲ (۲۲)	۲۲۰ (۵۹)	۲۰۳ (۵۵)	۱۲۳ (۳۳)

گروه شاهد ۱: جنینهای کشت داده شده در محیط T₆ $P < 0.01$
گروه آزمون ۱: جنینهای کشت داده شده در محیط هم‌کشتی Vero+T₆

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 به ترتیب 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 بلاستوسیت رسیدند در گروه شاهد ۲ به ترتیب ۶۵ و

۸۵ درصد و در گروه آزمون ۲ به ترتیب 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 سلولی موش در گروه شاهد ۲ و آزمون ۲

گروه	تکرار آزمایش	تعداد جنینهای تکوین	چهار سلولی (%)	هشت سلولی (%)	مورولا (%)	بلاستوسیت (%)	خروج از زونا (%)
شاهد ۲	۵	۱۰۶	۸۸ (۸۳)	۸۱ (۷۶)	۶۹ (۶۵)	۶۱ (۵۸)	۲۴ (۲۲)
آزمون ۲	۵	۱۲۲	۹۳ (۷۶)	۸۳ (۶۸)	۹۱ (۷۵)	۶۹ (۵۶)	۴۶ (۳۸)

گروه شاهد ۲: جنینهای کشت داده شده در محیط RPMI $P < 0.01$
گروه آزمون ۲: جنینهای کشت داده شده در محیط هم‌کشتی Vero+RPMI

در جدول شماره ۳ مقایسه‌ای میان میزان رشد و تکوین جنینهای دو سلولی موش در دو محیط کشت متفاوت T₆ (گروه شاهد ۱) و RPMI (گروه شاهد ۲) صورت گرفته است. در حالی که 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 به ترتیب ۸۷، ۸۱، ۴۴ درصد جنینها به مراحل تکاملی مورولا، بلاستوسیت و خروج از زونا رسیدند و این مقادیر برای گروه شاهد دوم به ترتیب 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 RPMI و T₆

گروه	تکرار آزمایش	تعداد جنینهای تکوین	چهار سلولی (%)	هشت سلولی (%)	مورولا (%)	بلاستوسیت (%)	خروج از زونا (%)
شاهد ۱	۱۰	۲۴۲	۹۶ (۲۴)	۸۹ (۲۲)	۲۱۰ (۵۲)	۱۹۶ (۴۹)	۱۹۷ (۵۰)
شاهد ۲	۵	۱۰۶	۸۳ (۷۶)	۸۱ (۷۶)	۶۹ (۶۵)	۶۱ (۵۸)	۲۴ (۲۲)

گروه شاهد ۱: جنینهای دو سلولی کشت داده شده در محیط کشت T₆ $P < 0.001$
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 با RPMI در دو محیط کشت متفاوت T₆ (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

اختیار آن قرار نگرفت. به همین دلیل انتخاب نوع محیط کشت همراه با سلولها در سیستم کشت همزمان به منظور بالا بردن بازدهی آن بسیار مهم است (۱۷).

مقایسه به کارگیری دو محیط کشت متفاوت T₆ و PRMI در کشت همزمان Vero و جنینهای دو سلولی موش نشان داد که غیر از مرحله خروج از زونا، محیط کشت T₆ که یک محیط ساده 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 می نماید.

محققین دیگر نیز به این نتیجه رسیده اند 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 می توان نتایج بهتری از کشت همزمان به دست 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 به تنهایی نمی تواند 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 هم کشتی، درصد بالایی از هچینگ به دست نیامد و محیط کشت ساده T₆ مناسب تر بود (۴۴ درصد خروج از زونا در محیط T₆ و ۳۳ درصد در محیط هم کشتی Vero+T₆). لذا به نظر می رسد 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 همان طور 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 ایده آل برای تکامل جنین فراهم می کند 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 می تواند جانشین بسیار مناسبی برای هم کشتی 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 هزینه های مصرفی و غیر مصرفی این طرح را بر مبنای قرارداد شماره ۲۶۳۲/۱۹/۳۰ پ مورخ ۱۳/۱۰/۷۷ تأمین نمودند و همچنین از آقای حسین بهاروند که در انجام مراحل مختلف پژوهش ما را یاری کردند، ابراز می دارند.

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

جدول ۴. مقایسه رشد و تکوین جنینهای دو سلول موش در محیط کشت همزمان Vero با

استفاده از دو محیط کشت متفاوت RPMI، T₆

گروه	تکرار از مابتن	تعداد کلی جنینهای	چهار سلولی	هشت سلولی	مورولا	بلاستو سبست	خروج از زونا
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
آزمون ۱	۹	۳۷۰	۳۵۰ (۹۵)	۲۲۶ (۶۱)	۲۳۰ (۸۹)	۲۰۲ (۵۲)	۱۲۲ (۳۳)
آزمون ۲	۵	۱۲۲	۱۱۳ (۹۳)	۱۰۱* (۸۳)	۹۱* (۷۵)	۶۹** (۵۶)	۳۶ (۲۸)

آزمون ۱. جنینهای دوسلولی کشت داده شده در محیط هم کشتی Vero+T₆ $P < 0.05$

آزمون ۲. جنینهای دوسلولی کشت داده شده در محیط هم کشتی 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 به دست آوردند (۳، ۴، ۵، ۶، ۱۴). به نظر می رسد که سلولهای Vero در محیط کشت همزمان قادر به برداشتن عوامل مزاحم بوده و از این طریق به رشد و تکامل جنینها کمک می کنند (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 پلاسید اکم 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+T₆ در مقایسه با محیط T₆ به مراحل تکاملی پیشرفته مانند مورولا و بلاستوسیت رسیدند (به ترتیب ۸۲ و ۸۳ درصد در کشت همزمان و ۸۷ و ۸۱ درصد در محیط کشت T₆) اما در کشت همزمان تعداد کمتری به مرحله خروج از زونا رسیدند (۳۳ درصد در هم کشتی و ۴۴ درصد در محیط T₆) که احتمالاً علت همان اشکالی است که به کشت همزمان وارد می شود 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

References

1. Menezo Y, Arnal F, Humeau C, Ducret L, Nicollet B: Increased Viscosity in embryo Transfer medium does

not improve The Pregnancy rates in IVF and ET. *Fertil Steril* 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-culture 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 cleavage rates 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 preimplantation 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 embryos. *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

