بررسی اثر مایع آمنیوتیک جنین شش روزه و ده روزهٔ مرغ (CEAF) بر رشد و نمو جنینهای دو سلولی موش

فریبا اسماعیلی M.Sc *، مجتبی رضازاده Ph.D **، عباسعلی کریمپور Ph.D ***

* دانشگاه تربیت مدرس ـ دانشکده علوم پزشکی ـ گروه علوم تشریحی

** دانشگاه تربیت مدرس ـ دانشکده علوم پزشکی ـ گروه علوم تشریحی

*** دانشگاه علوم پزشکی مازندران ـ دانشکده علوم پزشکی ـ گروه علوم تشریحی

** آدرس مکاتبه: تهران ـ صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵ ـ پژوهشکده رویان

چکیده

* **هدف:** بررسی اثر مایع آمنیوتیک جنین شش روزه و ده روزه مرغ (CEAF) بر رشدونمو جنینهای دو سلولی موش.

* **نوع مطالعه:** مطالعه تجربی آینده‌نگر

* **مواد و روشها:** مایع آمنیوتیک جنین شش روزه و ده روزه مرغ (AF-۶، AF-۱۰) آسپیره شده ودو آزمایش طراحی شد.

آزمایش یک: AF-۶ به این ترتیب آماده شد؛ Ham's F-10 + بیست درصد AF غیرفعال شده ($iAF_{۲۰}$)، Ham's F-10 + پنجاه درصد AF غیرفعال شده ($iAF_{۵۰}$)، AF غیرفعال شده ($iAF_{۱۰۰}$)،AF فعال ($AF_{۱۰۰}$)، Ham's F-10 + ده درصد albuminar-5 به عنوان شاهد. جنینهای دو سلولی موش نژاد Rondom-Bred Swiss White به طور تصادفی به این پنج گروه تخصیص داده شدند. آزمایش دو: تمامی این مراحل برای AF- ۱۰ به طور مشابه انجام شد.

* **یافته‌ها:** آزمایش یک: در $AF_{۱۰۰}$، $iAF_{۱۰۰}$ و $iAF_{۵۰}$ درصد مجموع بلاستوسیست (TB) به طور معنی‌داری بیشتر از محیط شاهد بود (به ترتیب ۸۷/۵، ۸۱/۷ و ۸۲/۱ در مقابل ۵۶/۱) ($P<0.001$). درصد خروج بلاستوسیست از زوناپلوسیدا (HB) در $AF_{۱۰۰}$ و $iAF_{۲۰}$ در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود (به ترتیب ۵۸ و ۶۰/۳ در مقابل ۲۲/۵) ($P<0.001$).

آزمایش دو: درصد TB در $AF_{۱۰۰}$ و $iAF_{۱۰۰}$ نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (به ترتیب ۸۲/۳ و ۷۳/۶ در مقابل ۵۱/۹) ($P<0.001$). HB در $AF_{۱۰۰}$، $iAF_{۱۰۰}$ و $iAF_{۵۰}$ با اختلاف معنی‌داری بیشتر از محیط شاهد بود (به ترتیب ۶۸، ۶۹/۷ و ۵۹/۲ در مقابل ۳۰/۳) ($P<0.001$). هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین دوگروه آزمایشی، یعنی AF-۶ و AF-۱۰ و همچنین بین غلظتهای مختلف AF با یکدیگر مشاهده نشد.

* **نتیجه‌گیری:** CEAF به عنوان یک غنی‌کننده و یا به عنوان یک محیط کشت طبیعی قادر است به رشد و نمو جنینهای قبل از لانه گزینی موش کمک کند.

گل واژگان: مایع آمنیوتیک جنین مرغ، جنین قبل از لانه‌گزینی موش، محیط کشت طبیعی.

مقدمه

امروزه توجه محققین به استفاده از مایعات طبیعی (مانند مایع فولیکولی و مایع آمنیوتیک) به عنوان یک محیط کشت یا غنی‌کننده محیط کشت[1] جلب شده است. به کارگیری مایع آمنیوتیک انسانی (HAF)[2] در چند تحقیق معدود نشان داد که این مایع نه تنها قادر است رشدونمو جنین را قبل از لانه‌گزینی بهبود بخشد (۱۶، ۱۰، ۷)، بلکه می‌تواند درصد باروری رابه طور چشمگیری افزایش دهد(۱۰). از طرفی Gianaroli و همکارانش ادعا کرده‌اند که هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در میزان لقاح، تسهیم و باروری در هنگام استفاده از HAF و محیط کنترل مشاهده نمی‌شود(۱۱)، در حالی که Dorfmann و همکارانش اظهار نموده‌اند که HAF درصد باروری را کاهش می‌دهد(۸). برخی پژوهشگران بررسیهایی را بر روی مایع آمنیوتیک جنین مرغ (CEAF)[3] انجام داده‌اند. Blakewood(۲، ۳) و Ocampo (۱۵) جنین قبل از لانه‌گزینی پستانداران را به کیسه آمنیوتیک جنین در حال رشد مرغ (CEAm)[4] منتقل کردند و بدین‌ترتیب رشدونمو بهتر جنین را نتیجه گرفتند. ولی استفاده از CEAF آسپیره شده توسط Blakewood اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با محیط شاهد نشان نداد(۳). از آنجایی که دسترسی به CEAF نسبت به HAF آسانتر بوده، آسپیره کردن آن هیچ‌گونه خطری در پی ندارد و همچنین این مایع نسبت به محیط کشت‌های سنتتیک بسیار ارزان قیمت‌تر است، از طرف دیگر در به کارگیری این مایع به عنوان محیط کشت هنوز اختلاف‌نظر بسیاری وجود دارد، ما بر آن شدیم که:

۱) اثرات احتمالی CEAF را به دو صورت غیرفعال شده با حرارت[5] (با غلظتهای ۲۰٪، ۵۰٪ و ۱۰۰٪) و فعال (با غلظت ۱۰۰٪) بر روی رشدونمو جنین دو سلولی موش ارزیابی‌کنیم.

۲) احتمال اختلاف بین عملکرد CEAF جنین شش روزه و ده روزه مرغ را بررسی نماییم.

۳) این مایع رابه عنوان یک محیط طبیعی، حداقل برای کشت جنین موش معرفی کنیم.

مواد و روشها

* جمع‌آوری جنین موش

موش سوری، نژاد Rondom-Bred Swiss white در شرایط مناسب (آب و غذای کافی و نسبت ۱۴ ساعت به ۱۰ ساعت روشنایی به تاریکی) نگهداری شد. برای جمع‌آوری جنین به ترتیب ذیل عمل شد:

موشهای ماده پنج تا هفت هفته‌ای با تزریق هورمون، به تخمک‌گذاری بیشتر[6] تحریک شدند. برای این‌کار در ابتدا پانزده واحد هورمون HMG[7] به صورت زیرپوستی و ۴۸ ساعت بعد ده واحد هورمون HCG[8] به صورت درون صفاقی به آنها تزریق شد. سپس این موشها بلافاصله درکنار موشهای نر از همان نژاد و به نسبت یک به یک در قفسهای جداگانه قرار گرفتند. ۴۸ ساعت بعد جنینهای دوسلولی به روش Flushing و با استفاده از محیط Ham's F-10 غنی شده با ده درصد Albuminar-5 (محتوی پنج درصد سرم آلبومینار انسانی) از اویداکت خارج شدند. جنینهایی که از نظر شکل ظاهری طبیعی بودند پس از شستشو در یک قطره محیط کشت تازه (Ham's F-10 + ده درصد Albuminar-5 :SA) جمع‌آوری شدند. سرانجام تعداد پانزده تا بیست جنین به طور تصادفی به هر قطره محیط کشت موردنظر اختصاص داده شد.

* محیط کشت

CEAF از کیسه آمنیوتیک جنین شش روزه و ده روزهٔ مرغ، آسپیره شده و در لوله‌های آزمایش پلاستیکی استریل به طور جداگانه نگهداری شد. پس از سانتریفوژ CEAF (۵۰۰×g به مدت پانزده دقیقه)، مایع رویی به دو بخش تقسیم شد. یک بخش فیلتر شده، به عنوان CEAF فعال در نظر گرفته شد. بخش دیگر به منظور غیرفعال شدن باحرارت به مدت سی دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد بن‌ماری قرار گرفته، سپس فیلتر شدهٔ هر دو بخش، حداکثر به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتیگراد یخچال ذخیره شد.

* طرح آزمایش

آزمایش یک: جنینها به طور تصادفی درپنج گروه مختلف از مایع آمنیوتیک جنین شش روزه مرغ به ترتیب زیرکاشته شد:

۱ـ Ham's F-10+ بیست درصد AF غیرفعال شده (iAF۲۰)

۲ـ Ham's F-10+ پنجاه درصد AF غیرفعال شده (iAF۵۰)

۳ـ CEAF غیرفعال شده(iAF۱۰۰)

۴ـ CEAF فعال (AF۱۰۰)

۵ـ Ham´s F-10 + ده درصد ALbuminar-5 (SA) به عنوان شاهد

آزمایش دو: پنج گروه مشابه نیز برای مایع آمنیوتیک جنین ده روزه مرغ درنظر گرفته شد.

* تعیین مراحل رشد و نمو جنینی

تمامی جنینهای کشت شده به مدت ۱۲۰ ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار پنج درصد CO_2، در زیر روغن پارافین نگاه داشته شدند. تعیین مراحل رشدونمو هر ۲۴ ساعت یکبار انجام گرفت.

* تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون مربع کای[9] انجام شد.

1. Supplement
2. Human amniotic fluid
3. Chick embryo amniotic fluid
4. Amniotic cavity of developing chick embryo
5. Heat-inactivated
6. Superovulation
7. Human Menopausal Gonadotropin
8. Human Chorionic Gonadotropin
9. Chi-Square test

یافته‌ها

آزمایش یک: درصد مورولا در CEAF شش روزه (6-AF) بیشتر از محیط شاهد بود. ولی فقط بین دو گروه AF_{100} و iAF_{100} با شاهد از این نظر اختلاف معنی‌داری وجود داشت (به ترتیب ۷۰ و ۸۰/۵ در مقابل ۴۲/۷) ($P<0.001$). درصد بلاستوسیست در AF_{100}، iAF_{100} و iAF_{50} به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (به ترتیب ۸۷/۵، ۸۱/۷، ۸۲/۱ در مقابل ۵۶/۱) ($P<0.001$). به علاوه درصد خروج بلاستوسیست از زونا‌پلاسیدا در AF_{100} و iAF_{20} بیشتر بوده، اختلاف معنی‌داری را نسبت به محیط شاهد نشان داد (۵۸ و ۶۰/۳ در مقابل ۲۲/۵) ($P<0.001$) (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه آماری رشدونمو جنینهای دوسلولی موش در 6-AF و شاهد

	iAF_{20}	iAF_{50}	iAF_{100}	AF_{100}	SA
مورولا (۲۴ ساعت)	۵۹/۵	۶۴/۱	۸۰/۵**	۷۰*	۴۲/۷
بلاستوسیست (۷۲ ساعت)	۷۲/۲	۸۲/۱*	۸۱/۷*	۸۷/۵**	۵۶/۱
خروج از زونا (۱۲۰ ساعت)	۶۰/۳*	۵۰/۸	۵۲/۲	۵۸*	۲۲/۵

آزمایش دو: جنینهایی که پس از ۲۴ ساعت به مرحله مورولا رسیدند در AF_{100} و iAF_{100} به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بودند (به ترتیب ۷۰/۲ و ۵۷/۶ در مقابل ۳۶/۴) ($P<0.001$). درصد بلاستوسیست در AF_{100} و iAF_{100} بیشتر از شاهد بود (۸۲/۳ و ۷۳/۶ در مقابل ۵۱/۹) ($P<0.001$). درصد خروج جنین از زونا‌پلوسیدا در AF_{100}، iAF_{100} و iAF_{50} نسبت به شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود (۶۸، ۶۹/۷ و ۵۹/۲ در مقابل ۳۰/۳) ($P<0.001$) (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسه آماری رشدونمو جنینهای دوسلولی موش در 10-AF و شاهد

	iAF_{20}	iAF_{50}	iAF_{100}	AF_{100}	SA
مورولا (۲۴ ساعت)	۴۶/۹	۵۴	۵۷/۶*	۷۰/۲**	۳۶/۴
بلاستوسیست (۷۲ ساعت)	۶۹/۲	۶۵/۹	۷۳/۶*	۸۲/۳**	۵۱/۹
خروج از زونا (۱۲۰ ساعت)	۵۱/۸	۵۹/۲*	۶۹/۷**	۶۸**	۳۰/۳

در اغلب موارد 6-AF نسبت به 10-AF بهتر عمل کرده و موجب رشد و نمو بهتر جنین شد؛ ولی فقط در یک مورد بین این دو اختلاف معنی‌داری وجود داشت یعنی درصد مورولا در iAF_{100} (۸۰/۵ در 6-AF و ۵۷/۶ در 10-AF) ($P<0.001$) (جدول ۳).

وقتی CEAF به صورت خالص استفاده شد (فعال و غیرفعال) شرایط بهتری را برای رشدونمو جنین فراهم نمود.

جدول ۳. مقایسه رشد و نمو آماری جنین‌های دو سلولی موش در 6-AF و 10-AF

		iAF_{20}	iAF_{50}	iAF_{100}	AF_{100}
6-AF / 10-AF	مورولا (۲۴ ساعت)	۵۹/۵ / ۴۶/۹	۶۴/۱ / ۵۴	۸۰/۵* / ۵۷/۶	۷۰ / ۷۰/۲
	بلاستوسیست (۷۲ ساعت)	۷۲/۲ / ۶۹/۲	۸۲/۱ / ۶۵/۹	۸۱/۷ / ۷۳/۶	۸۷/۵ / ۸۲/۳
	خروج از زونا (۱۲۰ ساعت)	۶۰/۳ / ۵۱/۸	۵۰/۸ / ۵۹/۲	۵۲/۲ / ۶۹/۷	۵۸ / ۶۸

*: $P<0.001$
**: $P<0.0001$

iAF_{20}: Ham´s F-10 + بیست درصد AF غیرفعال‌شده
iAF_{50}: Ham´s F-10 + پنجاه درصد AF غیرفعال‌شده
iAF_{100}: CEAF غیرفعال شده
AF_{100}: CEAF فعال
SA: Ham´s F-10 + ده‌درصد Albuminar-5

بحث

به طور کلی درصد مورولا و بلاستوسیست، درصد خروج جنین از زونا‌پلوسیدا و سرعت رشد جنین از جمله معیارهایی هستند که یک محیط کشت مطلوب را از محیط کشتهای دیگر متمایز می‌سازد(۱). برای آنکه جنین در محیط کشت قادر باشد به نحو ایده‌آلی به مرحله مورولا و بلاستوسیست برسد، نیاز به عواملی مثل فاکتورهای رشد و اسیدهای آمینه دارد. فاکتورهای رشد از طرق مختلف باعث بهبود رشدونمو جنین تا مرحله بلاستوسیست می‌شوند. به عنوان مثال فاکتورهای رشد اپیدرمی (EGF)[1] و ترانسفورمینگ (TGF)[2] موجب ایجاد و اتساع حفره بلاستوسل می‌شوند، انسولین و فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF)[3] بر متابولیسم و رشدونمو جنین مؤثر هستند(۱). در سال ۱۹۸۶ Gianaroli اظهار نمود: «احتمالاً HAF محتوی فاکتورهای رشد ضروری بوده، قادر است شرایط ایده‌آل را برای رشدونمو جنین تأمین نماید»(۱۰). وی در تحقیق خود نشان داد که درصد بلاستوسیست در HAF و گروه شاهد، برابر است. از طرف دیگر Dorfmann در سال ۱۹۸۹ پس از کشت جنین در HAF و محیط کشت شاهد، میزان تسهیم یکسانی را در دو محیط گزارش نمود(۸). نتایج این دو محقق نشان می‌دهد که مایع آمنیوتیک قادر است مانند محیط کشتهای معمول، به رشد و نمو جنین کمک نماید؛ در حالی که نتایج حاصل از تحقیق حاضر حاکی از این است که CEAF نسبت به محیط شاهد شرایط بهتری را برای رشدونمو جنین در in vitro فراهم می‌نماید. چراکه در این تحقیق درصد مورولا و بلاستوسیست در جنینهای کاشته شده در CEAF به طور معنی‌داری بیشتراز محیط شاهد بود. درصد بالای مورولا و بلاستوسیست همچنین توسط Coetzee، Ocampo، Oettle و

1. Epidermal growth factor
2. Transforming growth factor
3. Insuline-like growth factor

Blakewood از کشت جنین قبل از لانه‌گزینی پستانداران در کیسه آمنیوتیک جنین در حال رشد مرغ ((CEAm) (۷، ۱۵، ۳، ۲) و HAF (۱۶) گزارش شده است. انواعی از فاکتورهای رشد مانند TGF نوع B_1 و B_2، فاکتور سلول ریشه (SCF)[1] (۱۸) و IGF نوع I و II (۱۹، ۶) در HAF وجود دارد. همچنین وجود IGF در مایع آمنیوتیک بوقلمون گزارش شده است (۱۳). چنین فاکتورهایی احتمالاً در CEAF وجود دارد. البته برای اثبات این ادعا لازم است این مایع به طور دقیق مورد تجزیه و تحلیل بیوشیمیائی قرار گیرد. چنانچه گفته شد مواد دیگری از قبیل آمینواسیدها نیز می‌توانند جنین را تا دستیابی به مرحله مورولا و بلاستوسیست یاری نمایند (۱). CEAF محتوی اسیدهای آمینه مختلفی از قبیل تارین و گلوتامین است(۴). این دو اسید آمینه، دو عنصر مهم در تولید محیط کشتهای سنتتیک هستند.

معیار دیگر برای سنجش کیفیت محیط کشت، علاوه بر درصد بلاستوسیست، درصد جنینهایی است که توانسته‌اند از زونا‌پلوسیدا خارج شوند(۱). دو عامل ظاهراً در پدیده خروج از زونا‌پلوسیدا دخیل هستند: ۱) تجزیه زونا‌پلوسیدا به وسیله یک پروتئاز شبه تریپسینی به نام اس ـ تریپسین[2] و ۲) فشاری که بر اثر گسترش حفره بلاستوسل بر زونا‌پلوسیدا وارد می‌شود (۱۲).

در این پژوهش درصد خروج جنین از زونا‌پلوسیدا در CEAF به مراتب بیشتر از محیط شاهد بود. این نتیجه، یافته‌های Blakewood و همکارانش را در مورد درصد بالای خروج جنین از زونا‌پلوسیدا در CEAm(۳) تأیید می‌کند. وجود بیش از صد نوع آنزیم مختلف در HAF گزارش شده است(۱۷). وجود این آنزیمها در محیط کشت احتمالاً به تجزیه زونا‌پلوسیدا کمک می‌کند. از آنجایی که در دو نوع CEAF استفاده شده دراین تحقیق (غیرفعال شده با حرارت و فعال) از نظر میزان خروج جنین از زونا‌پلوسیدا تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، می‌توان اظهار نمود که آنزیمهای احتمالی موجود در CEAF، شاید در مقابل دمای ۵۶ درجه سانتیگراد مقاوم بوده، خاصیت خود را از دست نمی‌دهند. از طرف دیگر ممکن است عوامل دیگری در CEAF موجود باشند که در خروج از زونا‌پلوسیدا به جنین کمک نمایند. به عنوان مثال فاکتورهای رشد می‌توانند از طریق گسترش حفره بلاستوسل این پدیده را تسهیل نمایند. همچنین دیده شده اسیدهای آمینه، خروج بلاستوسیستهای موش را از زونا‌پلوسیدا در in vitro تحریک می‌کنند(۱). افزایش میزان خروج جنین از زونا‌پلوسیدا به روش assisted hatching ظاهراً موجب افزایش درصد لانه‌گزینی (۱۲، ۵) و به دنبال آن افزایش شانس باروری (۵) می‌شود. Gianaroli و همکارانش گزارش کرده‌اند که درصد باروری در مورد جنینهای کاشته شده در HAF به مراتب بیشتر از محیط شاهد است (۱۰). اما در مقابل، Dorfmann ادعا کرده است که اگرچه HAF موجبات رشدونمو جنین را تا مرحله بلاستوسیست به خوبی فراهم می‌کند و از نظر میزان تسهیم، تفاوتی بین عملکرد این مایع با محیط شاهد وجود ندارد، ولی این مایع به طور معنی‌داری میزان باروری را کاهش می‌دهد(۸). البته در تحقیق حاضر انتقال جنین صورت نگرفت و میزان باروری نیز اندازه‌گیری نشد؛ ولی با توجه به درصد بالای خروج جنین از زونا‌پلوسیدا در CEAF می‌توان گفت که یافته Dorfmann قابل بحث و بررسی بوده، اثبات صحت و سقم آن نیاز به انجام تحقیقات گسترده‌تری در این زمینه دارد.

معیار مهم دیگر در ارزیابی نحوه عملکرد محیط کشت، سرعت رشد جنین است (۱). رشدونمو جنین در in vitro نسبت به in vivo در حدود ۱۸ تا ۲۴ ساعت تأخیر دارد(۹). این کاهش سرعت رشد، دلالت بر اهمیت سیگنالهای مادری (از قبیل فاکتورهای رشد) در تنظیم سرعت رشد جنین دارد(۱). یک راه عملی برای غلبه بر این مشکل، افزودن فاکتورهای رشد به محیط کشت است(۱). چنانچه محیط کشتی به‌طور طبیعی حاوی این فاکتورها باشد نیازی به افزودن آنها نیست. نتایج این تحقیق نشان داد که جنینهای موجود در CEAF حداقل چندین ساعت زودتر به مرحله مورولا و بلاستوسیست می‌رسند؛ بدین معنی که سرعت رشدونمو در CEAF بیشتر از محیط شاهد است. Ocampo و همکارانش نیز نتیجه مشابهی را از کشت جنین خوک در CEAm گزارش نموده‌اند(۱۵). چنانچه پیش از این گفته شد مایع آمنیوتیک محتوی فاکتورهای رشد مختلف است، در حالی که محیط کشت سنتتیکی مانند Ham's F-10 کاملاً عاری از چنین فاکتورهایی بوده و احتمالاً غنی‌سازی آن با غلظت ده درصد سرم، نمی‌تواند این فاکتورها را به میزان کافی تأمین نماید.

مقایسه عملکرد غلظتهای مختلف CEAF با یکدیگر نشان داد که وقتی این مایع به صورت خالص مورد استفاده قرار گیرد، شرایط بهتری را برای رشد و نمو جنین فراهم می‌کند. بنابراین احتمالاً CEAF به تنهایی قادر است شرایط مطلوب را برای رشد جنین در in vitro فراهم نماید و هیچ‌گونه نیازی به افزودن آن به‌یک محیط کشت پایه وجود ندارد. در سالهای ۱۹۸۹ و ۱۹۹۳ محققین روش دیگری برای استفاده از CEAF به عنوان محیط کشت بکار گرفته‌اند. در این روش جنین قبل از لانه‌گزینی پستانداران به درون CEAm منتقل شد. براین اساس در سال ۱۹۹۳ Blakewood دو محیط CEAF آسپیره شده و CEAm را با یکدیگر مقایسه کرد و نتیجه گرفت که میزان رشدونمو جنین در CEAF و محیط شاهد یکسان است در حالی که CEAm نسبت به این دو، محیط بهتری را برای کشت جنین فراهم می‌کند(۳). اما باید دانست که حتی اگر کیسه آمنیوتیک، محیط مناسبتری برای کشت جنین باشد، بکارگیری این روش مشکلات زیادی به همراه دارد؛ از جمله اینکه از یک‌سو تکنیک آن بسیار مشکل، پیچیده و وقت‌گیر است(۲) و از سوی دیگر، درصد بالای مرگ‌ومیر جنین مرغ(۲)، خود منجر به از بین رفتن جنینهای کاشته شده در کیسه می‌شود. درحالی که روش پیشنهادی در این پژوهش بسیار ساده‌تر و عملی‌تر به‌نظر می‌رسد.

مایع آمنیوتیک جنین مرغ به‌عنوان یک غنی‌کننده محیط کشت و یا به‌عنوان یک محیط کشت طبیعی می‌تواند به رشدونمو جنینهای قبل از لانه‌گزینی موش کمک کند.

1. Stem Cell Factore
2. S-trypsin

تقدیر و تشکر

طرح تحقیقاتی حاضر، به هزینه جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران انجام شد و محل اجرای آن آزمایشگاه تحقیقاتی پژوهشکده رویان‌است. نگارندگان بر خود فرض می‌دانند که از کارکنان این مراکز بخصوص آقای دکتر کاظمی، آقای بهاروند و همچنین آقای باغستانی (به خاطر انجام امور آماری این طرح) صمیمانه سپاسگزاری کنند.

منابع

1. Bavister BD; Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts, Human Reproduction Update, 1(2): 91-148, 1995.

2. Blakewood EG, Jaynes JM, Johnson WA, Godke RA; Using the amniotic cavity of the developing chick embryo for the in vivo culture of early-stage mammalian embryos, Poultry Science, 68: 1695-1702, 1989.

3. Blakewood EG, Zhang L; The use of chick embryo amniotic fluids for the in vitro culture of early-stage mammalian embryos, Theriogenology, 39: 189,1993.

4. Busch M, Milakofsy L, Hare T, Nibbio B, Epple A; Regulation of substances in allantoic and amniotic fluid of the chicken embryo, Comp. Biochem. physiol A Physiol, 116(2): 131-136, 1997.

5. Chao KH, Chen HF, Wu MY, Yang YSh, Ho HN; Assisted hatching increases the implantation and pregnancy rate of in vitro fertilization (IVF)-embryo transfer (ET), but not that of IVF-tubal ET in patients with repeated IVF failures, Fertility and Sterility, 67(5): 904-908, 1997.

6. Chard T, Blum WF, Brunjes J, Campbell DJ, Wathen NC; Levels of insulin-like growth factor- binding protein-2 and insulin-lkie grouth factor-II in maternal serum, amniotic fluid and extraembryonic Coelomic fluid at 9-20 weeks of pregnancy, Journal of Endocrinology, 142:379-383, 1994.

7. Coetzee JC, Sevenster CBVO, Fourie F, LER, Vandermerwe JV, Helberg LA; In vitro culture of mouse embryos in human amniotic fluid, SAMJ, 76: 62-63,1989.

8. Dorfmann AD, Bender SD, Robinson P, Fugger EF, Bustillo M, Reed G, Schulman JD; Cell-free human amniotic fluid as culture medium for mouse and human embryos, Fertility and Sterility, 51(4): 671-674, 1989.

9. Gardner DK, Lese HJ; Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro, Journal of Reproduction and Fertility, 88: 361-368, 1990.

10. Gianaroli L, Seracchioli R, Ferraretti AP, Trounson A, Flamigni C, Bovicelli L; The successful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human in vitro fertilization, embryo. culture and transfer, Fertility and Sterility, 46(5): 907-913, 1986.

11. Gianaroli L, Trounson A, King C, Ferraretti A, Chiappazzo L, Bafaro G; Human amniotic for fertilization and culture of human embryos: Results of Clinical trials in human in vitro Fertilization (IVF) programs, Journal of in vitro fertilization and Embryo Transfer, 6(4): 213-217, 1989.

12. Gordon JW, Dapunt U; A new mouse model for embryos with a hatching deficiency and its use to elucidate the mechanism of blastocyst hatching, Fertility and Sterility, 59(6): 1296-1301, 1993.

13. Mcmurtry JP, Brocht DM; Development changes in Embryonic and extra-embryonic insulin-like growth factor-I tissue concentrations in the turkey embryo, Poultry Science, 76: 894-900, 1997.

14. Mussuap M, Fanos V, Piccoli A, Zaninotto M, Padovani EM, Plebani M; Low molecular mass proteins and urinary enzymes in amniotic fluid of healthy pregnant women at progressive stages of gestation, Clinical Biochemistry, 29(1): 51-56, 1996.

15. Ocampo MB, Ocampo LC, Suzuki K, Mori T, Ueda J, Shimizu H, Kanagawa H; Development to the blastocyst stage of pig embryos cultured in the amniotic fluid of developing chick embryos, Journal of Veterinary and Medical Science, 55(5): 889-891, 1993.

16. Oettle EE, Wiswedel K; Mouse embryos cultured in amniotic fluid, SAMJ, 76(15): 63-64, 1989.

17. Salgo L, Pal A; Variation in some enzymes in amniotic fluid and maternal serum during prognancy, Enzyme, 41: 101-107, 1989.

18. Srivastava MD, Lippes J, Sahai Srivastava BI; Cytokines of the human reproductive tract, AJRI, 36: 157-166, 1996.

19. Wathen NC, Egembah S, Campbell DJ, Farkas A, Chard T; Level of insulin-like growth factor-binding protein-I increse rapidly in amniotic fluid from 11 to 16 weeks of pregnancy, Journal of Endocrinology ,137: R_1-R_4, 1993.