تأثیر هم‌کشتی سلولهای اپیتلیال آمپولا و ایسموس اویداکت انسان بر جنینهای دو سلولی موش

حسین بهاروند M.Sc.☆، مجتبی رضازاده Ph.D.★♦، احمد حسینی Ph.D.★

☆ جهاددانشگاهی علوم پزشکی ایران، پژوهشکده رویان

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦آدرس مکاتبه : تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان

چکیده

* **هدف:** بررسی تأثیر هم‌کشتی سلولهای اپیتلیال آمپولا و ایسموس اویداکت انسان بر جنینهای موش.

* **مواد و روشها:** پس از تفکیک نواحی آمپولا و ایسموس اویداکتها، سلولهای اپیتلیالی آنها به روش مکانیکی جدا شده و در محیط Ham's F-10 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS: Fetal Calf Serum) کشت داده شدند.

جنینهای دو سلولی موش Swiss Albino که ۳۷-۳۶ ساعت پس از تزریق هورمون کوریونی انسانی (hCG: human Chronic Gonadotropin) بدست آمده بودند، در محیط Ham's F-10+10% FCS، روی تک لایه‌های سلولی حاصل از پاساژ سلولهای آمپولا (A)، ایسموس (I) و گروه کنترل کشت داده شدند و تکوین آنها طی ۱۲۰ ساعت کشت بررسی شد.

* **یافته‌ها:** میزان کل بلاستوسیستها و بلاستوسیستهای در حال خروج از قشر شفاف (هچینگ بلاستوسیستها) پس از ۱۲۰ ساعت کشت در گروههای هم‌کشتی از گروه کنترل بیشتر بود ($P<0.001$ برای A و I).

مقایسه تکوین جنینها بین گروههای هم‌کشتی آمپولا و ایسموس نیز نشان داد که سرعت تکوین جنینها در ۴۸ ساعت اول کشت در آمپولا بیشتر از ایسموس بوده است (۲۴ ساعت: $P<0.001$، ۴۸ ساعت: $P<0.01$).

* **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که احتمالاً فاکتور یا فاکتورهای اویداکتی ناشناخته‌ای، تکوین جنینهای موش را در هم‌کشتی‌ها بهبود می‌بخشد و هم‌کشتی با سلولهای اپیتلیال آمپولا، سبب تکوین بهتر جنینها نسبت به ایسموس می‌شود.

گل واژگان : هم‌کشتی، تکوین جنین، اویداکت

مقدمه

افزایش کیفیت شرایط کشت یکی از جنبه‌های با اهمیت در مطالعات پیش از لانه‌گزینی جنین است، زیرا در شرایط آزمایشگاهی موجود، میزان و سرعت تکوین جنینها (۲،۱)، تعداد سلولها (۳)، فعالیت سنتزی جنینها (۴) و توان زیستی آنها(۵) نسبت به جنینهایی که در محیط *in vivo* رشد یافته‌اند، کمتر است؛ حتی تکوین جنین بعضی گونه‌ها و نژادهای پستانداران در محیط کشت متوقف می‌شود (۶). به همین دلیل تاکنون روشهای مختلفی برای بهبود تکوین جنینها پی‌ریزی شده است که از آن جمله می‌توان به روش هم‌کشتی (Co-Culture) یا کشت همزمان جنین و سلولهای سوماتیک دیگر اشاره کرد. در اواسط دهه ۱۹۶۰ برای اولین بار گزارش شد که با کشت جنینهای موش روی یک لایه از دودمان سلولی HeLa، درصد تکوین و هَچ (hatch) یا خروج از قشر شفاف جنینها افزایش می‌یابد (۷).

تاکنون اثر مثبت سلولهای مختلف از گونه‌های متفاوت نظیر رحم (۹،۸)، اویداکت (۱۹-۹)، کومولوس (۲۰،۲۱)، کلیه (۲۴-۲۲) و فیبروبلاستهای طحال (۲۵) بر تکوین جنینهای همان گونه و یا گونهٔ دیگر گزارش شده است. این داده‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً تأثیر هم‌کشتی به سلول یا گونه خاصی بستگی ندارد. اما علیرغم گزارش تأثیر مفید سلولهای اویداکتی، لازم است مطالعات بیشتری در زمینه هم‌کشتی سلولهای اپیتلیالی نواحی مختلف اویداکت برای تقلید از محیط *in vivo* انجام گیرد.

بدین منظور این مطالعه برای ارزیابی تأثیر هم‌کشتی آمپولا و ایسموس اویداکت انسان بر پیشرفت تکوین جنینهای دو سلولی موش پی‌ریزی شد.

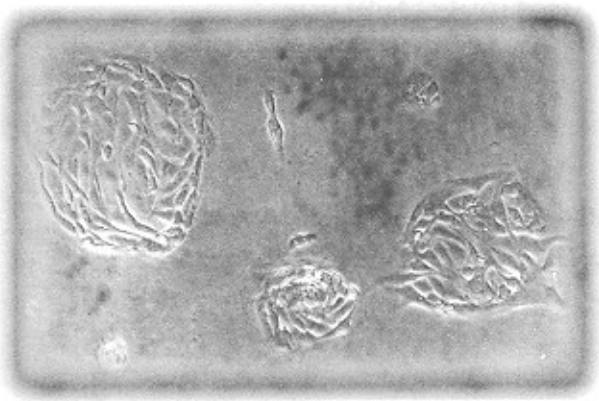
مواد و روشها

* جداسازی سلولهای اپیتلیال اویداکت انسان

در این مرحله لوله‌های رحمی که با عمل هیسترکتومی جدا شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. دقت شد که خانم یائسه نبوده و علائم پاتولوژیک نیز در اویداکت وجود نداشته باشد. پس از انتقال لوله‌ها در محیط کشت Ham's F-10 به آزمایشگاه، بافتهای پیوندی اطراف آنها جدا شده و ناحیه آمپولا و ایسموس از هم تفکیک گردید. سلولهای اپیتلیالی لوله‌ها به طریقی که قبلاً ذکر شد، جدا شدند (۲۶). به‌طور خلاصه، ابتدا یک برش در طول لوله داده شده و سپس با خراشیدن آرام دیواره داخلی لوله با کمک تیغ جراحی، سلولهای اپیتلیالی جدا شدند. برای اطمینان از زنده بودن و اپیتلیالی بودن اغلب سلولها، نمونه زیر میکروسکوپ اینورت مشاهده شد. سلولهای اپیتلیالی دارای شکلی استوانه‌ای و مژه‌های در حال حرکت هستند. سلولهای جدا شده، جمع‌آوری گردیده و با محیط Ham's F-10 حاوی ۱۰ درصد سرم آلبومین گاوی (FCS) با سانتریفوژ (۴۰۰ g) شستشو داده شدند.

* کشت سلولهای اپیتلیال اویداکت انسان

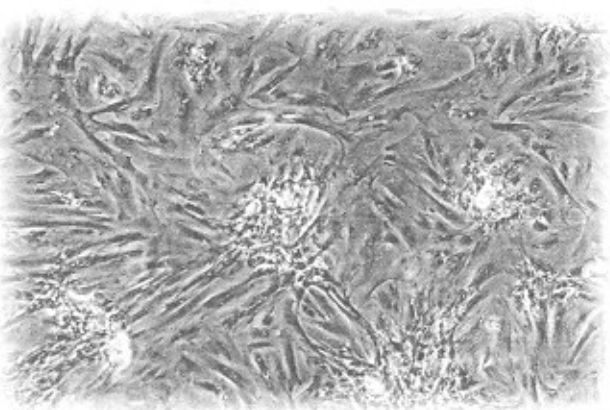
سلولهای هر ناحیه در فلاسکی جداگانه ($25\ cm^2$) حاوی Ham's F-10+10% FCS و در شرایط ۳۷° سانتی‌گراد و گازکربنیک ۵ درصد کشت داده شدند. فلاسکها تا سه روز نباید حرکت داده شوند، زیرا این عمل مانع از اتصال سلولها به کف ظرف می‌شود. پس از سه روز، جزایر کوچکی از سلولهای مزبور در کف ظرف مشاهده می‌شود (شکل ۱). از روز سوم با تشکیل تک لایه‌ای از سلولهای مزبور که معمولاً دو هفته به طول می‌انجامد، به‌طور یک روز در میان محیط کشت تعویض می‌شود. با تشکیل تک لایه‌ای از سلولها، با کمک محلول [تریپسین (۰/۵ درصد) و EDTA (۰/۲ mg/ml)(Gibco)] حاوی محلول بافر فسفات (PBS: Phosphate-Buffered Saline)، سلولها را از کف ظرف کنده و پس از دوبار شستشو با سانتریفوژ (۴۰۰g) دوباره کشت داده شدند.



شکل ۱: جزایر حاصل از کشت اولیه سلولهای اپیتلیال اویداکت انسان پس از سه روز کشت

* تهیه سلولها برای هم کشتی

پاساژ سوم سلولهای آمپولا و ایسموس در ظرفهای چهارخانه Nunc به تعداد ۸۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر انجام شد. پس از تشکیل تک‌لایه‌ای از سلولها (شکل ۲)، محیط آنها تعویض شده و دو روز بعد، جنینهای دوسلولی روی آنها کشت داده شدند.



شکل ۲: تک‌لایه‌ای از سلولهای اپیتلیال اویداکت انسان پس از پاساژ و قبل از هم‌کشتی

* تهیه جنینهای موش

به موشهای ماده نژاد Swiss Albino با سن ۶-۸ هفته، ۷/۵ iu گنادوتروپین مشتق از سرم مادیان (PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin, Sigma) تزریق شد. این موشها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. پس از ۴۸ ساعت به آنها هورمون کوریونی انسانی (hCG, Serono) تزریق شد و به صورت جفت با موشهای نر در قفسهای جداگانه گذاشته شدند. صبح روز بعد پلاک واژنی نمایانگر عمل جفت‌گیری بود. ۳۷-۳۶ ساعت پس از تزریق hCG، جنینهای دوسلولی از اویداکت خارج شدند و پس از جمع‌آوری تمام جنینها در محیط Ham's F-10+10% FCS بین گروههای ایسموس ، آمپولا و کنترل که تنها حاوی محیط و سرم ۱۰ درصد بود، توزیع شدند.

* ارزیابی تکوین جنینها

تکوین جنینها هر ۲۴ ساعت یک بار و طی ۵ روز کشت توسط میکروسکوپ اینورت مشاهده شد. جنینهای با ۲۵ درصد فراگمنتاسیون (Fragmentation) یا بیشتر و دارای سیتوپلاسم غیرشفاف یا جمع شده، دژنره محسوب شدند.

* آنالیزآماری

اختلاف تکوین و دژنراسیون بین کشت‌های متفاوت با آزمون χ^2 بررسی شد و اختلافات با $P<0.05$ معنی‌دار محسوب شدند.

یافته‌ها

میزان تکوین جنینها در سه گروه کشت آمپولا (A)، ایسموس (I) و کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. درصد جنینهای چهار سلولی و مورولا به‌ترتیب پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت و میزان جنینهایی که پس از ۷۲ ساعت به مورولا یا بلاستوسیست رسیده‌اند؛ به طور معنی‌داری در گروههای هم‌کشتی از کنترل بیشتر بود (۲۴ ساعت: $P<0.01$ برای A، $P<0.01$ برای I، ۴۸ ساعت: $P<0.001$ برای A و I، ۷۲ ساعت: $P<0.001$ برای A، $P<0.05$ برای I). به همین ترتیب درصد هچینگ بلاستوسیستها یا بلاستوسیستهای در حال خروج از قشر شفاف (شکل ۳) پس از ۹۶ و ۱۲۰ ساعت کشت در هم‌کشتیها از گروه کنترل بیشتر بود (۹۶ ساعت: $P<0.01$ برای A، $P<0.05$ برای I، ۱۲۰ ساعت: $P<0.001$ برای A و I).

در مقایسه تکوین جنینها بین گروههای هم‌کشتی آمپولا وایسموس ، سرعت تکوین جنینها در ۴۸ ساعت اول کشت در آمپولا بیشتر از ایسموس بود (۲۴ ساعت: $P<0.01$ و ۴۸ ساعت: $P<0.01$).

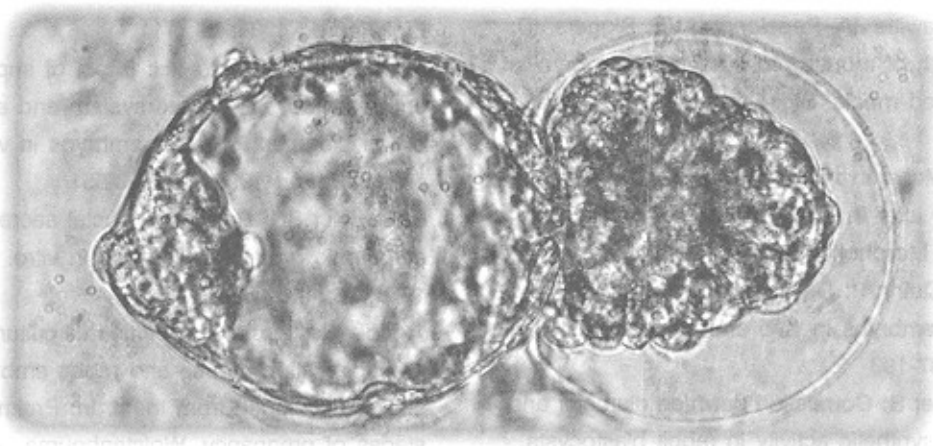
جدول ۱: میزان تکوین جنینها طی ۱۲۰ ساعت کشت درگروههای هم کشتی وکنترل

تیمار	تعدادجنین	تکرار	۲۴ساعت ۴سلولی	۴۸ساعت M	۷۲ساعت M+B	۹۶ساعت HB	۱۲۰ساعت B	۱۲۰ساعت HB
آمپولا	۱۷۷	۵	۱۴۲(۸۰)*	۱۴۲(۸۰)*	۱۲۷(۷۲)*	۳۰(۱۷)**	۷۹(۴۵)*	۳۸(۲۲)*
ایسموس	۱۶۷	۵	۸۱(۴۹)**	۱۱۴(۶۸)*	۱۱۰(۶۶)***	۲۴(۱۴)***	۶۹(۴۱)*	۳۶(۲۲)*
کنترل	۱۷۲	۵	۵۷(۳۳)	۸۵(۴۹)	۹۱(۵۳)	۱۱(۶)	۲۸(۱۶)	۱۳(۸)

مقادیر داخل پرانتز نشان دهندهٔ درصد است.

* $p<0.001$, ** $P<0.01$, *** $P<0.05$

M=Morula, B=Blastocyst, HB=Hatching Blastocyst



شکل ۳: جنین در حال خروج از قشر شفاف (هچینگ بلاستوسیست)

بحث

در این مطالعه جنینهای دو سلولی ابتدایی موش با سلولهای اپیتلیال نواحی آمپولا و ایسموس اویداکت انسان کشت داده شدند. مقایسه وضعیت جنینها در گروههای هم‌کشتی و کنترل نشان داد که جنینها در گروههای هم‌کشتی بهتر تکوین یافته و دژنراسیون کمتری دارند.

قبلاً نیز تأثیر مثبت اکسپلانتهای اویداکت انسان و تک لایه‌های سلولهای آمپولای انسانی بر جنینهای دو سلولی موش گزارش شده است (۳۰-۲۷). تنوع نتایج حاصله در چنین مطالعاتی، انعکاس دهندهٔ وضعیت سلولهای تک‌لایه یا شرایط محیطی است که سلولها در آن نگهداری می‌شوند (۳۱)؛ شرایطی نظیر سن جنین یا نژاد موش نیز دارای اهمیت است (۳۲).

در مورد نحوهٔ عملکرد هم‌کشتی‌ها بر جنین، مکانیسمهای دقیقی ارائه نشده است. برخی معتقدند که این عمل از طریق حذف مواد سمی، تغییر متابولیتهای موجود، ترشح مواد امبریوتروفیک یا مخلوطی از آنها صورت می‌گیرد (۴۱-۳۳).

امروزه مشخص شده که جنین یک موجود پویا است و نسبت به سیگنالهای اتوکرینی و پاراکرینی محیطی پاسخ می‌دهد، به‌طوری‌که با کشت گروهی جنینها، تکوین آنها بهتر می‌شود (۴۲) و این نشانگر اهمیت برهم‌کنش ترشحات آنها است. همچنین نشان داده شده که میزان تجلی ژن گیرنده اکتیوین در جنینهای انسانی در حضور سلولهای استرومای آندومتر انسان افزایش می‌یابد (۴۳) و یا دودمان سلولی مشتق از کلیه میمون (Vero) با ترشح ماده‌ای به وزن ۱۰۰ کیلودالتون سبب افزایش هچ جنینها یا خروج از قشر شفاف آنها می‌شوند (۴۴). بنابراین به‌نظر می‌رسد بر هم‌کنشهای اتوکرینی و پاراکرینی بین جنین و محیط اطرافش در افزایش کیفیت جنین مؤثر باشد.

از طرفی سلولهای هم‌کشتی با تغییر متابولیتهای موجود در محیط کشت، متابولیسم جنین را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند (۴۵). به‌طوری‌که مشاهده شده است که میزان گلوکز در محیطهای هم‌کشتی حاوی سلولهای اویداکتی نسبت به محیط کشت اولیه کاهش یافته و لاکتات آن افزایش می‌یابد(۴۵). لاکتات می‌تواند به عنوان یک منبع انرژی برای جنینهای در حال تسهیم هامستر و موش باشد؛ در ضمن آنکه pH درون سلولی و تعادلی احیائی[1]، جنین را حفظ می‌کند (۴۷،۴۶). بدین ترتیب ممکن است سیستمهای هم‌کشتی کیفیت جنینها را در مراحل اولیه بهتر کرده تا این جنینها قادر باشند در زمانهای بعدی از هچ بهتری برخوردار شوند.

مجموع چنین عواملی سبب بهبود تکوین، تسهیم، فعالیت بیوشیمیایی و لانه‌گزینی جنینها می‌شود. مطالعات قبلی ما بر هم‌کشتی سلولهای اپیتلیال اویداکت هامستر و جنینهای موش نیز نشان داد که میزان تکوین و تسهیم جنینها افزایش می‌یابد (۴۸).

از سوی دیگر مشاهده شد که در ۴۸ ساعت اول کشت، درصد مورولا در گروه آمپولا نسبت به هم‌کشتی با سلولهای اپیتلیال ایسموس بیشتر بود. چنین تفاوتی می‌تواند انعکاس دهنده تفاوت ترشحات این دو ناحیه یا تفاوت در نحوهٔ عملکردهای دیگر آنها باشد. به‌طوری‌که نشان داده شده است اگر چه ترشحات نواحی آمپولا و ایسموس تشابه فراوان دارند، امّا هر ناحیه دارای ترشحات خاص خود است (۴۹).

مطالعات ما در هم‌کشتی سلولهای اپیتلیال اویداکت هامستر نیز نشان داد که جنینهای موش از قدرت تکوین و تسهیم بهتری نسبت به ناحیه ایسموس برخوردارند (۴۸).

بدین ترتیب این یافته‌ها نشان می‌دهد که تک لایه‌های سلولهای اویداکتی، مدلهای خوبی برای بررسی نقش نواحی مختلف اویداکت بر تکوین جنین و تعیین عوامل پیش‌برندهٔ رشد آن هستند و ممکن است سلولهای ناحیه آمپولا، نقش مهمتری را در زمینه تکوین جنین ایفاء کنند.

تقدیر و تشکر

این تحقیق بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۱۱-۲۱۸ مصوب جهاد دانشگاهی بوده که در مؤسسه رویان انجام شده است. نگارندگان مراتب تقدیر خود را از جناب آقای دکتر نعمت‌اللهی ابراز می‌دارند.

1. Redox balance

References

1. Erbach GT, Lawitts JA, Papaionnou VE, Biggers JD: Differential growth of mouse preimplantation embryo in chemically defined media. Biol Reprod 1994; 50: 1027-1033

2. Bowman P, McLaren A: Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. J Embryol Exp Morphol 1970; 23: 693-704

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

4. Jung T, Fischer B: Correlation between diameter and DNA or protein synthetic activity in rabbit blastocysts. Biol Reprod 1988; 39: 1111-1116

5. Carney EW, Foote RH: Effect of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. J Reprod Fert 1990; 89: 543-551

6. Bavister BD: Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. Theriogenology 1988; 26: 143-154

7. Cole RJ, Paul J: Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit embryos and cell strains developed from them. In: Preimplantation stages of pregnancy, Wolstenhoume GEW, O'Conner M, Boston Mass, Little Brown, Co Inc (eds), 1965, pp

82-155
8. Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Xu K, Veeck L, Damario MA, Rosenwaks Z: Human preembryo development on autologous endometrial co-culture versus conventional medium. Fertil Steril 1998; 70: 1109-1113
9. Sakkas P, Trouson AO: Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pregnancy. J Reprod Fert 1990; 90: 109-118
10. Carney EW, Tobback C, Foote RH: Co-culture of rabbit one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. In Vitro Cell Dev Biol 1990; 26: 629-635
11. Gandolfi F, Moore M: Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J Reprod Fertil 1987; 81: 23-28
12. Rexroad CE, Powell AM: Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. Theriogenology 1988; 29: 387-397
13. Eyestone WH, First NL: Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J Reprod Fert 1989; 85: 715-720
14. Ellington JE, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE, Mc-Grath AB: Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to morula or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. J Reprod Fert 1990; 89: 293-299
15. White KL, Hehnke K, Rickords LF, Southern LL, Thompson DL, Wood TC: Early embryonic development in vitro by co-culture with oviductal epithelial cells in pigs. Biol Reprod 1989; 41: 425-430
16. Bongso A, Ng SC, Sathananthan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS: Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. Hum Reprod 1989; 4: 706-713
17. Yadav PS, Saini A, Kumar A, Jain GC: Effect of oviductal cell co-culture on cleavage and development of goat IVF embryos. Animal Reprod Sci 1998; 51: 301-306
18. Vlad M, Oakley W, Kennedy RC: Allocation of cells to trophoectoderm and inner cell mass in mouse and human embryos co-cultured with epithelial and fibroblast cell lines. Hum Reprod, 1998; 13(4): 266-267.
19. Frasor J, Sherbahn R, Barbara S, Mold MW, Binsor Z: Optimizing tubal epithelial cell growth promotes mouse embryo hatching in co-culture. J Assist Reprod Genet 1996; 13: 423-430
20. Goto K, Kajihara Y, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K: Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos dervied from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. J Reprod Fert 1988; 83: 753-758
21. Zukin V, Zinchenko V; Pregnancy rate after transfer of embryos co-cultured on granulosa cells for 3 and 4 days. Hum Reprod 1998; 13(4): 267-268
22. Valojerdi RM, Hosseini A, Nematollahi N, Mozdarani H: The effect of vero cell on development of two cell mouse embryos. MEFS J 1997; 2: 35-41
23. Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC: Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayers of vero cells. Biol Reprod 1990; 42: 301-306
24. Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J, Menezo Y: Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. Hum Reprod 1990; 5: 737-743
25. Kim HN, Hu YX, Roussel JD, Godke RA: Culturing murine embryos on bovine fetal spleen cell fibroblast and chick embryo fibroblast monolayers. Theriogenology 1989; 21: 211
26. Bongso A, Ng SC, Sathananthan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS: Establishment of human ampullary cell culture. Hum Reprod 1989; 4: 486-494
27. Hoshi K, Kanno Y, Katayose H, Yanagida K, Suzuki R, Sato A: Co-culture of mouse embryos with cryopreserved human oviduct epithelial cells. J Assist Reprod Genetic 1994; 11: 367-372
28. Freeman MR, Bastias MC, Hill GA, Osteen KG: Co-culture of mouse embryos with cells isolated from the human ovarian follicle, oviduct and uterine endometrium. Fertil Steril 1993; 59: 138-142
29. Goldberg JM, Khalifa E AL-DM, Friedman CI, Kim MH: Improvement of in vitro fertilization and earlyembryo development in mice by co-culture with human fallopian tube epithelium. Am J Obstet Gynecol 1991; 165: 1802-1805
30. Takeuchi K, Nagata Y, Sandow BA, Hodgen GD: Primary culture of human fallopian tube epithelial cells and co-culture of mouse pre-embryos. Mol Reprod develop 1992; 32: 236-242
31. Thibodeaux JK, Godke RA: In vitro enhancement of early-stage embryos with co-culture. Arch Pathol Lab Med 1992; 116: 364-372

32. Suzuki O, Asono T, Yamamoto Y, Takano K, Koura M: Development in vitro of preimplantation embryos from 55 mouse strains. Reprod Fert Dev 1996; 8: 975-980
33. Bongso A, Ng SC, Fong CY: Ratnam: Co-cultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Fertil Steril 1991; 56: 179-191
34. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam: Co-cultures: their relevance to assisted reproduction. Hum Reprod 1990; 5: 893-900
35. Bongso A, Fong CY: The effect of co-culture on human zygote development; Current Opin in Obstet gynecol 1993; 5: 585-593
36. Guerin P, Menezo Y: Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. Zygote 1995; 3: 333-343
37. Minami N, Utsumi K, Iritani A; Effects of low molecular weight oviductal factors one the development of mouse one-cell embryos in vitro. J Reprod Fert 1992; 96: 735-745
38. Kurachi H, Morishige KI, Imai T, Homman H, Masumota N, Yoshimoto Y, Miyake A: Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in fallopian tube epithelium their role in embryogenesis. Horm Res 1994; 41(1): 48-54
39. Nancarrow CD, Hill JL: Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct specific glycoproteins. Cell Biol International 1994; 18: 1105-1114
40. Lin LP, Chan ST, Ho PC, Yeung WS: Human oviductal cells produce high molecular weight factor(s) that improves the development of mouse embyros. Hum Reprod 1995; 10: 2781- 2786
41. Liu LPS, Chan STH, Ho PC, Yeung WSB: Partial purification of embryotrophic factors from humanoviductal cells. Hum Reprod 1998; 13: 1613-1619
42. Moessner J, Dodson WC; The quality of human embryo growth is improved when embryos are cultured in groups rather than seperately. Fertil Steril 1995; 64: 1034-1035
43. He ZY, Liu HC, Mele C, Barmat L, Veeck L, Davis O: A possible interaction between embryo and endometrium via activin and their receptors. In: The 13th Annual Meeting of the Eshre Edinburgh, Scotland, June 1997, pp 22-25
44. Chen HF, Ho HN, Chen SU, Chao KH, Lin HR, Huang SC, Lee TY, Yang YS: Peptides extracted from vero cell cultures overcome the blastocyst block of mouse embryo in a serum-free medium. J Assist Reprod Genet 1994; 11: 165-171
45. Rieger D, Grisart B, Semple E, Van Langendonckt A, Betteridge KJ, Dessy F: Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. J reprod Fert 1995; 105: 91-98
46. Leese HJ: Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. In oxford Reviews of Reproductive Biology, Ea. SR Milligan. Oxford Univeristy Press, Oxford, 1991, pp 35-72
47. Bavister BD: Culture of preimplantion embryos: Facts and artifacts. Hum Reprod Update 1995; 1: 91-148
۴۸. بهاروند حسین، رضازاده مجتبی، الطریحی تقی: مقایسه تکوین جنینهای موش در هم‌کشتی با سلولهای اپیتلیال نواحی آمپولا و ایسموس اویداکت هامستر و تأثیر عملکرد گنادوتروپین‌های تزریقی بر کیفیت اثر هم‌کشتی. یاخته، بهار ۱۳۷۸، پیش شماره ۱، صفحات ۱۳-۷
49. Nieder GL, Macon GR; Uterine and oviductal protein secretion during early pregnancy in the mouse. J Reprod Fert 1987; 81: 287-294