تاثیر فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت – ماکروفاژ بر تکوین و کیفیت جنینهای دو سلولی موش

بهناز شیخ‌الاسلامی M.Sc.[☆]، مژده صالح‌نیا Ph.D.[☆♦]، مجتبی رضازاده Ph.D.[☆☆]

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

☆ پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس،گروه علوم تشریح

پست الکترونیک: Email:mojdeh@dr.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۷/۱۹، پذیرش مقاله: ۸۳/۱۰/۲۷

*** هدف:** مقایسه تکوین جنینهای دو سلولی در حضور و غیاب فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت- ماکروفاژ (GM-CSF)

*** مواد و روشها:** موشهای نژاد NMRI پس از تحریک تخمک‌گذاری با روشهای مرسوم و انجام جفت‌گیری، در روز دوم حاملگی با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و جنینهای دو سلولی تخلیه شده (۲۹۹ جنین) و درون قطرات محیط کشت قرار داده شدند و در دو گروه کشت شدند: یک گروه شاهد شامل جنینهای دو سلولی (۱۵۲ جنین) در محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی و یک گروه تجربی (۱۴۷ جنین) که در محیط آنها ۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF نیز افزوده شده بود و تکوین جنینهای دو سلولی به مدت ۱۲۰ ساعت روزانه بررسی شد و از نظر کیفیت، تعداد کل سلول بلاستوسیستها و قطر آنها محاسبه شد.

*** یافته‌ها:** جنینهای دو سلولی در حضور فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت - ماکروفاژ در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از برداشت، سرعت تکوینی بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند ($p<0/005$) علاوه بر آن، در گروه شاهد و گروه حاوی GM-SCF به ترتیب ۶۵/۷۸ و ۷۴/۸۲ درصد به مرحله بلاستوسیت رسیدند. قطر بلاستوسیستهای حاصل از آنها در دو گروه فوق به ترتیب ۱۲۵/۴۰ و ۱۲۸/۰۲ میکرومتر بود و تعداد کل سلول بلاستوسیست‌های حاصل از این دو گروه ۷۴/۲۰ و ۸۰/۰۰۲ سلول بود از نظر آماری اختلاف معنی‌داری از حیث قطر و تعداد سلول در بلاستوسیستها مشاهده شد ($p< 0/05$).

*** نتیجه گیری:** به نظر می‌رسد با افزودن این فاکتور به محیط کشت ساده بتوان تکوین جنینها را در *In vitro* بهبود بخشید.

گل واژگان: فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت ، ماکروفاژ، جنین دوسلولی، بلاستوسیست

نشریه پزشکی یاخته، سال هفتم، بهار ۸۴ ، شماره ۲۵، صفحات ۲۸-۲۵

مقدمه

پیشرفت در تکنولوژیهای تولید مثلی، کمک زیادی به انواع مشکلات باروری کرده است، اما هنوز عامل عمده در موفقیت IVF، کیفیت مناسب جنین انتقال یافته است. اکثر تحقیقاتی که بر روی تکوین جنین در *In vitro* صورت گرفته نشان می‌دهد که اگر چه تشابهات بسیاری بین حوادث *In vivo* و *In vitro* هست، اما سرعت تقسیم و زمان‌بندی مراحل جنینی در *In vitro* تحت تأثیر اعمال انجام گرفته در آزمایشگاهها، آسیب می‌بینند و کندتر می‌شوند. محیطهای کشت جنین اجزای بسیار متنوعی دارند و به نظر می‌رسد اختلاف ناچیزی در توانایی آنها برای حفظ تکوین جنین وجود دارد. این مساله باعث سردرگمی در انتخاب محیط کشت جنین و شناخت نقش اجزای خاص آن در تکوین جنین شده است. دو روش عمده کشت برای حفظ طولانی مدت جنین در محیط کشت وجود دارد. اینها شامل کشت در حضور سلولهای تغذیه کننده (Co- culture system) و کشت با مواد تعیین شده (Defined media) هستند (۱).

در سالهای اخیر تاثیر فاکتورهای رشد و سیتوکینهای مختلف بر تکوین جنینهای پیش از لانه‌گزینی در *In vivo* و *In vitro* بررسی شده است (۲، ۳، ۴). در سیستمهای مختلف بدن، پپتیدها در تکثیر سلولهای طبیعی و سرطانی و تمایز برخی سلولها اهمیت دارند، در سیستم تولید مثلی از سلولهای اپی‌تلیالی رحم و لوله رحمی ترشح شده و قادر به تنظیم رشد و تکوین جنین پیش از لانه‌گزینی هستند (۲، ۳، ۴، ۵). تحقیقات نشان داده است که برخی از این فاکتورها در تکوین جنین حیاتی هستند، اما برخی دیگر به صورت اتوکرینی و پاراکرینی از جنین ترشح می‌شوند و اثرات مختلفی را در زمانهای متفاوت بر جنین پیش از لانه گزینی اعمال می‌کنند. علاوه بر آن، به نظر می‌رسد برخی از این فاکتورهای پاراکرینی سیگنالهایی بین توده سلول داخلی (ICM: Inner Cell Mass) و تروفوکتودرم (TE: Trophechtoderm) هستند (۵).

فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت ماکروفاژ (GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) نیز یکی از فاکتورهای خانواده لنفوهماتوپویتیکی است که از بافتها و سلولهای مختلف با منشا جنینی متفاوت به دست آمده است (۶). در سیستم تولید مثلی این فاکتور از رحم و لوله رحمی به دست می‌آید و منبع اصلی ترشحی آن سلولهای اپی‌تلیالی پوشش رحم و لوله رحمی

است (۱۱-۶). گیرنده GM-CSF در جنین همه مراحل پیش از لانه‌گزینی موش (۱۲) و تروفوکتودرم ICM بلاستوسیست انسان (۱۳) بروز می‌کند. در موش حداکثر ترشح آن طی استروس و اوایل حاملگی (دوره پیش از لانه‌گزینی) است (۱۴) و در زمان لانه‌گزینی در پاسخ به ترشح پروژسترون ترشح آن به شدت کاهش می‌یابد (۱۵).

مطالعات محدودی اثرات GM-CSF نوترکیبی را بر تکوین جنین پیش از لانه‌گزینی بررسی نموده‌اند (۱۸-۱۵). صرف نظر از چگونگی آماده‌سازی GM-CSF نوترکیب انسانی (rhGM-CSF)، افزودن ۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آن به محیط کشت جنین انسان تکوین جنین ۲ تا ۴ سلولی به مراحل بلاستوسیست، بلاستوسیست در حال خروج از زونا و میزان چسبیدن آنها به ظرف کشت را از ۳۰ درصد به ۷۶ درصد افزایش داده است (۱۵). علاوه بر این جنینهای ۴-۲ سلولی میزان تقسیم بیشتری در محیط کشت حاوی rh GM-CSF داشته‌اند و اولین بلاستوسیستها حدود ۲۴ ساعت زودتر از گروه کنترل تشکیل شده‌اند (که نشان‌دهنده تکوین بالای آنها است). در این آزمایشات GM-CSF عقب‌ماندگی تکوینی که ویژگی رشد جنین در *In vitro* را تا حدودی جبران کرده است (۱۵).

تحقیقات نشان داده است که جنینهای دو سلولی موشهای با نقص ژنتیکی در GM-CSF در تشکیل بلاستوسیست تاخیر دارند و تعداد کل سلول بلاستوسیست آنها بسته به اینکه حاملگی طبیعی یا تحریک تخمک‌گذاری شده باشد به ترتیب ۱۴ و ۱۸ درصد کاهش یافته است. افزودن GM-CSF نوترکیب به محیط کشت جنینهای دو سلولی موشهای سالم و دارای نقص ژنتیکی در GM-CSF تعداد کل سلولهای بلاستوسیست حاصل از آنها را ۲۱ و ۲۴ درصد افزایش داده است (۱۸).

با توجه به ترشح وابسته به سیکل GM-CSF و بروز گیرنده آن در جنین پیش از لانه گزینی (۸، ۱۱) و نتایج متفاوتی که تاکنون ارائه شده است، در این تحقیق تکوین جنین دو سلولی موش در محیط کشت حاوی GM-CSF نوترکیبی (۲ نانو گرم بر میلی لیتر) با گروه کنترل مقایسه شده است، تا به این سوال پاسخ داده شود که آیا GM-CSF بر تکوین جنین دو سلولی مفید است یا خیر؟

مواد و روشها

موشهای ماده نژاد NMRI با سن ۱۰-۶ هفته با تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد (pMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin) و ۴۸ ساعت بعد با تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد (hCG: Human Chorionic Gonadotropin) تحریک تخمک‌گذاری شدند و درون قفسهای نر قرار گرفتند. صبح روز بعد پلاک واژن آنها به منظور تایید حاملگی بررسی شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق hCG موشهای حامله با جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند و ۲۹۹ جنین دو سلولی از لوله رحمی آنها فلاش شد و به شکل تصادفی در دو گروه کنترل و تجربی قرار گرفتند.

جنینهای گروه شاهد (۱۵۲ جنین) در محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (BSA: Bovine Serum Albomin) و گروه تجربی (۱۴۷ جنین) در محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA و ۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF کشت شدند (۱۲).

تکوین جنینهای دو سلولی به صورت روزانه تا ۱۲۰ ساعت پس از برداشت جنین به وسیله میکروسکوپ معکوس بررسی و گزارش شد. همچنین قطر بلاستوسیستها با Eye piece کالیبره شده اندازه‌گیری شد.

به منظور شمارش کل سلول بلاستوسیستهای حاصل از جنینهای دوسلولی بلاستوسیستها در مراحل Hatched و Hatching مورد استفاده قرار گرفتند. بلاستوسیستها در محلول (محیط کشت) T6 با یک درصد ترایتون X-۱۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروپیدیوم آیوداید به مدت ده ثانیه قرار داده شد. بلاستوسیستهای رنگ‌آمیزی شده مستقیماً از محلول به گلیسرول منتقل و پس از آن روی لام قرار گرفت. شمارش سلولی در زیر میکروسکوپ فلوروسنت با طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت (۱۹). اطلاعات مربوط به رشد و تکوین جنین با روش مجذور کا (Chi-square) بررسی شد. از روش آنالیز واریاسیون یک طرفه (ANOVA) برای مقایسه شمارش کل سلولی و میانگین قطر بلاستوسیستها استفاده شد.

یافته‌ها

خلاصه‌ای از تکوین روزانه جنینهای حاصل از کشت جنینهای دو سلولی تا ۱۲۰ ساعت پس از برداشت در جدول یک آورده شده است. پس از ۲۴ ساعت کشت در گروه شاهد ۵۷/۸۹ و ۱۳/۱۵ درصد از جنینها به ترتیب به مرحله چهار و هشت سلولی رسیدند و درصد تکوین جنینها به مراحل ذکر شده قبل در گروه حاوی GM-CSF به ترتیب ۶۶/۶۶ و ۱۳/۶۰ درصد بود که تفاوت آماری بین این دو گروه دیده نشد.

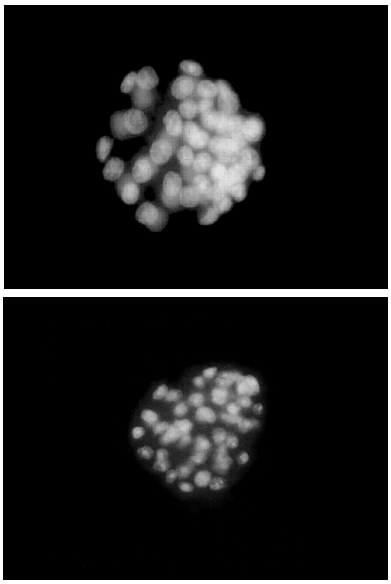
تکوین جنینها پس از ۴۸ ساعت نشان داد که در گروه شاهد ۱۰/۵۲، ۱۵/۷۸، ۵۳/۲۸ و ۹/۸۶ درصد از جنینها به ترتیب در مراحل دو، چهار، هشت سلولی و مورولا بودند، اطلاعات مشابه در گروه حاوی GM-CSF به ترتیب ۴/۰۸، ۲۳/۸۰، ۴۷/۶۱ و ۲۴/۴۸ بود. پس از ۷۲ ساعت کشت در گروه شاهد ۴۰/۱۳، ۸/۵۵ و ۱/۹۷ درصد از جنینها به مرحله مورولا، بلاستوسیست و خروج از زونا رسیدند و این در حالی است که در گروه حاوی M-CSF، ۴۵/۳۹، ۱۷ و ۱/۳۶ درصد از جنینها به مراحل تکوینی یاد شده رسیدند.

مقایسه تکوین روزانه جنینها نشان داد که در حضور GM-CSF در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از برداشت، سرعت کلیواژی بیشتری نسبت به گروه شاهد در رسیدن به مرحله مورولا و بلاستوسیست داشتند که از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0/05$). پس از ۹۶ ساعت کشت ۳۵/۵۲ و ۱۳/۸۱ درصد از جنینهای گروه شاهد به ترتیب به مرحله بلاستوسیست و خروج از زونا رسیدند و همچنین در گروه حاوی GM-CS ۵۳/۴۳ و ۱۷ درصد از جنینها به مراحل تکوینی یاد شده رسیدند. پس از گذشت ۱۲۰ ساعت از کشت جنین درصد بلاستوسیستهای حاصل از جنینهای ۲ سلولی در دو گروه شاهد و حاوی GM-CSF به ترتیب ۶۴/۴۰ و ۷۰/۸۷ درصد بود که از این میزان به ترتیب ۴۴/۷۰ و ۵۳/۵۴ درصد به مرحله خروج از زونا رسیدند که این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود.

جدول ۱: بررسی تکوین روزانه جنینهای دو سلولی در گروه شاهد و حاوی GM-CSF تا ۱۲۰ ساعت پس از کشت

زمان	۲۴ ساعت پس از برداشتن جنین		۴۸ ساعت پس از برداشتن جنین		۷۲ ساعت پس از برداشتن جنین		۹۶ ساعت پس از برداشتن جنین		۱۲۰ ساعت پس از برداشتن جنین	
گروه	شاهد	GM-CSF	شاهد	GM-CSF	شاهد	GM-CSF	شاهد	GM-CSF	شاهد	GM-CSF
دو سلولی (٪)	۳۹ (۲۵/۲)	۲۹ (۱۹/۷۲)	۱۶ (۱۰/۵۲)	۶ (۴/۰۸۰)	۴ (۲/۶۳)	۶ (۴/۰۸)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)
چهار سلولی (٪)	۸۸ (۵۷/۸۹)	۹۸ (۶۶/۶۶)	۲۴ (۱۵/۷۸)	۳۵ (۲۳/۸۰)	۹ (۵/۹۲)	۷ (۴/۷۶)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)
هشت سلولی (٪)	۲۰ (۱۳/۱۵)	۲۰ (۱۳/۶۰)	۸۱ (۵۳/۲۸)	*۷۰ (۴۷/۶۱)	۳۴ (۲۲/۳۶)	۳۹ (۲۶/۵۳)	۱۶ (۱۰/۵۲)	۱۵ (۱۰/۲۰)	۰ (۰)	۰ (۰)
مورولا (٪)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱۵ (۹/۸۶)	۳۶ (۲۴/۴۸)	۶۱ (۴۰/۱۳)	۵۸ (۳۹/۴۵)	۳۰ (۱۹/۷۳)	۲۸ (۱۹/۰۴)	۱۸ (۱۱/۸۴)	۱۸ (۱۱/۸۴)
بلاستوسیست (٪)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱۳ (۸/۵۵)	*۲۵ (۱۷)	۵۴ (۳۵/۵۲)	۶۴ (۴۳/۵۳)	۳۱ (۲۰/۳۹)	۳۱ (۲۰/۳۹)
خروج از زونا (٪)	۵ (۳/۳)	۰ (۰)	۱۶ (۱۰/۵۲)	۰ (۰)	۲۸ (۱۸/۴۲)	۱۰ (۶/۸۰)	۲۱ (۲۰/۳۹)	۱۵ (۱۰/۲۰)	۳۴ (۲۲/۳۶)	۳۴ (۲۲/۳۶)

* تکوین جنینهای دو سلولی در حضور GM-CSF با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵) پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت. تعداد جنینها در گروه شاهد ۱۵۲ و در گروه GM-CSF ۱۴۸ عدد بود.



شکل ۱: نمایی از یک بلاستوسیست رنگ شده با پروپیدیوم آیوداید در گروه کنترل نمایی از یک بلاستوسیست رنگ شده با پروپیدیوم آیوداید در گروه حاوی GM-SCF

(مشاهده تصویر رنگی در انتهای مقالات)

جدول ۲: مقایسه قطر و شمارش سلولی بلاستوسیستهای حاصل از جنینهای دو سلولی موش در حضور و غیاب GM-CSF

	قطر بلاستوسیست		تعداد سلول بلاستوسیست	
گروه	No.	Mean±SD	No.	Mean±SD
کنترل	۱۰۰	۱۲۵/۴۰±۸/۲۰	۵	۷۴/۲۰±۴/۳۸
GM-CSF	۱۰۰	۱۲۸/۰۲±۱۴/۱	۵	۸۰±۳/۱۶

از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین قطر و تعداد سلول بلاستوسیستهای شاهد و GM-CSF وجود داشت (P<۰/۰۵)

میزان جنینهای دژنره برای جنینهای دو سلولی در دو گره شاهد و حاوی GM-CSF ۱۲۰ ساعت پس از برداشت جنین به ترتیب ۲۱/۹۷ و ۲۰/۴۷ درصد بود که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). میانگین قطر بلاستوسیستها در گروههای شاهد و حاوی GM-CSF به ترتیب (۸/۲۰ ± ۱۲۵/۴۰) و (۱۴/۹۱±۱۲۸/۰۲) میکرومتر بود که از نظر آماری تفاوت معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) و جنینهای کشت شده در حضور GM-CSF بلاستوسیستهای بزرگتری داشتند (جدول ۲). همچنین پس از شمارش سلولی بلاستوسیستهای (شکل ۱) حاصل از تکوین جنینهای دو گروه فوق نیز به ترتیب (۴/۳۸±۷۴/۲۰) و (۳/۱۶±۸۰/۰) بود (جدول ۲) که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

بحث

نتایج تحقیق حاضر مشخص کرد که تکوین جنینهای دو سلولی به مرحله بلاستوسیست در گروه شاهد و گروه حاوی ۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF به ترتیب ۶۵/۷۸ و ۷۴/۸۲ درصد بود. اگرچه این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود و حتی از نظر درصد بلاستوسیستهای خارج شده از زونا نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (۴۵/۳۹ و ۵۳/۰۶ درصد) اما مقایسه روزانه تکوین این گروهها نشان داد که در گروه حاوی GM-CSF تکوین سریع‌تر بوده است و جنینهای دو سلولی طی مراحل اولیه تکوین (۴۸ و ۷۲ ساعت پس از برداشت جنین) تحت تاثیر GM-CSF سرعت تکوینی بیشتری داشته‌اند اما در مراحل بعدی (۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از برداشت جنین) تفاوتی در سرعت تکوین آنها مشاهده نشد. بنابراین نتایج حاصله نشان می‌دهد که GM-CSF در مراحل اولیه تکوین سرعت تکثیر را افزایش داده اما در مراحل بعدی بر تکوین جنین موثر نبوده است و درصد خروج از زونا را نیز به طور معنی‌داری افزایش نداده به عبارتی بر لانه‌گزینی جنین در شرایط *In vitro* تاثیرگذار نبوده است. از طرف دیگر افزایش قطر بلاستوسیستهای حاصل از تکوین جنینهای دو سلولی که تحت تاثیر GM-CSF قرار گرفته بودند (۱۲۸/۰۲ میکرومتر در مقایسه با گروه شاهد ۱۲۵/۴۰ میکرومتر) نشان می‌دهد که این فاکتور احتمالاً یا باعث افزایش تعداد سلول شده و یا باعث افزایش حجم مایع درون بلاستوسیست گردیده است. شمارش تعداد کل سلولهای بلاستوسیست حاصل از جنینهای دو سلولی نشان داد که این جنینها تحت تاثیر GM-CSF به طور متوسط ۵ سلول بیشتر از

گروه شاهد داشتند، اگرچه برای نتیجه‌گیری مناسب‌تر نیاز به انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه است، اما نتایج حاصل از این تحقیق تا حدودی نشان داد که افزایش قطر بلاستوسیستها می‌تواند مربوط به افزایش تعداد سلولها باشد، اثبات افزایش احتمالی مایع درون سلولی‌نیاز به استفاده از تکنیکهای کامل‌تری دارد. Robertson و همکاران نیز با افزودن غلظت ۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF به محیط کشت جنینهای دو سلولی سالم و موشهای با نقص ژنتیکی در GM-CSF تعداد کل سلول بلاستوسیستهای حاصل از آنها را به ترتیب ۲۱ و ۲۴ درصد افزایش داده‌اند (۱۸). Sjoblom و همکاران نیز در سال با افزودن غلظت مشابه از این فاکتور به محیط کشت جنینهای ۴-۲ سلولی انسان تکوین آنها را بهبود بخشیدند (۱۵). توجیه محققین مذکور در خصوص افزایش درصد بلاستوسیست جنینهای در معرض GM-CSF بروز ژنهای درگیر در شکل‌گیری بلاستوسیست و یا عمل Compaction بوده است. این در حالی است که تحقیقات قبلی Hill و همکاران تاثیر این فاکتور بر جنینهای دو سلولی و بلاستوسیست را سمی گزارش کرده بود (۲۱و۲۰)، اما بررسی نتایج انها توسط Robertson و همکاران مشخص کرد که در این آزمایش میزان GM-CSF به کار رفته ناچیز بوده و به دلیل نبود گروه شاهد تفسیر نتایج آن مشکل بود (۲۲). Cui و همکاران در گزارش خود که به مطالعه تاثیر GM-CSF بر بروز ژنهای مرتبط با لانه‌گزینی در تخمکهایی که در آنها پارتنوژنز القا شده بود پرداخته بودند؛ نشان دادند که تعداد کل سلولهای جنین در مرحله بلاستوسیست افزایش نداشته اما بر بروز mRNA مربوط به فاکتور مهار کننده لوسمی(LIF) تاثیر داشت. با این حال نتیجه گرفتند که GM-CSF باعث افزایش قدرت حیات جنینها در محیط کشت می‌شود (۱۶). غلظت ۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF غلظتی است که در رده‌های دیگر سلولی نیز فعالیت بیولوژیکی این فاکتور را برمی‌انگیزاند. علاوه بر این، غلظت ۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر از این فاکتور تقریباً معادل مقدار GM-CSF به دست آمده از مایع رحمی موش طی اوایل حاملگی (دوره پیش از لانه‌گزینی) است (۲۲). با توجه به نتایج تحقیق حاضر به نظر می‌رسد GM-CSF با افزایش سرعت تکوین اولیه جنین، افزایش قطر بلاستوسیستها و تعداد کل سلولهای آنها تکوین جنینهای دو سلولی موش را در *In vitro* تا حدودی بهبود بخشد و می‌تواند به عنوان یک فاکتور امبریوتروفیک مطرح شود.

References

1. Trounson AO, Gardner D: In vitro fertilization. CRC Press 2000; 127-264
2. Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA: Roles of growth factors during peri-implantation development. Mol Hum Reprod 1995; 10: 712
3. Kane MT, Morgan PM, Coonan C: Peptide, growth factors and preimplantation development. Hum Reprod 1997; 3: 137
4. Paria BC, Dey SK: Preimplantation embryo development in vitro: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc Natl Acad Sci 1990; 87: 756-760
5. Brice EC, Wu JX, Muraro R, Adamson ED, Wiley LM: Modulation of mouse preimplantation development by epidermal growth factor receptor antibodies, antisense RNA, and deoxy oligonucleotides. Dev Genet 1993; 14: 174
6. Ruef C, Coleman DL: Gm-SCF: Pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. Rev Infect Dis 1990; 12, 1: 41-63
7. Giacomimi G, Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG, Bonsi L, Vital L, Bagnara GP, Strippoli P, Jasonni VM: Epithelial cells are the major source of biologically active GM-CSF in human endometrium. Hum Reprod 1995; 10: 3259-3263
8. Robertson SA, Seamark RF: GM-CSF in the murine reproductive tract: Stimulating by seminal factors. Reprod Fertil Develop 1990; 2: 359-368
9. Chegini N, Tang XM, Dou M: The expression, activity and regulation of GM-CSF in human endometrial and stromal cells. Mol Hum Reprod 1999; 5: 359
10. Moraes AAS, Paula-Lopes FF, Chegini N, Hansen PJ: Localization of GM-CSF in the bovine reproductive tract. Reprod Immunol 1999; 42: 135-145
11. Oshima K,Watanabe H, Yoshihara K, Kojima T, Dochi O, Takenouchi N, Fukushima M, Komatsu M: Gene expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) in bovine endometrium during early pregnancy. Theriogenol 20: 1226-1217
12. Robertson SA, Sjoblom C, Jasper J, Norman RJ, Seamark RE: GM-CSF Promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. Biol Reprod 2001; 64: 1206-1215
13. Sjoblom C, Wikland M, Robertson SA: GM-CSF acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. Biol Reprod 2002; 67: 1817-1823
14. Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF: Ovarian steroid hormones regulate GM-CSF synthesis by uterine epithelial cell in the mouse. Biol Reprod 1996; 54: 182-196
15. Sjoblom C, Wiland M, Robertson SA: GM-CSF promotes human blastocyst development in vitro. Hum Reprod 1999; 14: 3069-3076
16. Cui XS, Lee JY, Choi SH, Kwon MS, Kim T, Kim NH: Mouse granulocyte –macrophage colony- stimulating factor enhances viability of porcine embryos in defined culture conditions. Anim Rprod Sci 2004; 84: 169-177
17. Alice AS, Moraes AA, Hansen PJ: Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor promotes development of in vitro produced bovine embryos. Biol Reprod 1997; 57: 1060-1065
18. Robertson SA, Roberts CT, Farr KL, Dunn AR, Seamark Rf: Fertility impairment in GM-CSF deficient mice. Biol Reprod 1999; 60: 251-261
19. Thouas G: Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod Biomed 2001; 3: 25-29
20. Hill JH, Haimovici F, Anderson DJ: Products of activated lymphocytes and macrophages inhibit mouse embryo development in vitro. Immunol 1987; 139: 2250-2254
21. Haimovici F, Hill JH, Anderson DJ: The effect of soluble products of activated lymphocyte and macrophages on blastocyst implantation events in vitro. Biol Reprod 1991; 44: 69-75
22. Robertson SA, Seamark RF: GM-CSF: One of family of epithelial cell derived cytokines in the preimplantation uterus. Reprod Fertil Develop 1992; 4: 435-448