مقایسه تکوین جنینهای موش در هم‌کشتی با سلولهای اپیتلیال نواحی آمپولا و ایستموس اویداکت هامستر و تأثیر عملکرد گنادوتروپین‌های تزریقی بر کیفیت اثر هم‌کشتی

حسین بهاروند M.Sc*، مجتبی رضازاده Ph.D**، محمدتقی الطریحی Ph.D***

* جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران ـ پژوهشکده رویان

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

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

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

چکیده

* **هدف:** بررسی تأثیر سلولهای اپیتلیال نواحی مختلف اویداکت هامستر بر تکوین جنین‌های موش نژاد N-MARY طی چهار روز هم‌کشتی و تأثیر عملکرد گنادوتروپینهای تزریقی بر کیفیت اثر هم‌کشتی

* **نوع مطالعه:** تجربی

* **مواد و روشها:** اویداکت هامسترها، ۲۴-۱۸ ساعت پس از تزریق HMG/HCG جدا شده و با محیط DMEM/Ham's F-12 +FCS ۱۰% فلاش شدند. براساس مشاهده توده‌کومولوس، اویداکتها به دو دسته تقسیم شدند. دسته I: اویداکتهایی که نسبت به گنادوتروپینها پاسخ نداده و به عبارتی فاقد توده کومولوس بودند. دسته II: اویداکتهایی که نسبت به گنادوتروپین‌ها پاسخ داده و دارای کومولوس بودند. پس از تفکیک نواحی آمپولا و ایستموس اویداکتها، با استفاده از آنزیم کلاژناز، سلولهای اپیتلیالی جدا و در زیر میکروسکوپ اینورت انتخاب شده و کشت داده شدند. جنینهای دو سلولی موش در محیط T6+FCS ۱۰% روی تک لایه‌های سلولی آمپولا (A)، ایستموس (I) و گروه کنترل (C) کشت داده شدند و تکوین آنها طی ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. تعداد بلاستومر ۵۷ بلاستوسیست متعلق به همه گروههای آزمایشی و کنترل شمارش گردید.

* **یافته‌ها:** دسته I: پس از ۹۶ ساعت، تعداد بیشتری از جنینها در گروههای هم‌کشتی از زونا پلوسیدا خارج شدند (Hatch) A= ۶۴% ، P<0.001 I=۵۰% ، P<0.05 C= ۳۶%).

علاوه بر این در ۲۴ ساعت اول کشت، تکوین جنینها در هم‌کشتی آمپولا بهتر از ایستموس بود (P<0.001). شمارش بلاستومرها نشان داد که تعداد بلاستومرها پس از ۹۶ ساعت در گروههای هم‌کشتی و بخصوص در گروه آمپولا، بیشتر از گروه کنترل است (P<0.001 برای A و P<0.05 برای I). دسته II: پس از ۹۶ ساعت، تعداد بیشتری از جنینها در گروه کنترل نسبت به گروههای هم‌کشتی به مرحله بلاستوسیست رسیدند (A= ۲۰% ،I= ۲۷% ،C=۵۸% و P<0.001 نسبت به A و I).

* **نتیجه‌گیری:** هم‌کشتی سلولهای اپیتلیال اویداکت هامستر و به خصوص سلولهای مشتق از ناحیه آمپولا، برای تکوین جنینهای موش در محیط آزمایشگاه مفید است و این تأثیر، تحت نفوذ وضعیت پاسخ هامسترها نسبت به گنادوتروپین‌های تزریقی است.

گل واژگان: هم‌کشتی، اویداکت هامستر، جنین موش، گنادوتروپین‌ها.

مقدمه

از زمان انجام باروری آزمایشگاهی (IVF) در خرگوش در سال ۱۹۵۹(۱)، تا به امروز پیشرفتهای زیادی در روش IVF حاصل شده، با این حال میزان باروری حاصل از این روش پایین است. میزان پایین باروری به شرایط نامطلوب کشت و کیفیت پایین جنین برمی‌گردد؛ به طوری که تکوین (development) جنینها در محیط کشت (culture medium) به تأخیر می‌افتد(۳، ۲) و حتی در بعضی نژادها یا گونه‌ها، تکوین جنین در مرحله خاصی از تسهیم (cleavage) در محیط آزمایشگاهی متوقف می‌شود (۴). گذشته از این، توان زیستی (viability) جنینها کاهش می‌یابد(۵). بنابراین به منظور اجتناب از بروز چنین مشکلاتی، باید هرچه سریعتر جنین به مادر منتقل شود. به طور مثال جنین انسان در مرحله ۴ تا ۸ سلولی به رحم مادر منتقل می‌شود، اما بدنبال این انتقال، میزان لانه‌گزینی (implantation) جنین‌ها بدلیل ناهماهنگی (asynchrony) بر هم‌کنش‌های (interactions) رحم و تروفواکتودرم کاهش می‌یابد(۶).

به منظور غلبه بر چنین مسائلی، سیستمهای مختلف کشت جنین طراحی شده‌است تا جنین برای مدت بیشتری (تا تشکیل بلاستوسیست) در محیط آزمایشگاهی تکوین یابد و بعد به مادر منتقل شود. در این سیستمها از اصلاح محیطهای کشت (۹، ۷)، کاهش درصد اکسیژن در زمان کشت (۱۰)، استفاده از محیطهای کشت متوالی (sequential media)(۱۱) و سیستمهای هم کشتی (co-culture) استفاده می‌شود.

در سیستمهای هم کشتی، جنین را همراه با سلولهای سوماتیک مختلفی نظیر دودمانهای سلولی (cell lines) vero، سلولهای اپیتلیال کلیه میمون سبز افریقایی (۱۳، ۱۲)، MDBK سلولهای کلیه گاو (۱۵، ۱۴) و یا سلولهای گرانولوزا (۱۶)، رحم (۱۷) و یا اویداکت (۱۹، ۱۸) کشت می‌دهند. در هر حال تأثیر این سلولها بر جنین مفید گزارش شده است.

Rexroad و Powell نیز با هم‌کشتی جنینهای گوسفند در تک‌لایه‌های (monolayers) سلولی اویداکت، رحم و کلیه، رشد بهتری از جنینها را بخصوص در هم‌کشتی با سلولهای اویداکتی گزارش کرده‌اند(۲۰).

در این مطالعه، با تقلید از محیط in vivo و با استفاده از سلولهای اپیتلیال نواحی آمپولا و ایستموس اویداکت هامسترهای متأثر از گنادوتروپینها، هم‌کشتی آنها با جنینهای دو سلولی موش مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

* تهیه جنین‌های دو سلولی موش

به هر موش ماده نژاد N-MARY با سن ۱۰-۸ هفته، ۷/۵ IU هورمون HMG[1]، بین ساعتهای ۱۸-۱۵ تزریق شد. پس از ۵۰-۴۸ ساعت، به هر کدام از آن موشها ۷/۵IU هورمون HCG[2] تزریق و هر موش ماده با یک موش نر در یک قفس گذاشته شد. پلاک واژنی نمایانگر انجام عمل جفت‌گیری است. صبح روز بعد موشهای مادهٔ پلاک مثبت، جدا شده و ۵۰-۴۸ ساعت پس از تزریق HCG موش به روش قطع نخاع (Cervical dislocation) کشته و اویداکت آنها جدا شد. سپس با فلاشینگ (Flushing) اویداکتها با محیط T6 حاوی ۱۰% FCS (سرم جنین گاوی، Gibco) جنینهای دو سلولی خارج شدند. تمام جنینهای حاصله با هم مخلوط شده و در گروه‌های مختلف کشت، بصورت تصادفی و تقریباً با تعداد مساوی پخش شدند.

* تهیه و کشت سلولهای اپیتلیال اویداکت هامستر

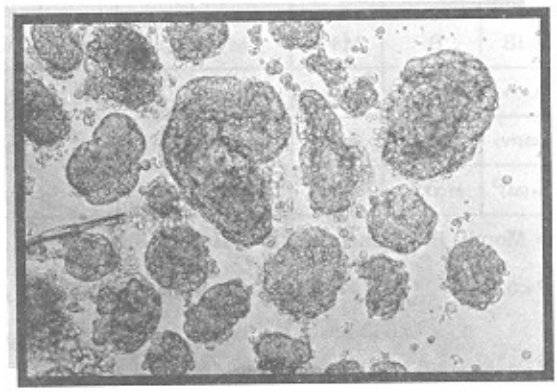
به منظور تهیه سلولهای اپیتلیالی اویداکت هامستر، به هر هامستر ماده نژاد Syrian با سن ۱۶-۱۲ هفته، بین ساعتهای ۱۸-۱۶، ۱۵IU HMG (Sereno) تزریق شد. بعد از ۵۰-۴۸ ساعت، مجدداً ۱۵IU HCG تزریق شد. پس از ۲۴-۱۸ ساعت، هامسترها به روش قطع نخاع کشته شده و اویداکت آنها جدا شد. با فلاشینگ اویداکتها توسط محیط DMEM/Ham's F-10 (Sigma) حاوی ۱۰ % FCS، کومولوس خارج شد. اویداکتهایی که دارای کومولوس بودند و به عبارت دیگر جانور به خوبی نسبت به هورمون پاسخ داده بود، از اویداکتهایی که فاقد کومولوس بودند و به عبارتی جانور نسبت به هورمون پاسخ نداده بود، تفکیک شده و هر کدام به طور جداگانه به روش ذیل کشت داده شد.

در ابتدا نواحی آمپولا و ایستموس اویداکتها جدا شده و سپس هر ناحیه به طور جداگانه در آنزیم کلاژناز II (Sigma) ۰/۲۵ %، به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه و در شرایط ۳۷°c و ۵%CO_2 انکوبه شدند. سپس با پیپت کردن بافتها، سوسپانسیونهای سلولی تهیه شد. قابل ذکر است که باید از پیپت کردن‌های متعدد اجتناب کرد زیرا باعث جدا شدن سلولهای اپیتلیالی از یکدیگر شده و غشاء پایه (basement membrane) آنها از بین می‌رود و کشت آنها را دچار مشکل می‌نماید. سوسپانسیون‌ها با محیط DMEM/Ham's F-12 حاوی ۱۰ % FCS سانتریفوژ شدند (۳ دقیقه،۵۰۰rpm) و پلت (Pellet) حاصل با ۳ml از محیط قبلی، مخلوط شده و سوسپانسیون حاصله را در پتری ریخته و روی آن با روغن پارافین (Merk) پوشانده شد.

ورقه‌های سلولهای اپیتلیالی در زیر میکروسکوپ اینورت (invert) انتخاب شده و با کمک پیپت از سطح پتری جدا شدند. این ورقه‌ها دارای مژه بوده و شکل سلولهای آن استوانه‌ای است. قابل توجه است که اغلب این ورقه‌ها بصورت وزیکول در می‌آیند، به طوریکه مژه‌های سلولهای آنها در خارج و غشاء پایه در سمت داخل قرار می‌گیرد (شکل ۱). ورقه‌ها و وزیکولهای جدا شده دوباره شسته شده (۳ دقیقه، ۱۵۰۰rpm) و بصورت قطره‌های ۴۰-۲۰μl در پتری و زیر روغن کشت داده شدند. کشتها در دمای ۳۷°c، ۵%CO_2 و شرایط مرطوب انکوبه شدند. بعد از چسبیدن اغلب وزیکولها و ورقه‌ها به کف پتری، محیط کشت تعویض شد. برای چسبیدن سلولهای اپیتلیالی به کف ظرف، باید از حرکت دادن ظرف طی ۵-۴ روز اول کشت خودداری نمود. ۳-۲

1. Human Menoposal Gonadotropin,Sereno
2. Human Chorionic Gonadotropin, Organon

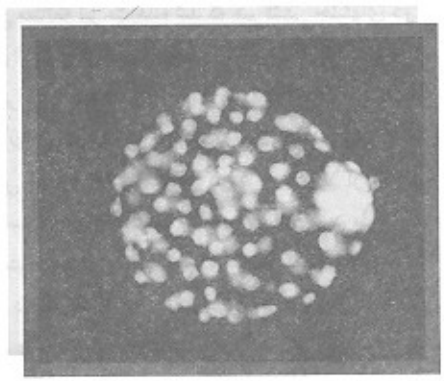
هفته بعد از آغاز کشت، ظرف کشت زیر ۷۰-۶۰ کف قطره بصورت تک لایه‌ای از سلولها پوشیده شده و آماده استفاده برای هم‌کشتی بود.



شکل ۱: وزیکولهای سلولهای اپیتلیالی اویداکت هامستر

* شمارش بلاستومرها

به منظور بررسی میزان تسهیم، ۹۶ ساعت پس از آغاز کشت جنینها در محیط آزمایشگاهی، شمارش بلاستومرها انجام شد. تعداد بلاستوسیستها به روش Ebert و همکارانش شمارش شد(۲۱)؛ با این تفاوت که به جای رنگ Hoechst 33242 از رنگ Ethidium bromide استفاده شد. این رنگها بصورت intercalate بین دو رشته DNA قرار می‌گیرند و هنگامی که نمونه در زیر میکروسکوپ فلورسنس با نور ماوراء بنفش مشاهده می‌شود، هسته با رنگ Ethidium bromide به رنگ قرمز در می‌آید. بدین ترتیب با شمارش هسته‌ها، تعداد بلاستومرهای هر بلاستوسیست مشخص می‌شود(شکل ۲).



شکل ۲: تصویر فلورسنس یک بلاستوسیست که با Ethidium bromide رنگ‌آمیزی شده است.

روش کار بدین ترتیب بود که جنینها با محیط کشت بدون سرم یا بافرفسفات (PBS) شسته شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در معرض رنگ قرار گرفتند. سپس دوباره با محیط کشت بدون سرم یا PBS شسته شده و برای مدت ۳۰-۲۰ ثانیه در Triton X-100 ۱% قرار داده شدند. این دترجنت (detergent) احتمالاً با حذف سیتوپلاسم بلاستومرها سبب شفافتر شدن رنگ فلوئورسنس می‌شود. در انتها جنینها با شستشوی مجدد با PBS، روی اسلاید حاوی اندکی گلیسرول قرار گرفته و با نور ماوراءبنفش در زیر میکروسکوپ فلوئورسنس مشاهده شدند.

آزمایش -۱:

* هم‌کشتی جنینهای دو سلولی موش با سلولهای اپیتلیال نواحی آمپولا و ایستموس اویداکت هامستر

وقتی سلولهای اپیتلیال آمپولا و ایستموس حداقل ۶۰% کف قطره حاوی محیط کشت را پوشاندند، محیط ۱۰% T6+FCS جایگزین محیط DMEM/Ham's F-12 حاوی ۱۰% FCS شده و پس از ۲۴ ساعت هم‌کشتی جنینهای دو سلولی موش در شرایط مرطوب، ۵% CO_2 و دمای ۳۷°c انجام گرفت. گفته می‌شود که هم‌کشتی در ریز قطره‌ها بهتر از هم کشتی در محیطهای بزرگ است (۲۲). گروه کنترل تنها دارای ۱۰% T6+FCS بود که مانند گروه‌های هم‌کشتی در حجم ۴۰-۲۰ میکرولیتر و در زیر پارافین مایع تهیه شد. این گروه نیز ۲۴ ساعت قبل از کشت جنین تحت همان شرایط انکوبه شد. پس از کشت جنین در هر سه گروه آمپولا، ایستموس و کنترل، میزان تکوین جنینها هر ۲۴ ساعت یادداشت شد و ۹۶ ساعت پس از شروع کشت، تعداد بلاستومر بلاستوسیستهای هر گروه شمارش شد.

آزمایش -۲:

* تأثیر هم کشتی اویداکتهای فاقد کومولوس

سلولهای اپیتلیال نواحی آمپولا و ایستموس اویداکتهایی که نسبت به گنادوتروپین‌های HMG/HCG پاسخ نداده بودند، به طور جداگانه کشت شده و مانند آزمایش اول در هم‌کشتی، مورد استفاده قرار گرفتند.

* آنالیز آماری:

نتایج حاصل از تأثیر هم‌کشتیها بر تکوین جنینها نسبت به گروه کنترل در روزهای مختلف و مقایسه تکوین جنینها در هم کشتیهای آمپولا و ایستموس، به روش آزمون مربع کای بررسی شد. مقایسه میانگین شمارش بلاستومرها در هر گروه نیز پس از نرمال بودن داده‌ها با روش kolmogorov-Smirnov توسط آنالیز واریانس یکطرفه انجام شد. همگن بودن واریانس‌ها و مقایسه دو به دوی مجموع میانگین‌ها و انحراف معیارها به ترتیب به روشهای Bartlett و Tukey انجام شد.

یافته‌ها:

آزمایش -۱:

میزان تکوین جنینها در سه گروه کشت آمپولا، ایستموس و کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. درصد مورولاها پس از ۲۴ ساعت و میزان جنینهایی که پس از ۴۸ ساعت به مورولا یا بلاستوسیست رسیده‌اند به طور معنی‌داری در گروه‌های هم کشتی از کنترل بیشتر بود.

بدنبال ۷۲ ساعت کشت، درصد بلاستوسیستهای بیشتری در آمپولا و ایستموس نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. ($P<0.01$ برای A و $P<0.05$ برای I).

به همین ترتیب درصد بلاستوسیست‌های خارج شده از زونا‌پلوسیدا (Hatching Blastocyst) پس از ۹۶ ساعت کشت در هم‌کشتیها، از گروه کنترل بیشتر بود($P<0.001$ برای A و $P<0.05$ برای I).

در مقایسه تکوین جنینها بین گروه‌های هم کشتی آمپولا و ایستموس، سرعت تکوین جنینها در ۲۴ ساعت اول کشت در آمپولا بیشتر از ایستموس بود ($P<0.001$). و درصد هچینگ بلاستوسیست پس از ۹۶ ساعت نیز در آمپولا از ایستموس بیشتر بود($P<0.05$).

جدول ۱: میزان تکوین جنینها پس از ۹۶ ساعت کشت در گروه‌های هم‌کشتی و کنترل

تیمار	تعداد جنین	تکرار	۲۴h کشت	۷۲h کشت	۹۶h کشت
			M	B	HB
آمپولا	۱۱۲	۴	۱۰۷(۹۴)^a	۱۰۲(۸۹)^a	۷۳(۶۴)^a
ایستموس	۱۱۸	۴	۸۲(۷۱)^a	۱۱۳(۹۶)^a	۵۹(۵۰)^b
کنترل	۱۰۵	۴	۵۳(۵۰)	۸۳(۷۹)	۳۸(۳۶)

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

a: $P<0.001$, b: $P< 0.05$ مقادیر داخل پرانتز نشاندهنده درصد می‌باشد.

شمارش بلاستومرها نشان داد که تعداد بلاستومرها در هم کشتی با آمپولا بیشتر از گروه کنترل بوده است ($P<0.001$ برای A و $P<0.05$)(جدول ۲). در ضمن تعداد بلاستومر بلاستوسیست‌های موجود در هم‌کشتی آمپولا از ایستموس نیز بیشتر بود($P<0.05$).

جدول ۲: تعداد بلاستومر بلاستوسیست‌ها در گروه‌های هم‌کشتی و کنترل پس از ۹۶ ساعت کشت

تیمار	تعداد بلاستوسیست‌ها	تعداد بلاستومرها
آمپولا	۲۱	۱۲۱ ± ۳۰^a
ایستموس	۱۶	۹۵ ± ۲۲^b
کنترل	۲۰	۵۶ ± ۲۰

a: $P<0.001$ و b: $P<0.05$

مقادیر بصورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده‌اند.

آزمایش -۲:

میزان تکوین جنینها در گروه‌های هم کشتی اویداکت فاقد کومولوس و کنترل در جدول ۳ نشان داده شده است که به طور کلی میزان تکوین جنین‌ها در گروه‌های هم کشتی مزبور از گروه کنترل کمتر بود.

جدول ۳: میزان تکوین جنینها پس از ۹۶ ساعت کشت در گروه کنترل و در گروه‌های هم‌کشتی اویداکتهای فاقد کومولوس

تیمار	تعداد جنین	تکرار	۲۴h کشت	۴۸h کشت	۷۲h کشت	۹۶h کشت
			M	M+B	B	HB
آمپولا	۹۲	۲	۵۶(۶۱)	۸۲(۸۹)	۳۷(۴۰)	۱۸(۲۰)
ایستموس	۹۳	۲	۶۰(۶۵)	۸۶(۹۲)	۳۹(۴۲)	۲۵(۲۷)
کنترل	۸۶	۲	۴۷(۵۵)	۷۴(۸۶)	۶۴(۷۴)^a	۵۰(۵۸)^a

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

a: $P<0.001$ مقادیر داخل پرانتز نشاندهنده درصد می‌باشد.

مقادیر بصورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده‌اند.

بحث

هم کشتی به عنوان ابزاری مفید در رشد جنین قبل از لانه گزینی در محیط آزمایشگاهی است. در واقع اساس هم کشتی تقلید از محیط اویداکت است. با توجه به کاربرد هم کشتی در باروری آزمایشگاهی و انتقال جنین (IVF-ET)، مطالعات فراوانی با استفاده از سلولهای اپیتلیالی یا explantهای اویداکتی (۲۵، ۲۳)، خرگوش (۲۷، ۲۶)، گاو (۲۹، ۲۸، ۲۵)، گوسفند (۲۰) و انسان (۳۴، ۳۱، ۱۹) انجام شده است. در تمام این مطالعات اثرات هم کشتی بر تکوین جنین، مفید گزارش شده است. Bongso و همکارانش با بکارگیری سلولهای اپیتلیال اویداکت انسان، افزایش قابل ملاحظه‌ای را در لقاح، بلاستولاسیون و میزان باروری جنین انسان گزارش کرده‌اند(۳۲، ۳۱، ۱۹)، همچنین در مطالعه‌ای که قبلاً بر روی هم‌کشتی سلولهای اویداکت انسان بر جنین دو سلولی موش انجام داده بودیم، تأثیر مثبت آن را بر رشد جنین‌ها مشاهده کردیم(۳۳).

در این مطالعه نیز مشاهده شد که هم کشتی جنینهای دو سلولی موش با سلولهای اپیتلیال نواحی آمپولا و ایستموس اویداکت هامستر در قیاس با گروه کنترل (T6+FCS ۱۰ %)، سبب بهبود درصد بلاستوسیست‌ها و هچینگ آنها می‌شود. با رنگ‌آمیزی بلاستوسیستها و شمارش هسته‌ها نیز مشخص شد که تعداد هسته‌ها در گروه آمپولا از ایستموس و کنترل نیز بیشتر است. تعداد هسته‌ها نشانگر تعداد بلاستومرها است و هر چه تعداد بلاستومر بیشتر باشد، کیفیت بلاستوسیست بهتراست (۳۰). این نتایج نشان داد که بلاستوسیستهای باکیفیت بهتر، از هم کشتی با سلولهای اپیتلیال آمپولای اویداکت بدست می‌آید. این یافته‌ها و نتایج دیگران (۳۴، ۳۳، ۳۰، ۲۹) نشان می‌دهد که احتمالاً تأثیر سلولهای اویداکتی بستگی به گونه جانوری ندارد. به عبارت دیگر می‌توان از تأثیر مفید سلولهای اپیتلیال اویداکت یک گونه بر جنین گونه دیگر استفاده کرد. ولی به هر حال تاکنون مکانیسم یا مکانیسم‌های دقیق تأثیر هم‌کشتیها شناخته نشده است. اما ترشح فاکتورهای امبریوتروفیک نظیر گلیکوپروتئینها (۳۸، ۳۶)، فاکتورهای رشد (۳۹) و میتوژن (۴۱، ۴۰)، ترشح آنتی‌اکسیدنتهایی نظیر تارین و گلوتاتیون (۴۴، ۴۲) یا تغییر ترکیبات محیط کشت نظیر تبدیل گلوکز به لاکتات و پیرووات

(۴۵، ۲۳)، حذف مواد امیریوتوکسیک از محیط کشت و یا کاهش تانسیون اکسیژن (۴۸، ۴۵) می‌توانند در این زمینه مؤثر باشند؛ اگرچه تأثیر دو یا چند مکانیسم فوق به طور همزمان نیز بعید نیست.

به منظور افزایش اثر عوامل مؤثر، هم‌کشتیها در قطره‌های ریز (۲۰-۴۰μl) انجام شد. این عمل سبب بهبود تکوین جنینها نسبت به هم‌کشتی جنینها در محیطهای بزرگ می‌شود(۲۲، ۱۲). از سوی دیگر در مطالعه حاضر مشاهده شدکه میزان مورولا در ۲۴ ساعت اول کشت و بلاستوسیست‌های خارج شده از زوناپلوسیدا پس از ۹۶ ساعت، در گروه هم‌کشتی آمپولا بیشتر از ایستموس بود. کیفیت بهتر تکوین جنین در آمپولا نسبت به ایستموس می‌تواند به عملکرد بهتر سلولهای آن در حذف شرایط منفی، بیشتر بودن سلولهای ترشحی آمپولا (۴۹)، تفاوت در فراساختار(۵۰) و نوع ترشحات آمپولا و ایستموس (۵۱) مربوط باشد. در تأیید مسئله اخیر Way و همکارانش (۵۲) می‌افزایند که اسپرمهای بیشتری پس از انکوباسیون با مایع ایستموسی در مقایسه با مایع آمپولاری به زوناپلوسیدا متصل می‌شوند.

نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان می‌دهد که گنادوتروپین‌ها می‌توانند نحوهٔ پاسخگویی سلولهای اویداکت را تحت‌الشعاع قرار دهند بگونه‌ای که عدم عملکرد آنها باعث می‌شود که سلولهای اویداکت حاصل نتوانند رشد و تکامل جنین‌های موش را حمایت کرده و حتی اثر منفی نیز در این بر هم‌کنش داشته باشند.

Bavister و همکارانش (۵۳) نیز نشان دادند که جنینهای هامستر یا هم‌کشتی در اویداکت موشهایی که ۳۲-۱۴ ساعت پس از تزریق HCG بدست آمده‌اند، رشد می‌یابند ولی اگر این زمان طولانی‌تر شود، رشد جنین‌ها دچار مشکل می‌شود.

هم‌کشتی سلولهای اپیتلیال اویداکت هامستر و بخصوص ناحیه آمپولا، تکوین جنینهای موش را در محیط آزمایشگاهی به لحاظ بلاستولاسیون و تعداد بلاستومر بهبود می‌بخشد و پاسخ هامسترها نسبت به گنادوتروپینهای تزریقی، در هم کشتی سلولهای اپیتلیالی مشتق از اویداکت آنها، حائز اهمیت است.

تقدیر و تشکر

این مطالعه طرح مصوب شماره ۱۱-۴۶۲ دفتر مرکزی جهاددانشگاهی است و محل آن، بخش تحقیقات پژوهشکده رویان بوده است. نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر خود را از همکاری آقای باغستانی در امور آماری این مطالعه، ابراز می‌دارند.

منابع

1. chang MC; ferilization of rabbit ova in vitro. Nature 184: 466, 1959

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

3. Fisher B; Developmental retardation in cultured preimplantation embryos. J Reprod Fert, 79: 115-123, 1987.

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

5. Sakkas D, Batt PA, Cameron WN, Development of preimplantation goat (Capra hircus) embryos in vivo and in vitro. J Reprod fertil, 87: 359-365, 1989.

6. Menezo Y, Arnal F, Humeau C, Ducret L, Nicollef B; Increased viscosity in embryo transfer medium does not improve the pregnancy rates in I.V.F and ET. fertil steril, 25: 680-682, 1989.

7. Gardner DK, Sakkas D; Mouse embryo cleavage, metabolilsm and viability: role of medium composition. Hum Reprod, 8: 288-295, 1993.

8. Ho Y, Wiggle Sorth K, Eppig JJ, Schultz RM; Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: Augmetation by amino acids and analysis of gene expression. Mo1 Reprod Dev, 41: 232-238, 1995.

9. Gardner DK, Lane M; Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture.Biol Reprod, 48: 377-385, 1993.

10. Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, and Tervit HR; Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. J Reprod Fert, 89: 573-578, 1990.

11. Lane M, Gardner DK; Differenial regulation of mouse embryo development and viability by amino acids, J Reprod. Fert, 109: 153-164, 1997.

12. Valojerdi MR, Nematollahi, Hosseini A, Mozdarani H; The effect of vero cell on development of one and two cell mouse embryos. J Middle East Fertility Society, 7: 35-41, 1997.

13. Menezo YJR, Guerin JF, Czyba, JC; Improvement of human early embryo development in vitro by co-culture on monolayers of vero cell. Biol Reprod, 42: 301-306, 1990.

14. Myers M W, Broussard JR, Menezo YJR, Prough SG, Blakwell J, Godke PA,Thibodeaux JK; Established cell lines and their conditioned media support bovine Embryo development during in vitro culture. Hum Reprod, 9: 1927-1931, 1994.

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

16. Broussard KR,Thibodeaux JK, Myers MW, Roussel

JD, prough SG, Blackwell J,G odke RA, Frozen-thawed clumulus-granulosa cell support bovine Embryo development during co-culture. Fertil Steril, 62: 176-180, 1994.

17. Wiemer KE, Casey PI, devore D, Godke RA; The culture of equine embryos using a new fetal uterine monolayer culture system. Theriogenology, 29: 327, 1988.

18. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam SS; Coculture: A new lead in embryo impovement for assisted Reproduction. Fertil steril, 59: 179-191, 1991

19. Bongso A, Fong CY, NgSC, Ratnam SS; Coculture techniques for blastocyst transfer and embryonic stem cell Production. Assist Reprod Rviews,5:106-114, 1995.

20. Rexroad and Powell; Co-culture ova with oviductal cells in medium 199. J Anim Sci, 66: 947, 1988.

21. Ebert KM, Hammer RE, Papaioannou VE, A simple method for counting in the preimplantion mouse embryo. J Experientia, 41: 1207-1209, 1985.

22. Shebahan. R, Frasor J, Radwanska E, Binor Z, wood-Molo, Hibner M, Mack S, Ralins RG; Comparison of mouse embryo development in open and microdrop co-culture systems. Hum Reprod, 11: 2223-2229, 1996.

23. Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J, Menezo YJR; Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. Hum Reprod, 5: 737, 743, 1990.

24. Sakkas P, Trounson AO; Coculture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pregnancy. J Reprod Fert, 90: 109-118, 1990.

25. Hosoi Y, Minami N,Iritaani A; Embryo culture in explanted oviducts in mice and cattle. Horm Res, 44: suppl2. 9-14, 1995.

26. Carney EW, Tbback C, Ellington JE,Foote RH; Co-culture of rabbit 2-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cell and other somatic cells. Mol Repod Dev, 27: 209-215, 1990.

27. Fukaya T, China s, Murakami T, Yajima A, Is direct cell-to-cell contact contact needed to improve embryonic development in co-culture?, Tohoku J Exp Med, 180: 225-232, 1996.

28. Eyestone WH, First NI, Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or conditioned medium. 85: 715-720, 1989.

29. Wiemer KE, Hoffman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlberger B ,Fiore I, Cuervo M, Embryonic morphology and rate of implantation Of human embryos following coculture on bovine oviductal epitelial Cells. Hum Reprod, 8:97-101, 1993.

30. Hoshi K, Kanno Y, Katayose H, Yanagida K, Suzuki R, SatoA, Coculture of mouse embryos with ctyopreserved human Oviduct epithelial cells. J Assist Reprod Genet, 11: 367-372, 1994.

31. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam S:Improved fertilization rates of human oocytes in co-culture. J Vitro Fertil Embryo Transfer,8: 216-221, 1991.

32. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S, Improved pregnancy rate after transfer embryo grown in human fallopian tubal cell coculture. Fertil Steril, 58: 569-574, 1992.

33. Baharvand H, Valojerdi MR, Hosseini A; Effect of co-cultureing of feeder cells isolated from different regions of human oviduct on the mouse embryo. development middle East Fertility Society J, 1, Supp L; 23: Abstract, 1996.

34. Takeuchi K, Nagata Y, Sandow BA, Hodgen GD. Pimary culture of human fallopian tube epithelial cells and co-culture of early mouse pre-embryos. Mol Reprod Dev, 32: 236-242, 1992.

35. Vlad M, Wzlker D, Kwnnedy RC, Nuclei number in human embryos Co-culture with human anpullavy cell, Hum Reprod. 11: 1978- 1986, 1996.

36. Nancarrow CD, Hill JL, Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct specific glycoproteins. Cell Biol International, 18: 1105-1114, 1994.

37. Lin LP, Chan ST, Ho PC, Yeung WS, Human oviductal cells produce high molecular weight factor(s) tht improves the development of mouse embryos. Hum Reprod, 10: 2781-2786, 1995.

38. Minami N, Utsmi K, Iritani A; Effects of low molecular weight ovductal factors on the development of mouse one-cell embryos in vitro. J Reprod Fert, 96: 735-745, 1992.

39. Desai N, Goldfarb J; Co-culture 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, 13: 1600-1605, 1998.

40. Pulkinen MO; Oviductal function is critical for very early embryo life. Annals med, 27, 307-310, 1995.

41. Stojkovic M, Wolf E, Van Langendonckt A, Van Steenbrugge A, Charpigny G, Reinaud P, Gandolfi F,

Brevini TAL, Memillod P, Terqui M, Brem G, Massip A; Correlaions between chemical parameters, mitogenic activity of bovine oviduct-conditioned medium. Theriogenology, Theriogenology, Theriogenology, 48: 659, 673, 1997.

42. Gardiner CS, Salmen JJ, Brandt CJ, Stover SK; Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. Biol Reprod, 59: 431-436, 1998.

43. Takahashi Y, Kanagawa H; Effects of glutamine, glycine and taurine on the development of in vitro fertilized bovine zygotes in a chemically defined medium. J Vit Med Sci, 60: 433-437, 1998.

44. Guerin P, Menezo YJR; Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. Zygote, 3: 333-343, 1995.

45. Bongso A, Fong CY; The effect of co-culture on human zygote development. Curr Opin
Obstet Gynecol, 5: 585-593, 1993.

46. Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR; Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. J Reprod Fert, 92: 125-131, 1991.

47. Bavister BD; Co-culture for embryo developent: is it realy necessary? Hum Reprod, 7: 1339-1341, 1992.

48. Kim YB; vero cell co-culture and mouse embryo development. Assist, Reprod, Reviews, 6: 162-165, 1996.

49. Bongso A; Oviductal cells and conception. Reprod Med Review, 4: 31-41, 1995.

50. Abe H, Oikawa T; Regional differences in the ultrastructural features of secretory cells in the golden hamster (Mesocricetus auratus) oviductal epithelium. J Anat, 175: 147-158, 1991.

51. Neider GL, Macon GR; Uterine and oviductal protein secretion during early pregnancy in the mouse. J Reprod Fert, 81: 287-294, 1987.

52. Way AL, Schuler AM, Killian; Infiuece of bovine ampullary and isthmic oviductal fiuid on sperm- egg binding and fertlization in vitro. J Reprod Fert, 109: 95-101, 1997.

53. Minami N, Bavister BD, Iritani A; Development of hamster two cell embryos in the isolated mouse oviduct in organ culture system. Gamete Reseach, 19: 235-240, 1988.