مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ششم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۶، ۱۴۲-۱۳۵

مقایسه کیفیت جنین‌های رشد یافته در محیط کشت‌های Ham's F-۱۰ +٪۱۰ Maternal Serum و GI_{III}

دکتر سیّدغلامعلی جورسرایی[۱]، دکتر مهتاب زینال‌زاده[۲]، دکتر طاهره نظری[۲]، دکتریوسف‌رضا یوسف‌نیاپاشا[۳]، دکتر علی اصغر بیکی[۴]، دکتر علی بذرام[۵]

دریافت مقاله: ۸۵/۱۰/۲۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۶/۱/۲۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۶/۵/۱۶ پذیرش مقاله: ۸۶/۶/۴

چکیده

زمینه و هدف: یکی از فاکتورهای مهم در روش‌های کمک باروری، تشکیل و رشد جنین در محیط آزمایشگاه و استفاده از محیط کشت مناسبی می‌باشد که تمام شرایط لازم را برای رشد آن داشته باشد. در این مطالعه، شرایط دو محیط کشت MS٪۱۰+ Ham's F -۱۰ و GI_{III} با هم مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها: این مطالعه آزمایشگاهی بر روی ۱۰۰ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز ناباروری، که در سیکل درمانی IVF-ICSI قرار داشتند، در دو گروه یکسان انجام گرفت. تخمک‌های به دست آمده از گروه اول در محیط کشت MS ٪۱۰+ Ham's F -۱۰ و گروه دوم در GI_{III}، کشت داده شدند. سپس پارامترهای تخمک و جنین‌های تشکیل یافته ارزیابی شده و داده‌ها با نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل گردیدند.

نتایج: میانگین سن بیماران، ۲۸/۰۱ سال و مدت زمان ناباروری، ۶/۸۷ سال بود. تعداد پرونوکلئوس‌های Moderate، در دو گروه اول و دوم به ترتیب ۲/۱۴ و ۳/۲۲ عدد، جنین‌های سه سلولی ۱/۲۶ و ۰/۵۴ عدد، جنین‌های Grade B، ۱/۱۸ و ۱/۷۸ عدد و جنین‌های Grade C نیز ۱/۰۸ و ۰/۵۶ عدد به دست آمد. میانگین تعداد بلاستومرهای Grade B در محیط کشت MS٪۱۰+ Ham's F -۱۰ کمتر از GI_{III} بود.

نتیجه‌گیری: در این بررسی مشخص گردید که محیط GI_{III} در بسیاری از فاکتورهای مربوط به کشت جنین، برتری خود را حفظ نموده و سرم مادری به عنوان نگهدارنده تأثیر چندانی نداشته است.

واژه‌های کلیدی: لقاح آزمایشگاهی،محیط کشت،GI_{III}، سرم مادری

۱- (نویسنده مسؤول) استادیار گروه آموزشی آناتومی و جنین‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

تلفن: ۲۲۷۴۸۸۱-۰۱۱۱، فاکس: ۲۲۷۴۸۸۰-۰۱۱۱، پست الکترونیکی: alijorsara@yahoo.com

۲- استادیارگروه آموزشی زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۳- استادیار گروه آموزشی ارولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۴- دکترای علوم آزمایشگاهی، بیمارستان بابل کلینیک، بابل

۵- پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

مقدمه

مراجعه بسیاری از بیماران به مراکز ناباروری که حدوداً ۱۵٪ جامعه را تشکیل می‌دهند [۱]، شرایطی را می‌طلبد تا مناسب ترین خدمات ممکن در آزمایشگاه‌های مربوط به مراکز ناباروی، ارائه گردد. یکی از اهدف اصلی در روش‌های کمک باروری، دستیابی به جنین‌هایی است که از بالاترین کیفیت ممکن برخوردار باشند، لذا متخصصین سعی دارند تا بتوانند بهترین و مناسب‌ترین محیط کشتی را که حاوی تمام مواد لازم برای تخمک و یا اسپرم باشد، برای تشکیل جنین فراهم نمایند[۲]. بعضی از این محیط‌های کشت، حاوی ترکیباتی هستند که می‌توانند سلول تخم را تا مرحله بلاستوسیت پیش ببرند [۳]. محیط کشت‌های طبیعی مثل مایع فولیکولی یا سرم خون بند ناف (MS-maternal serum)، به صورت خالص و یا ترکیبی، قابل استفاده‌اند. دسته دوم محیط‌های کشتی هستندکه با ترکیب مواد مختلف تهیه شده و جایگزین مناسبی برای محیط‌های کشت طبیعی‌اند. باید در نظر داشت که محیط‌های کشت طبیعی، از مراکز ناباروری کاملاً حذف نشده و گاهی اوقات به عنوان نگهدارنده (Supplement)، قابل استفاده هستند. معمولاً پروتئین‌های انسانی که در مایع فولیکولی و سرم خون بند ناف وجود دارند، به عنوان نگهدارنده در محیط‌های کشت مربوط به IVF-ICSI مورد استفاده قرار می‌گیرند [۴]. سرم خون بند ناف بیشتر اوقات برای رشد بهتر جنین در حالت *in vitro*، به محیط‌های کشت اضافه می‌گردد و تأثیر آن به میزان و درصد مورد استفاده آن در محیط کشت بستگی دارد [۵] و باعث می‌گردد تا جنین‌هایی که در داخل انکوباتور کشت داده می‌شوند، وقتی به مرحله بلاستوسیت می‌رسند از کیفیت خوبی برخوردار باشند [۶]. گلوکز یا بافر سولفات هم اگر به محیط کشت اضافه گردد باعث افزایش در تقسیم سلولی می‌گردد، بلاستوسیت‌ها زودتر تشکیل می‌شوند و تعداد سلول‌های آن بیشتر از حالات دیگر است. نگهدارنده‌هایی مثل پیروات و لاکتات هم تأثیر مثبتی در رشد جنین داشته و شرایط مناسبی را برای رشد آن فراهم می‌سازند [۷]. هیالورونیک اسید نیز از گلیکوز آمینوگلیکان‌هایی است که در مایع فولیکولی، لوله رحمی و مایع آمنیوتیک وجود دارد. این ماده باعث تنظیم عملکرد ژن، تقسیم سلولی و کمک به افتراق سلول‌های جنینی می‌شود. اضافه کردن آن به محیط کشت، ویسکوزیته را افزایش داده و تشکیل بلاستوسیت را تسریع می‌بخشد. همچنین نگهدارنده خوبی در فریز کردن و برگشت دوباره آن است و در مجموع، تکامل، ظرفیت پذیری، لقاح و تشکیل جنین را در محیط *in vitro* افزایش می‌دهد [۸]. مایع فولیکولی انسانی به صورت معنی‌داری سبب تحریک تقسیم میوزی گردیده و با کاهش از هم گسیختگی سلولی، باعث بهبودی در ساختار جنین‌های انسانی می‌شود. در سیکل‌های ناباروری، استفاده از مایع فولیکولی باعث افزایش میزان حاملگی می‌گردد و در این خصوص تفاوت چندانی بین مایع فولیکولی و سرم خون بند ناف وجود ندارد [۹]. گزارش‌هایی هم وجود دارند که بعضی از نگهدارنده‌ها مثل بتا-استیل گلوکوز آمینیداز و آلفا- مانوزیداز و یا ترکیبی از آن‌ها که برای افزایش اسمولاریته، به محیط کشت‌ها اضافه می‌شوند، باعث کاهش در رشد جنین شده و تشکیل مورولا را به تأخیر می‌اندازند [۱۰]. فاکتورهای مهم برای تشکیل جنین‌های مناسب در محیط آزمایشگاه، استفاده از محیط‌های کشت است که تمام شرایط لازم را برای رشد آن داشته باشد. لذا محیط‌های کشت مثل، GI_{III} (G-1™ version 3 PLUS- Virolife)، HTF (Human Tubal Fluid) و Ham's F-۱۰+٪۱۰Media Liquid وجود دارند که هر کدام ویژگی‌های خاص خود را در رشد و کیفیت جنین دارا می‌باشند. گاهی اوقات نیز از مایع فولیکولی و یا سرم مادری به عنوان محیط کشت یا نگهدارنده برای افزایش کیفیت رشد جنین استفاده می‌گردد [۱۲-۱۱]. در این مطالعه، شرایط دو محیط کشت مورد استفاده در مراکز ناباروری، یعنی ۱۰ Ham's F-که به آن ۱۰٪ سرم خون بند ناف و یا سرم مادری به عنوان نگهدارنده اضافه شده است و محیط کشت GI_{III}، با توجه به کیفیت و پارامترهای مربوط به رشد جنین در محیط آزمایشگاه و زمان مورد استفاده از این محیط‌های کشت، مورد بررسی قرار گرفته اند. حال این سؤال مطرح است که آیا قابلیت نگهدارنده‌های

طبیعی در حدی است که در کنار محیط‌های کشت معرفی شده از طرف شرکت‌های سازنده مواد شیمیایی قابل استفاده باشند.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه به صورت آزمایشگاهی است و از میان زوج‌های نابارور مراجعه کننده به مرکز نازایی، ۱۰۰ نفر که در سیکل درمان IVF- ICSI قرار گرفته بودند، با در نظر گرفتن شرایط ورود (داشتن تخمک‌های طبیعی و بالغ که در مرحله متافاز دو قرار دارند) و خروج (تشکیل نشدن جنین)، در دو گروه، با توجه به زمان مورد استفاده از این گونه محیط‌های کشت در مراکز ناباروری، تحت بررسی قرار گرفتند. در سیکل درمانی ART، چون تخمک‌ها باید در محیط آزمایشگاه بارور گردند، لذا همراه با تحریک هورمونی، تخمک‌های لازم در روز معین تحویل آزمایشگاه گردیدند. پس از تزریق شدن اسپرم (Micro Injection)، تخمک‌ها به مدت ۴۸ ساعت در داخل محیط کشت Ham's F-۱۰+٪۱۰MS (گروه اول) و GI_{III} (گروه دوم) کشت داده شدند. برای بررسی کیفیت رشد جنین‌ها، متغیرهای مختلفی مانند، تشکیل و کیفیت ۲PN (Two pronuclear)، میزان FR (Fertilization Rate)، تعداد بلاستومرها و کیفیت جنین (Grading)، مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. در این بررسی، ۲PNها، به سه گروه good (مساوی بودن پرونوکلئوس‌ها و در یک ردیف و نزدیک به هم قرار داشتن هستک‌ها)، Moderrate (مساوی بودن پرونوکلئوس‌ها و پراکنده بودن هستک‌ها) و Not good (نامساوی بودن پرونوکلئوس‌ها و پراکنده بودن هستک‌ها) و جنین‌ها نیز در گروه‌های A (بلاستومرهای مساوی بدون فراگمانتاسیون)، B (بلاستومرهای مساوی همراه با فراگمانتاسیون) و C (بلاستومرهای نامساوی همراه با فراگمانتاسیون) دسته‌بندی گردیدند [۱۳]. سپس اطلاعات به دست آمده از هر دو گروه، جمع‌آوری و با استفاده از SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و با آزمون‌های T-test (2-taild) و Chi-square، داده‌ها با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

سن بیماران بین ۱۸ تا ۴۰ سال متغیر بود. ۶۷٪ آن‌ها بین ۲۱ تا ۳۰ سال سن داشتند. گروه اول، شامل ۵۰ نفر با میانگین سنی ۲۸/۵۸ (SD=۴/۹۹)سال و گروه دوم نیز شامل ۵۰ نفر با میانگین سنی ۲۷/۶۶ (SD=۵/۴۴) سال بودند. هم‌چنین میانگین مدت زمان نا باروری آن‌ها در گروه اول، ۶/۸ (SD=۴/۲۸) سال و در گروه دوم ۶/۹ (SD=۴/۷۵) سال به دست آمد. هیچ‌گونه اختلاف آماری از نظر میزان لقاح (FR) بین دو گروه مشاهده نشد. تعداد ۲PNها با درجه good در گروه اول، ۴۰ عدد و در گروه دوم، ۴۵ عدد بود که این اختلاف، بین دو گروه معنی‌دار نبود. بر اساس تعداد ۲PNهای moderate، اختلافی معنی‌دار (جدول۱) بین دو گروه مشاهده گردید (p=۰/۰۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین و انحراف معیار متغیرهای مورد مطالعه در دو محیط کشت Ham's F-۱۰+٪۱۰MS و GI_{III}

متغیرها	گروه ۱ (Ham's F-۱۰) انحراف معیار ± میانگین	گروه۲ (GI_{III}) انحراف معیار ± میانگین	P-value
تعداد تخمک (N)	۱۰/۹۸±۴/۶۲	۱۰/۰۶± ۵/۴۶	۰/۳۶
تعداد ۲ PN	۶/۶۴± ۳/۴۲	۵/۶۴± ۳/۵۴	۰/۱۵
Fertilization Rate	۶۲/۴۳±۲۰/۳۴	۵۶/۳۴±۲۰/۰۳	۰/۱۳
۲PN Equal	۳/۱۸±۲/۵۲	۲/۸۸±۲/۵۲	۰/۵۴
۲PN Unequal	۳/۴۶±۲/۰۴	۲/۷۶±۲/۴۶	۰/۱۲
۲PN Good	۰/۸۰±۲/۰۲	۰/۹۰ ± ۱/۴۱	۰/۷۷
۲PN Moderate	۲/۱۴±۲/۳۰	۳/۲۲±۲/۳۸	۰/۰۲
۲PN Not good	۲/۶۲±۱/۸۹	۲/۶۰±۲/۰۰	۰/۹۵

هم‌چنین، در روز سوم، در گروه اول ۶۶ عدد از بلاستومرها و در گروه دوم ۷۱ عدد به مرحله ۶-۵ سلولی رسیدند (جدول-۲)، که این اختلاف بین دو گروه معنی‌دار نبود. بلاستومرها نیز از نظر کیفیت در سه رده A، B و C ارزیابی شدند. با شمارش بلاستومرهایی که درجه A بودند، مشاهده گردید که هیچگونه اختلاف آماری بین این دو گروه وجود ندارد. اما این اختلاف بین بلاستومرهای B و C که از دو گروه به دست آمدند کاملاً معنی‌دار بود (p=۰/۰۴) (جدول-۳).

جدول ۲- مقایسه میانگین و انحراف معیار تعداد بلاستومرها و میزان تقسیم در دو محیط کشت Ham's F-۱۰+٪۱۰MS و GI_{III}

متغیرها	گروه ۱ (Ham's F-۱۰) انحراف معیار ± میانگین	گروه۲ (GI_{III}) انحراف معیار ± میانگین	P-value
دو سلولی	۱/۴۰ ± ۱/۵۷	۱/۲۴± ۱/۳۳	۰/۵۸
سه سلولی	۱/۲۶ ± ۱/۱۹	۰/۵۴ ± ۰/۷۶	۰/۰۰۱
چهارسلولی	۱/۸۰ ± ۱/۳۵	۱/۹۶ ± ۲/۰۵	۰/۶۴
۶-۵ سلولی	۱/۳۲±۱/۶۷	۱/۴۲ ± ۱/۶۶	۰/۷۶
تقسیم	۴/۹۰ ± ۲/۶۰	۶/۰۴ ± ۳/۳۸	۰/۰۶
درصد تقسیم	۹۲/۶۷ ± ۱۴/۷۰	۹۱/۴۵ ± ۱۶/۴۷	۰/۶۹

جدول ۳- مقایسه میانگین و انحراف معیار Grading جنین های تشکیل شده و انتقال یافته در دو محیط کشت Ham's F-۱۰+٪۱۰MS و GI_{III}

متغیرها	گروه ۱ (Ham's F-۱۰) انحراف معیار ± میانگین	گروه۲ (GI_{III}) انحراف معیار ± میانگین	P-value
Grade A	۳/۱۶±۲/۵۰	۳/۱۸±۲/۵۶	۰/۹۶
Grade B	۱/۱۸±۱/۴۵	۱/۷۸±۱/۴۸	۰/۰۴
Grade C	۱/۰۸±۱/۳۶	۰/۵۶±۰/۹۲	۰/۰۲
ET-انتقال جنین	۴/۵۲±۲/۱۱	۵/۰۰±۱/۹۷	۰/۲۴

بحث

از محیط‌های کشت طبیعی، مانند مایع فولیکولی یا سرم مادری، به صورت خالص و یا نگهدارنده، استفاده می‌شود. در سرم مادری فاکتورهای خاصی وجود دارد که رل مهمی را در حمایت از اووسیت، به عهده داشته [۱۴] و باعث افزایش معنی‌داری در لقاح، رشد و لانه‌گزینی جنین و میزان حاملگی، می‌شوند [۱۵]. البته برای رشد جنین در محیط آزمایشگاه، کیفیت محیط کشت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۱۶]. لذا بعضی از مقالات اشاره به این دارند که نگهدارنده‌هایی که به محیط‌های کشت اضافه می‌شوند، نمی‌توانند تاثیر خاصی در رشد جنین و روش‌های کمک باروری داشته باشند [۱۷]. درمطالعه ما، میزان لقاح در محیط کشت Ham's F-۱۰ غنی شده با سرم مادری و محیط

کشت GI_{III}، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه نشان نداد و کیفیت تخمک‌های بارور شده در روز دوم که در وضعیت 2PN (دو تا پرونوکلئوس) قرار داشتند، تقریباً یکسان بود و بین اندازه پرونوکلئوس‌ها که معمولاً به صورت مساوی و نامساوی، ارزیابی می‌شوند [۱۸]، تفاوت خاصی وجود نداشت. در محیط کشت GI_{III}، تعداد 2PNهای good بیشتر مشاهده گردید که مساوی بودن پرونوکلئوس‌ها، دال بر وجود یک جنین با کیفیت مناسب یا grading A می‌باشد [۱۹]. 2PNهای Moderate نیز در محیط کشت GI_{III} بیشتر از محیط کشت Ham's F-۱۰+٪۱۰MS مشاهده شدند که از نظر آماری معنی‌دار بود. حال اگر مجموع 2PNهای خوب و متوسط را با هم در نظر بگیریم، مشاهده خواهیم کرد که GI_{III}، محیط کشت مناسب‌تری نسبت به محیط کشت Ham's F-۱۰ می‌باشد و غنی کردن آن با سرم مادری تأثیر قابل ملاحظه‌ای نخواهد داشت. زیرا آنچه در انتقال جنین و رسیدن به یک درصد قابل قبول حاملگی مطرح است، داشتن 2PNهایی است که در وضعیت خوب و یا متوسط باشند و حتی ممکن است 2PNهایی که در رده متوسط طبقه‌بندی شوند، نهایتاً در روز سوم یک جنین ۴ یا ۵ سلولی با درجه A داشته باشند [۱۹]، لذا تلقی ما این است که محیط GI_{III} توانسته است برتری خود را نسبت به MS نشان دهد.

باید در نظر داشت که محیط کشت Ham's F-۱۰ به صورت خالص، برای کشت جنین استفاده نمی‌شود و نیاز به یک نگهدارنده دارد که معمولاً آلبومین انسانی است، ولی می‌توان از نگهدارنده‌های دیگری چون سرم مادری و یا مایع فولیکولی استفاده نمود که در این مطالعه از سرم خون بند ناف یا سرم مادری استفاده گردید. گرچه ضعف محیط کشت Ham's F-۱۰ در کنار محیط‌های کشت دیگری که بعداً به مراکز IVF معرفی شده‌اند، قابل تأمل است، اما این ایده وجود دارد که شاید بتوان با MS به عنوان یک نگهدارنده مناسب، تا حدودی ضعف آن را جبران نمود، ولی نتایج حاکی از آن است که علی‌رغم حضور سرم مادری در این محیط کشت، نمی‌تواند در برابر محیط کشت GI_{III}، بهتر عمل نماید، یکی از دلایلی که برای آن ذکر می‌کنند این است که سرم مادری باعث تجمع قطرات چربی در سیتوپلاسم سلول‌ها و تشکیل میتوکندری‌های نارس می‌شود. تجمع غیر معمول چربی در سیتوپلاسم بلاستومرهای جنین، اثر منفی بر حساسیت آن در برابر دما خواهد گذاشت و ممکن است تغییرات جزئی دما به جنین آسیب برساند [۲۰]. $IVM_{۱۰۱}$، $IVD_{۱۰۰}$ نیز از محیط‌های کشت هستند که معمولاً بدون نگهدارنده مورد استفاده قرار می‌گیرند و نتایج حاصل از آن‌ها در تشکیل بلاستوسیت و میزان حاملگی قابل توجه است [۲۱]. زیرا گرچه ممکن است بعضی از نگهدارنده‌ها باعث گردند تا اووسیت‌ها به خوبی از مرحله GV (ژرمینال وزیکول) به M_{II} (متافاز دوم) برسند ولی نمی‌توانند باعث بهبود در لقاح و یا تشکیل بلاستوسیت‌ها شوند [۱۵،۲۲]. در این بررسی مشاهده گردید که تعداد بلاستومرها در محیط کشت GI_{III} بیشتر از محیط کشت Ham's F-۱۰+٪۱۰MS است و حاکی از آن است که تقسیم بلاستومرها، در حضور سرم مادری روند کندتری نسبت به GI_{III} دارد (جدول-۳). علاوه بر مناسب بودن GI_{III}، بعضی از مطالعات حاکی از آن است که محیط‌های کشت GI_{I} و GI_{II} هم نسبت به بعضی از محیط‌های کشت مثل Sydney $_{IVF}$ بهتر عمل کرده و باعث تسریع در تشکیل بلاستوسیت و تقسیم سلولی می‌شوند [۲۳]. در کنار بعضی از محیط‌های کشت، مواد دیگری مثل سیستامین [۲۴]، ماتریکس خارج سلولی [۲۶-۲۵]، کندروایتین سولفات و هیالورونیک اسید [۲۷]، هپاران [۲۸] و قندهای شش کربنی [۲۹] را می‌توان نام برد که به عنوان نگهدارنده مورد استفاده قرار می‌گیرند و بعضی مواقع از آن‌ها برای رشد و نمو بهتر جنین‌ها مخصوصاً در گونه حیوانات استفاده می‌شود و محیط‌های کشت ترکیبی، باعث رشد سریع‌تر و تقسیمات بیشتری می‌شوند [۳۰].

بعضی از مطالعات نشان می‌دهند که افزایش سطح گلوکز خون به عنوان یک عامل تراتوژن عمل می‌کند [۳۲-۳۱] و بالا بودن غلظت گلوکز، باعث تأخیر در رشد و تکامل جنین شده و تعداد بلاستومرها نیز کاهش خواهند یافت [۳۳]. بعضی بر این باورند که اگر میزان گلوکز و یا فروکتوز محیط‌های کشت در حد

۵ میلی‌مول باشد، تقسیم سلول‌های جنین با سرعت بهتری صورت گرفته و بلاستوسیت‌های بیشتری به دست می‌آید [۳۰]. حال با توجه به میزان ۱۱۰ میلی‌مول گلوکز در سرم مادری این سوال مطرح است که آیا علی‌رغم افزوده شدن تنها ۱۰٪ از سرم مادری به محیط Ham's F-۱۰ و با در نظر گرفتن فاکتورهای مثبتی که یک محیط طبیعی به همراه دارد، آیا این امکان وجود دارد که میزان بالای گلوکز در سرم مادری، باعث تأخیر در رشد و تقسیم سلولی شود و اگر این فرضیه درست باشد، ضعف آن را در برابر محیط کشت‌های مختلف منجمله GI_{III} نشان خواهد داد و با نتایج به دست آمده در مطالعه ما، مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعات مختلفی که صورت گرفته است و نتایجی که از این مطالعه به دست آمد، شاید بتوان چنین نتیجه‌گیری کرد که گرچه سرم‌های طبیعی در بعضی مواقع می توانند جایگزین محیط‌های کشت و یا نگهدارنده‌ها شوند ولی استفاده از آن‌ها شرایط خاص خود را می‌طلبد. هم‌چنین در این بررسی مشخص گردید که محیط GI_{III} در بسیاری از فاکتورهای مربوط به جنین، بهتر عمل نموده است.

تشکر و قدردانی

از مساعدت و همکاری آقایان دکتر جهانیان، دکتر بیژنی و کارشناسان محترم مرکز ناباروری بابل کلینیک، خانم‌ها کسرایی، سپهری و سجادی و کارشناسان محترم مرکز ناباروری حضرت فاطمه زهرا (س) خانم‌ها حیدری، فصیحیان و هاشمی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

[1] Walsh Patrick C, Retik Alan B, Vaughan W. Campbell´s Urology. 9th ed. Pennsylvania, Saunders Company. 2007, pp: 609-653.

[2] Jishage KI, Tachibe T, Ito T, Shibata N, Suzuki S, Mori T, et al. Vitamin E is essential for mouse placentation but not for embryonic development itself. *Biol Reprod*, 2005; 73(5): 983-7.

[3] Esfandiari N, Falcone T, Agarwal A, Attaran M, Nelson DR, Sharma RK. Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse embryos. *Obstet Gynecol*, 2005; 105(3): 653-60.

[4] Leveille MC, Tanphaichitr N, Carnegie J. Effects of human sera and human serum albumin on mouse embryo culture. *J Assist Reprod Genet*, 1992; 9(1): 45-52.

[5] Clarke RN, Griffin PM, Biggers JD. Screening of maternal sera using a mouse embryo culture assay is not predictive of human embryo development or IVF outcome. *J Assist Reprod Genet*, 1995; 12(1): 20-5.

[6] Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, 2003; 68(1): 236-43.

[7] Kim HS, Lee GS, Hyun SH, Lee SH, Nam DH, Jeong YW, et al. Improved in vitro development of porcine embryos with different energy substrates and serum. *Theriogenology.* 2004; 61(7-8):1381-93.

[8] Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, et al. Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction.* 2002; 124(1): 141-53.

[9] Chi HJ, Kim DH, Koo JJ, Chang SS. The suitability and efficiency of human follicular fluid as a protein supplement in human in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*, 1998; 70(5): 871-7.

[10] Tsiligianni T, Vandaele L, de Kruif A, Van Soom A. Effect of culture-medium supplementation with alpha-mannosidase and/or beta-N-acetyloglucosaminidase on in vitro bovine

embryonic development. *Anim Reprod Sci*, 2007; 99(1-2): 208-12.

[11] Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, 2003; 68 (1): 239-43.

[12] Sung LY, Du F, Xu J, Chang W, Nedambale TL, Zhang J, et al. The differential requirement of albumin and sodium citrate on the development of in vitro produced bovine embryos. *Reptod Nutr Dev*, 2004; 44(6): 551-64.

[13] Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, Parsons JH. Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 1989; 6(1):30-5.

[14] Laverge H, De Sutter P, Desmet R, Van der Elst J, Dhont M. Prospective randomized study comparing human serum albumin with fetal cord serum as protein supplement in culture medium for in-vitro fertilization. *Hum keprod,* 1997; 12(10): 2263-6.

[15] Mikkelsen AL, Host E, Blaabjerg J, Lindenberg S. Maternal serum supplementation in culture medium benefits maturation of immature human oocytes. *Reprod Bio Med Online*, 2001; 3(2): 112-16.

[16] Russell DF, Baqir S, Bordignon J, Betts DH. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev*, 2006; 73(10): 1255-70.

[17] Gilboa Y, Bar-Hava I, Fisch B, Ashkenazi J, Voliovitch I, Borkowski T, et al. Does intravaginal probiotic supplementation increase the pregnancy rate in IVF-embryo transfer cycles? *Reprod Biomed Online*, 2005; 11(1):71-5.

[18] David N, James R. Danforth's Obsterics&Gynecology. 9th ed, Lipinncott, Williams & Wilkins, Philadelphia, A Wolters Kluwer Company. 2003; pp: 649-67.

[19] Abdoon As, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T. Influence of oocyte quality, culture media and gonadotropins on cleavage rate and development of in vitro fertilized buffalo embryos. *Anim Reprod Sci*, 2001; 65 (3-4): 215-23.

[20] Abe H, Hoshi H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum- free media. *J Reprod Dev*, 2003; 49 (3): 193-202.

[21] Hoshi H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*. 2003; 59 (2): 675-85.

[22] Chen N, Liow SL, Yip WY, Tan LG, Ng SC. Influence of cysteamine supplementation and culture in portable dry-incubator on the in vitro maturation, fertilization and subsequent development of mouse oocytes. *Theriogenology*. 2005; 63(8): 2300-10.

[23] Van Langendonckt A, Demylle D, Wyns C, Nisolle M, Donnez J. Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/ blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. *Fertile Steril*, 2001; 76 (5): 1023-31.

[25] Ghaffari M. Effect of artifitial extracellular matrix on function of human endometrial cells in vitro. *J Repro Infertil*, 2000; 2: 40-9.

[26] Figueiredo F, Jones GM, Thouas GA, Trounson Ao. The effect of extracellular matrix molecules on mouse preimplantation embryo development in vitro. *Reprod Fertil Dev*, 2002; 14 (7-8): 443-51.

[27] Simon A, Safran A, Revel A, Aizenman E, Reubinoff B, Porat-Katz A, et al. Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole macromolecule in a human embryo transfer medium. *Fertil Steril*. 2003; 79(6): 1434-8.

[28] Revel A, Helman A, Koler M, Shushan A, Goldshmidt O, Zcharia E, et al. Heparanase improves mouse embryo implantation. *Fertil steril*, 2005; 83(3): 580-6.

[29] Wongsrikeao P, Otoi T, taniguchi M, Karja NW, Agung B, Nii M, et al. Effect of hexoses on in vitro oocyte maturation and embryo development in pigs. *Theriogenology*. 2006; 65(2): 332-43.

[30] Zeng W, Feng Z. Improvement of mouse early embryo development in vitro by co- culture with human oviductal epithelial cells in serum- free medium. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 1998; 33 (10): 604.

[31] Donnay I, Feugang JM, Bernard S, Harchandise J, Pampfer S, Moens A, et al. Impact of adding 5.5 mM glucose to SOF medium on the development, metabolism and quality of in vitro produced bovine embryos from the morula to the blastocyst stage. *Zygote*. 2002; 10 (3): 189-99.

[32] Iwata H, Ohota M, Hashimoto S, Kimura K, Isaji M, Miyaka M. Stage- Specific effect of growth hormone on development competence of bovine embryos produced in–vitro. *J Reprod Dev*, 2003; 49 (6): 493-9.

[33] Amiri I, Marzban H, Barbarestani M, Nematollahi N. Effect of L-arginine on development of mouse preimplantation embryos in culture media with high level of glucose. *J Repro Infertil*, 2001; 2(7): 4-12.