

مطالعه مرفومتریک جنین های مرحله قبل از لانه گزینی موش: مقایسه جنین های تکوین یافته در محیط داخل [In vivo] و خارج بدن [In vitro]

آیلر کلتنه^۲سمیه بحرالعلومی^۲عباسعلی کریم پور^۱فرشته طالب پور^۴امیر اسماعیل نژاد مقدم^۳

چکیده

سابقه و اهداف: مطالعه جنین های مرحله قبل از لانه گزینی بدلیل اهمیت کشت و انتخاب آنها برای انتقال به رحم در درمان ناباروری و نیز در تکثیر حیوانات اهلی، مطالعه ای مهم قلمداد می شود. با مقایسه کمی جنینهای (In vitro) و (In vivo) احتمالاً می توان به معیارهای مرفولوژیک دقیق تری جهت انتخاب جنین های با کیفیت بهتر دست یافت.

مواد و روش ها: جنین ها از موشهای NMRI پس از تحریک تخمدانی بدست آمدند. جنین های مراحل ۱، ۲، ۴، ۸ سلولی، مرولا و بلاستوسیست به ترتیب در ساعات ۱۸، ۳۶، ۵۲، ۶۰، ۷۲ و ۹۶ بعد از تزریق hCG از بدن حیوانات حامله خارج شده و با جنین های همان مرحله که در In vivo رشد کرده بودند، مقایسه شدند. قطر خارجی و داخلی جنین، قطر پرده شفاف و تعداد بلاستومرهای بلاستوسیست کامل، شاخص های کمی مورد مطالعه در این تحقیق بودند.

یافته ها: قطر خارجی، قطر داخلی و قطر پرده شفاف در اووسیت و زیگوت موش به ترتیب ۹۹/۹، ۷۵/۴ و ۴/۹ میکرومتر بوده است. این اندازه ها تا مرحله بلاستوسیست اولیه (Early blastocyst) در هر دو گروه In vitro و In vivo بدون تغییر معنی دار بوده است. اما در مرحله بلاستوسیست کامل اندازه جنین نسبت به مراحل قبل بطور معنی داری بزرگتر ($P < 0.05$) و قطر پرده شفاف بطور معنی داری کمتر شده است ($P < 0.05$). این تفاوت در هر دو گروه In vitro و In vivo نسبت به مراحل قبل وجود داشت. همچنین اندازه بلاستوسیست کامل در گروه In vivo (۱۱۶/۵ میکرومتر) بطور معنی داری از بلاستوسیست کامل In vitro (۱۰۴/۳ میکرومتر) بزرگتر بوده است ($P < 0.05$). تعداد بلاستومرها در گروه In vivo در مقایسه با گروه In vitro بطور معنی دار بیشتر بوده است ($P < 0.05$). جنین ها در In vitro بطور متوسط در ساعت ۱۱۰ بعد از تزریق hCG به مرحله بلاستوسیست کامل رسیدند در حالی که این زمان در In vivo حدود ساعت ۹۶ بوده است.

استنتاج: بر اساس یافته های این مطالعه می توان گفت که تا قبل از مرحله بلاستوسیست نمی توان با معیار قطر جنین و قطر پرده شفاف کیفیت جنین ها را تعیین کرد ولی در مرحله بلاستوسیست قطر جنین و تعداد بلاستومرها احتمالاً می تواند تعیین کننده کیفیت جنین باشد. همچنین سرعت تقسیم جنین و زمان رسیدن به مرحله بلاستوسیست نیز می تواند مهم باشد.

واژه های کلیدی: مرفومتري جنین، جنین اولیه موش، بلاستوسیست، پرده شفاف

مقدمه

مرحله قبل از لانه گزینی (Preimplantation period) می باشد. در این مرحله سلول تخم پس از چندین تقسیم مرحله ای مهم از مراحل تکوین جنین در پستانداران که به تقسیمات کلیواژی معروف است، به بلاستوسیست

این تحقیق طی شماره ۴-۸۰ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

مؤلف مسئول: دکتر عباسعلی کریم پور: ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

Email: amalekshah@yahoo.com

۱. دکترای بافت و جنین شناسی، عضو مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی و استاد دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴. کارشناس ارشد علوم تشریح و بافت شناسی، مربی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۱۰/۱۶ تاریخ تصویب: ۸۷/۱۱/۹

تبدیل شده و سپس شروع به لانه‌گزینی در اندومتر رحم می‌کند. سهولت نسبی کشت جنین‌های مرحله مزبور در محیط‌های کشت، مطالعه دقیق فرایند تکوین آنها را امکان‌پذیر ساخت. محدوده تحمل جنین‌های اغلب پستانداران در شرایط غیر اپتیمال کشت نسبتاً وسیع است بگونه‌ای که ممکن است اغلب جنین‌ها به رشد خود تا مرحله بلاستوسیت ادامه دهند، اما مطالعات مختلف نشان داده است که بسیاری از تخمک‌ها و جنین‌های رشد یافته در محیط خارج از بدن، حتی اگر از لحاظ مرفولوژی کاملاً طبیعی بنظر برسند ممکن است دچار تغییرات نامحسوسی در سطح مولکولی و ساختمانی شده باشند که صلاحیت آنها را جهت ادامه رشد در مراحل بعدی تکوین با مشکل مواجه می‌سازد (۱). استفاده از روش‌های مختلف لقاح خارج رحمی برای درمان ناباروری در انسان طی دهه‌های اخیر، اهمیت مطالعه تکوین جنین‌های مرحله قبل از لانه‌گزینی را دوچندان کرده است. با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در تولید محیط‌های کشت و تلاش برای نزدیک‌تر کردن شرایط محیط خارج به محیط طبیعی داخل بدن، هنوز نمی‌توان صلاحیت بقاء (Viability) جنین‌های تکوین یافته در محیط کشت را با جنین‌های همان مرحله که در داخل بدن تکوین یافتند برابر دانست. به همین دلیل انتخاب مناسب‌ترین جنین‌ها برای انتقال به رحم هم در روش‌های تکثیر آزمایشگاهی حیوانات اهلی و هم در روش‌های درمان ناباروری در انسان همچنان از مسائل مطرح و مهم می‌باشد (۲،۳،۴). در حال حاضر در آزمایشگاه، این انتخاب با استفاده از معیارهای مرفولوژیک همانند نمای ظاهری، یک دست بودن اندازه بلاستومرها، کمتر بودن تعداد تکه‌های (Fragments) سلولی، تعداد و پراکندگی پیش‌سازهای هستکی صورت می‌پذیرد (۵،۴،۲). با وجود آسان بودن ارزیابی جنین با استفاده از معیارهای مرفولوژیک، کارآیی این معیارها در تعیین صلاحیت تکوینی جنین کامل نبوده و تلاش برای دستیابی به

معیارهای دقیق تری و در عین حال غیر تهاجمی و عملی، باشند همچنان از زمینه‌های مهم تحقیقات جنین‌شناسی کاربردی می‌باشد (۶،۷،۸). مقایسه مرفومتريک (کمی) جنین‌های تکوین یافته در محیط کشت (In vitro) با جنین‌های رشد یافته در محیط طبیعی داخل بدن (In vivo)، علاوه بر ارزش نظری، می‌تواند معیارهایی را دست دهد که دستمایه تحقیقات بیشتر برای رسیدن به معیارهای دقیق‌تر برای انتخاب جنین‌های با کیفیت بالاتر جهت انتقال به رحم در کلینیک‌های درمان ناباروری و یا مراکز اصلاح نژاد و تکثیر حیوانات اهلی شود. این مقایسه بر این فرض مبتنی است که شرایط In vitro در هر صورت در مقایسه با شرایط داخل بدن (In vivo) محیطی پایین‌تر از حد نرمال (Suboptimal) می‌باشد (۱)؛ مسلم است که جنین‌های رشد یافته که در این شرایط بسته به میزان تفاوت شرایط محیط کشت با شرایط نرمال داخل بدن، از لحاظ خصوصیات فنوتیپی کمی و کیفی می‌توانند تفاوت‌هایی را با جنین‌های رشد یافته در داخل بدن نشان دهند. بدیهی است هر چه جنین‌های رشد یافته در محیط کشت فنوتیپ نزدیک تری در مقایسه با جنین‌های داخل بدن نشان دهند از کیفیت بالاتر و صلاحیت رشد مناسب تری برخوردارند و منطقی است که تصور کنیم که شاخص‌های کمی و مرفومتريک از دقت بالاتری برای این منظور برخوردارند. اگرچه بسیاری از شاخص‌های کمی و مرفومتريک مانند اندازه بلاستوسیت و تعداد بلاستومرها در مطالعات مختلف در کنار سایر اهداف مورد توجه قرار گرفتند (۹،۳،۱،۱۱،۱۰)؛ اما تا آنجا که ما جستجو کردیم مطالعات مستقلی که در آنها مشخصات مرفومتريک جنین‌های مرحله قبل از لانه‌گزینی در دو گروه In vivo و In vitro اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفته باشد نادر است.

در مطالعه حاضر برخی از مهمترین شاخص‌های مرفومتريک در جنین‌های مرحله قبل از لانه‌گزینی

موش در دو گروه In vivo و In vitro اندازه گیری و با هم مقایسه شدند.

مواد و روش ها

حيوان آزمایشگاهی و گرفتن جنین ها

برای تهیه جنین از موش های سفید NMRI (موسسه رازی تهران) استفاده شد. سن حیوانات ۶ تا ۱۰ هفته و نگهداری آنها در شرایط دمایی ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت نور، آب و غذای کافی بوده است. برای تهیه جنین به حیوانات ماده، ۷ واحد هورمون HMG (سرونو، ایتالیا) و ۴۸ ساعت بعد ۷ واحد hCG (سرونو، ایتالیا) به روش داخل صفاقی تزریق شد. بلافاصله بعد از تزریق hCG هر حیوان ماده با یک سر موش نر بالغ از همان گونه در یک قفس جفت گذاری شده و صبح روز بعد، با معیار پلاک واژنی، حیواناتی که جفت گیری کردند جدا کرده و برای گرفتن جنین مورد استفاده قرار گرفتند.

برای گرفتن جنین های ۱، ۲، ۴، ۸ سلولی، موش های حامله به ترتیب در ساعات ۱۸، ۳۶، ۵۲ و ۶۰ پس از تزریق hCG به روش قطع نخاع گردنی کشته شده و لوله های رحمی آنها خارج و به محیط کشت HTF حاوی بافر HEPES انتقال داده شدند. سپس با تزریق مقدار اندکی محیط به داخل لوله رحمی (Flushing) جنین ها خارج و به قطره های کشت انتقال داده شدند. اندازه گیریهای مرفومتريک بلافاصله پس از این مرحله انجام می شد. جنین های مراحل مرولا و بلاستوسیست کامل (Expanding blastocyst) حیوانات حامله به ترتیب در ساعات ۷۲ و ۹۶ پس از تزریق hCG کشته شدند؛ سپس رحم آنها خارج و به محیط کشت منتقل شده در نهایت و با تزریق محیط کشت به شاخهای رحمی جنین ها خارج و جمع آوری می شدند.

برای کشت و بدست آوردن جنین ها در مراحل مختلف محیط آزمایشگاه (In vitro)، جنین های ۲ سلولی (Late 2-cell) در ساعت ۴۶ از بدن حیوان خارج و به

محیط کشت Ham's F10 حاوی ۱۰ درصد سرم آلبومینار انسانی (HAS) منتقل شدند و بمدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷، فشار ۵ درصد CO2 کشت داده شدند. در ساعت ۲۴ و ۴۸ کشت، به ترتیب تعدادی از جنین های ۴-۸ سلولی و مرولا از محیط کشت خارج و به محیطی جدید انتقال داده شده و بلافاصله اندازه گیریهای لازم انجام می شد. در پایان ۷۲ ساعت بلاستوسیست های کامل از جنین هایی که به این مرحله نرسیدند جدا و ابتدا شاخص های مورد نظر در آنها اندازه گیری و سپس برای شمارش بلاستومر ها مورد استفاده قرار می گرفتند.

اندازه گیری مرفومتريک

قطر خارجی و داخلی جنین، قطر پرده شفاف (Zona pellucida) و تعداد بلاستومر های بلاستوسیست شاخص های کمی مورد مطالعه در این تحقیق بودند. برای اندازه گیری قطر جنین ها از میکروسکوپ حاوی صفحه مدرج چشمی (Ocular micrometer) استفاده شد. این صفحه بر روی عدسی چشمی نصب شد و با توجه به مدرج بودن براحتی می توان ابعاد جنین و قطر پرده شفاف را اندازه گیری کرد. برای هر یک از ابعاد مورد نظر حداقل سه اندازه گیری در محور های مختلف انجام شد و میانگین آن به عنوان اندازه واقعی ثبت شد.

برای شمارش بلاستومرها، بلاستوسیست به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه در قطره ای از محلول ۱ درصد سیترات سدیم قرار داده شد و سپس به سطح یک لام میکروسکوپی منتقل شد و با استفاده از مخلوط اتانل-اسید استیک فیکس و در محیط هوای آزمایشگاه خشک گردید. پس از فیکس کردن، رنگ آمیزی بلاستوسیست ها با استفاده از رنگ گیمسا انجام و شمارش بلاستومرها انجام پذیرفت.

بررسی آماری

برای مقایسه آماری قطر جنین ها و ضخامت پرده شفاف در مراحل مختلف و گروههای In vivo و In vitro از آزمونهای آماری ANOVA و Tukey استفاده شد.

مقایسه تعداد بلاستومرها در دو گروه In vivo و In vitro با استفاده از آزمون T-student انجام شد.

یافته ها

قطر خارجی و داخلی و قطر پرده شفاف در اووسیت موش به ترتیب ۹۹/۹±۳/۳، ۷۵/۴ و ۴/۹ میکرومتر بوده است. این اندازه ها در مراحل مختلف تکوین

جنین اولیه شامل مراحل دوسلولی، چهارسلولی، هشت سلولی، مروزا و بلاستوسیست اولیه (شروع بلاستولاسیون) در هر دو گروه In vivo و In vitro تغییر معنی داری پیدا نمی کند. همچنین اندازه جنین ها در مراحل یاد شده تفاوتی را بین دو گروه In vivo و In vitro نشان نمی دهد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه شاخص های مرفومتريک (میانگین و انحراف معیار) جنین های اولیه موش در شرایط In vitro و In vivo

مرحله و شرایط تکوین جنین (N)	قطر خارجی	قطر داخلی	قطر پرده شفاف (زونا)	تعداد بلاستومر
اووسیت (۱۰)	۹۹/۹±۳/۳	۷۵/۴±۶/۶	۴/۹±۰/۶	-
۲ سلولی (۴۹)	۹۸/۹±۳/۸	۷۳/۶±۴/۵	۴/۶±۰/۵	-
In vivo (۲۲)	۹۷/۹±۳/۲	۷۶/۱±۵/۵	۴/۷±۰/۷	-
۴ سلولی				
In vitro (۴۵)	۹۹/۱±۵/۱	۷۵/۲±۳/۸	۴/۵±۰/۴	-
In vivo (۳۱)	۹۸/۸±۲/۰	۷۶/۵±۵/۹	۴/۹±۰/۶	-
۸ سلولی				
In vitro (۳۸)	۱۰۰±۲/۷	۷۸/۶±۵/۰	۴/۳±۰/۳	-
In vivo (۳۱)	۹۷/۱±۳/۰	۷۷/۳±۵/۳	۴/۶±۰/۶	-
مروزا				
In vitro (۴۲)	۹۹/۱±۴/۳	۷۹/۵±۴/۹	۴/۳±۰/۴	-
In vivo (۲۰)	۹۹/۰±۵/۴	۸۲/۸±۷/۸	۴/۴±۰/۶	-
بلاستوسیست اولیه				
In vitro (۳۰)	۱۰۲/۷±۴/۵	۸۰/۶±۶/۸	۴/۳±۰/۷	-
In vivo (۳۶)	۱۱۶/۵±۶/۵ ^a	۱۰۸/۹±۶/۵ ^a	۳/۱±۰/۶ ^c	۴۸/۸±۱۱/۲ ^d
بلاستوسیست کامل				
In vitro (۲۱)	۱۰۴/۳±۷/۴ ^b	۹۹/۲±۵/۲ ^b	۳/۶±۰/۶ ^c	۴۳/۳±۴/۵ ^c

^a تفاوت معنی دار در مقایسه با اندازه های متناظر مراحل قبل در همان ستون ($P < 0.05$).

^b تفاوت معنی دار در مقایسه با اندازه های متناظر مراحل قبل در همان ستون ($P < 0.05$).

^c تفاوت معنی دار در مقایسه با اندازه های متناظر مراحل قبل در همان ستون ($P < 0.05$).

^{ab} تفاوت معنی دار در مقایسه با یکدیگر ($P < 0.05$).

^{de} تفاوت معنی دار در مقایسه با یکدیگر ($P < 0.05$).

N = تعداد

۱۰۴/۳، ۹۹/۲ و ۳/۶ میکرومتر بوده است. این اندازه ها نیز نسبت به مراحل قبل از خود تفاوت معنی داری نشان می دهند ($P < 0.05$). اندازه جنین ها در مرحله بلاستوسیست کامل در گروه In vivo در مقایسه با بلاستوسیست های کامل گروه In vitro بزرگ تر بوده که این اختلاف در خصوص قطر خارجی معنی دار بوده است ($P < 0.05$). کاهش قطر پرده شفاف در گروه In vivo نسبت به گروه In vitro معنی دار نبوده است.

اما در مرحله بلاستوسیست کامل (Expanding or full blastocyst)، قطر خارجی، قطر داخلی و قطر پرده شفاف در گروه In vivo به ترتیب ۱۱۶/۵، ۱۰۸/۹ و ۳/۱ میکرومتر بوده است. اندازه جنین در این مرحله بطور معنی داری نسبت به مراحل قبل افزایش پیدا کرد ($P < 0.01$)؛ در حالی که قطر پرده شفاف بطور معنی داری کمتر شده است ($P < 0.05$) همچنین ابعاد مزبور در بلاستوسیست های کامل گروه In vitro به ترتیب

بحث

نسبی این پرده می باشد. این کشیدگی و کاهش ضخامت، به سوراخ شدن پرده مزبور بدنبال تاثیر آنزیم های پروتئولیتیک مترشحه از سلول های تروفوبلاست در قطب رویانی و خروج تدریجی جنین و شروع لانه گزینی آن در اندومتر کمک می کند.

یافته های این مطالعه همچنین نشان داد که جنین های اولیه در شرایط *In vivo* حدود ۲۴ ساعت زودتر از جنین های رشد یافته در *In vitro* به مرحله بلاستوسیست کامل می رسند. همچنین بلاستوسیست های *In vivo* بلاستومرهای بیشتری داشته و از اندازه بزرگتری نیز برخوردارند. این تفاوت در مطالعات قبلی هم نشان داده شد (۳،۹،۱۶،۱۷). مطالعه فوق ساختمانی (Ultrastructural) بلاستوسیست ها نشان داد که در شرایط *In vivo* تراکم حجمی میتوکنندری و سایر اندامک های دخیل در متابولیسم بلاستومر ها در مقایسه با شرایط *In vitro* افزایش می یابد؛ همچنین نسبت حجمی هسته به سیتوپلاسم که یک شاخص مهم نشان دهنده میزان فعالیت سلولی است در بلاستومرهای بلاستوسیست های *In vivo* در مقایسه با *In vitro* افزایش پیدا می کند؛ در مقابل تراکم حجمی قطره های لیپیدی و نیز واکوئول در سیتوپلاسم بلاستومرهای جنین های *In vitro* بیشتر می شود که نشان دهنده نوعی تغییر نامطلوب سیتوپلاسمی در این سلول هاست (۱۸). افزایش فعالیت متابولیک بلاستومرها و عدم وقوع تغییرات نامطلوب سیتوپلاسمی در آنها در شرایط *In vivo* می تواند توجه کننده سرعت بالاتر تقسیم سلولی در این سلول ها باشد. سرعت بالاتر تقسیم جنین ها در شرایط *In vivo* در مقایسه با *In vitro* مویید این نظریه است که سلول های پوششی لوله رحمی و رحم علاوه بر ایجاد شرایط متابولیک لازم برای رشد و تمایز جنین اولیه، احتمالاً با تاثیرات القایی خود از طریق ترشح سیتوکین های مختلف این رشد و نمو را تنظیم

مقایسه اندازه جنین ها در مراحل مختلف رشد قبل از لانه گزینی نشان داد که اندازه آنها از مرحله اووسیت و جنین یک سلولی (سلول تخم، Zygote) تا مرحله آغاز بلاستولاسیون تغییر قابل ملاحظه ای پیدا نمی کند؛ اما وقتی بلاستولاسیون کامل شد اندازه بلاستوسیست کامل و توسعه یافته بطور معنی داری از جنین های مراحل قبل از خود بزرگ ترمی باشد. از این لحاظ جنین های *In vitro* نیز شرایطی مشابه با جنین های *In vivo* دارند. این موضوع در مطالعات قبلی، در جنین های گاو (۱۲)، خوک (۱۳) و اسب (۱۴) هم نشان داده شد. از آنجا که در تقسیمات اولیه جنین (تقسیمات کلیواژی) اندازه بلاستومر ها در فاصله بین تقسیمات به مقدار ناچیزی بزرگ تر می شود عدم تفاوت اندازه کلی جنین در هر مرحله نسبت به مرحله قبل قابل درک می باشد. Sakkas و همکارانش (۱۹۸۹) نشان دادند که در جنین های بز در ۳ یا ۴ تقسیم اول بعد از لقاح سرعت تقسیم کند بوده و زمان هر سیکل تقسیم ۲۴ تا ۳۶ ساعت می باشد اما در تقسیمات بعدی این زمان به ۱۰ تا ۱۲ ساعت کاهش می یابد (۱۵). به نظر می رسد این وضعیت با مختصری تفاوت در مورد جنین های اولیه پستانداران دیگر نیز صادق باشد. افزایش سریع تقسیمات در مراحل منتهی به بلاستوسیست، سبب می شود که تعداد بلاستومر ها در مرحله بلاستوسیست کامل بحدی برسد که اندازه و حجم جنین را بطور معنی داری افزایش دهد. به عبارت دیگر اندازه جنین در مراحل پایین تر هم نسبت به مرحله قبل خویش افزایش پیدا می کند اما این افزایش ناچیز بوده و اختلاف معنی داری را ایجاد نمی کند؛ اما در مرحله بلاستوسیست کامل بدلیل افزایش قابل ملاحظه تعداد بلاستومر ها افزایش نهایی اندازه جنین معنی دار می شود. کاهش قطر پرده شفاف در نتیجه افزایش تعداد بلاستومرها و افزایش حجم جنین نشانگر انعطاف پذیری

یافته در محیط آزمایشگاه را تعیین کرد، ولی در مرحله بلاستوسیست معیارهای اندازه جنین، ضخامت پرده شفاف و تعداد بلاستومرها می توانند تعیین کننده باشند. بر این اساس می توان گفت که جنین هایی که از اندازه بزرگتر، پرده شفاف نازکتر و بلاستومرهای بیشتری برخوردارند، احتمالاً دارای کیفیت بالاتری نیز می باشند. همچنین سرعت رشد جنین می تواند معیاری قابل ملاحظه برای تعیین کیفیت جنین باشد؛ بگونه ای که جنین هایی که سریعتر به مرحله بلاستوسیست برسند احتمالاً از کیفیت بهتری برخوردارند.

می کنند. در تایید این نظر برخی محققان نشان دادند که با استفاده از سیستم کشت کمکی (Co-culture) به جای محیط های کشت ساده، می توان سرعت رشد و تقسیم سلولی در جنین های اولیه را افزایش داد بگونه ای که بلاستوسیست های حاصل از کشت در محیط Co-culture از لحاظ سرعت رشد و تعداد بلاستومرها تفاوتی را با بلاستوسیست های بدست آمده از In vivo نشان نمی دهند (۱۹).

بر اساس یافته های این مطالعه می توان گفت که تا قبل از مرحله بلاستوسیست، نمی توان با معیارهای اندازه جنین و ضخامت پرده شفاف کیفیت جنین های رشد

References

1. Kim DH, Ko DS, Lee HC, Lee HJ, Park WI, Kim SS, et al. Comparison of maturation, fertilization, development and gen expression of mouse oocytes grown in vitro and in vivo. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21(7): 233-240.
2. Lan KC, Huang FJ, Lin YC, Kung FT, Hsieh CH, Huang HW, et al. The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo survival on day 5. *Hum Reprod* 2003; 18(6): 1299-1306.
3. Wright jr RW, Ellington J. Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenol* 1995; 44(8): 1167-1189.
4. Salamets A, Granskog CH, Suikkar AM, tutinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001; 16(10): 2177-2181.
5. Conaghan J, Hardy K, Handyside AH, Winston RM, Leese HJ. Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. *J Assist Reprod Genet* 1993; 10(1): 21-30.
6. Petersen CM, Mauri AL, Ferreira R, Baruffi RLR, Franco JG. Embryo selection by the first cleavage parameter between 25 and 27 hours after ICSI. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18(4): 211-214.
7. Van Montfoot APA, Dumoulin JCM, Kester ADM, Evers JLH. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod* 2004; 19(9): 2103-2108.
8. Milki AA, Hinckley MD, Gebheard J, Dasing D, Westphal LM, Bebr B. Accuracy of day-3 criteria for selecting the best embryos. *Fertil Steril* 2002 77: 1191-1195.
9. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Sharpiro BS. Quantitative grading of a

human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril* 2002; 76(6): 1157-1167.

10. Kim DH, Kim MK, Lee HC, Ko DS, Park WI, Kwon HC, Lee HJ. Effect of partial laser assisted hatching on mouse embryos. *Korean J Fertil Steril* 2001; 28(2): 147-154.

11. Michael H, Friedrich S, Hendrik S, Franca R, Markus G, Dawit T, Danyel J, Ernst T, Josef G, Karl S. Bovine blastocyst diameter as a morphological tool to predict embryo cell counts, embryo sex, hatching ability and developmental characteristics after transfer to recipients. *Reprod Fertil Develop* 2006; 18(5): 551-557.

12. Linder GM, Wright RW. Morphological evaluation of bovine embryos. *Theriogenol* 1983; 20: 407-416.

13. Linder GM, Wright RW. Morphological aspects of the development of swine embryos in vitro. *J Anim Sci* 1978; 46: 711-716.

14. Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R. Development of hours embryos up to twenty-two days after ovulation: observation on fresh specimens. *J Anat* 1982; 135: 191-209.

15. Sakkas D, Batt PH, Cameron AWN. Development of preimplantation goat embryos in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* 1989; 87: 359-365.

16. Holm P, Booth PJ, Callesen H. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reprod* 2002; 123: 553-565.

17. Pomar FJR, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B, Roelen BAJ. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenol* 2005; 63: 2254-2268.

18. Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural morphometry of bovine blastocyst produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* 2001; 64: 1375-1385.

19. Azadbakht M, Valojerdi MR, Mowla SJ. Development of mouse embryos co-cultured with polarized or non-polarized uterine epithelial cells using sequential culture media. *Anim Reprod Sci* 2007; 100: 141-157.