Archive of SID

تاثیر دمای ٤ درجه سانتیگراد بر میزان رشد و لانه‌گزینی جنین موش

مهرداد بختیاری Ph.D.☆♦، Eneie Sato Ph.D.★، احمد حسینی Ph.D.★
یوسف صادقی Ph.D.★، مجتبی کریمی پور Ph.D.★

☆ دانشگاه علوم پزشکی خرم آباد، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی توهوکو ژاپن

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

★ دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۳۵۵-۱۹۸۳۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** بررسی تاثیر دمای ۴ درجه سانتیگراد بر میزان رشد و لانه‌گزینی جنین موش.

* **مواد و روشها:** موشهای ماده پس از تحریک تخمک‌گذاری، جفت‌گیری نموده و با مشاهده پلاک واژنی، ۴۸ ساعت پس از تزریق HCG کشته شدند. جنینهای دو سلولی به روش Flushing لوله رحم جمع آوری شده و در محیط M16 رشد نمودند. جنینها به طور تصادفی به گروههای تجربی و کنترل تقسیم شدند. گروههای تجربی (اول تا چهارم) به ترتیب به مدت ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده و جنینهای گروه کنترل در معرض دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار نگرفتند. در هر گروه تعدادی بلاستوسیست به رحم موشهایی که در بارداری کاذب بودند منتقل شدند.

* **یافته‌ها:** بررسی میزان رشد جنینها با میکروسکوپ معکوس نشان داد که از نظر میزان رشد اختلاف معناداری بین جنینهایی که به مدت ۱۸ و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند با جنینهای گروه کنترل وجود ندارد ($P=0.19$ و $P=0.17$) اما میزان رشد در جنینهایی که به مدت ۳۶ و ۴۸ ساعت در این دما قرار گرفته بودند نسبت به جنینهای گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان داد ($P<0.0001$). از طرف دیگر میزان لانه‌گزینی در جنینهایی که به مدت ۱۸ و ۲۴ ساعت در این دما نگهداری می‌شوند نسبت به جنینهای گروه کنترل تفاوت معناداری ندارند ($P=0.79$ و $P=0.74$).

* **نتایج:** یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که نگهداری جنین در دمای ۴ درجه سانتیگراد روشی مفید برای نگهداری کوتاه مدت آن است، با این روش جنین هشت سلولی موش را می‌توان به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت بدون تاثیر در رشد و توان لانه‌گزینی نگهداری نمود.

گل واژگان: دمای ۴ درجه سانتیگراد، جنین موش، لانه‌گزینی، نکوین

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در دمای پایین متابولیسم سلولی کاهش یافته و تقسیمات سلولی متوقف می‌گردد. به طوری که سلولها پس از خروج از شرایط فوق و قرارگیری در محیط کشت مناسب قادر به ادامه رشد هستند. بر این اساس ایده نگهداری گامتها و جنین در دمای پائین به منظور ذخیره آنها برای نیازهای آتی از چند دهه قبل مطرح شده است. نخستین بار Whittingham و همکارانش موفق به نگهداری جنین موش با روش انجمادی شدند (۱) هر چند که قبل از آنها Polge توانسته بود اسپرم گاو را منجمد نماید (۲). در بیست سال گذشته نگهداری جنین در دمای پائین به صورت روشی مرسوم در مراکز باروری آزمایشگاهی پیشرفت قابل توجهی نموده است (۳). با این روشها امروزه جنینهای شانزده گروه از نمونه‌های آزمایشگاهی، اهلی و وحشی نگهداری شده و نتایج قابل توجهی از باروری و تولد متعاقب انتقال آنها به رحم به دست آمده است (۳). پس از اولین گزارشات بارداری با جنینهای منجمد شده انسان (۴) و به دنبال آن تولد نوزاد زنده از جنینهای منجمد شده (۵)، نگهداری جنین انسان در دمای پائین نیز به عنوان بخشی پیوسته در روشهای آزمایشگاهی در درمان ناباروری انسان جایگاه ویژه‌ای یافته است (۶).

هر چند که نگهداری جنین در دمای پائین با روشهای انجمادی با موفقیت بسیار توام بوده است اما کشته شدن جنین (۷) از هم گسیختگی میکروتوبولها (۸)، اختلال در کلیواژ (۹)، اختلال در رشد جنین (۱۰) و کاهش میزان لانه گزینی (۱۱)، پس از نگهداری جنین با روشهای انجمادی گزارش شده است. به دنبال آسیبهای وارده به جنین در روشهای انجمادی که به علت واکنش ضدیخها با پروتئینهای سلول و نیز تشکیل کریستالهای یخ داخل سلولی است، توجه عده‌ای از محققین به روشهای غیرانجمادی و نگهداری جنین در دمای ۰ تا ۱۰ درجه سانتیگراد معطوف گردیده است. نخستین بار تکنیک غیر انجمادی برای نگهداری جنین گوسفند توسط Moore طرح شد (۱۲). پس از آن رشد محدود جنین موش و رت (۱۳)، خرگوش (۱۴) و گاو (۱۵، ۱۶) به دنبال نگهداری در دمای صفر تا ۱۰ درجه سانتیگراد گزارش گردید.

Nakamura جنینهای دو سلولی موش را در محیط PB1 تحت دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری نمود و میزان رشد جنینها را پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۵ و ۱۴ درصد گزارش کرد (نسبت بلاستوسیست به کل جنینها). در آزمایش دیگری وی جنینهای دو سلول موش را در محیط PB1 محتوی غلظتهای متفاوت سوکروز در این دما نگهداری نمود، بالاترین میزان رشد در غلظت ۰/۵ مول سوکروز به دست آمد که برای زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۵۱، ۴۲، ۹ و ۳ درصد بود (۱۷). Miyoshi مورولای موش را برای مدت ۰ تا ۷۲ ساعت در دمای صفر درجه سانتیگراد نگهداری نمود، میزان لانه گزینی بین ۵۲/۹ تا ۷۷/۲ درصد و میزان تولد ۵۶ تا ۵۹/۴ درصد گزارش گردید (۱۸). Kasai نیز مورولاهای موش را به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای صفر درجه سانتیگراد نگهداری نمود و پس از این مدت میزان رشد آنها را ۳ درصد گزارش کرد (۱۳).

Aksoy جنینهای موش را در مراحل مختلف رشد جمع‌آوری و تا مرحله مورولا کشت داد، سپس آنها را در دمای پائین نگهداری نمود. وی نشان داد میزان رشد تا مرحله بلاستوسیست در جنینهای تک سلولی ۵۵/۵ و در جنینهای ۱۶ سلولی ۹۰/۸ است (۱۹). Leibo و همکارانش در مطالعه‌ای مقایسه‌ای در کرایوبیولوژی جنینهای چند گونه (موش، گوسفند، خوک و گاو)، مورولاهای به دست آمده را بین دمای صفر تا ۳ تا درجه سانتیگراد قرار دادند و با بررسی میزان رشد آنها تا مرحله بلاستوسیست نشان دادند که حساسیت جنین نسبت به دمای پائین در گونه‌های مختلف پستانداران متفاوت است. همچنین آنها نشان دادند جنینهایی که در محیط آزمایشگاه به مرحله مورولا می‌رسند نسبت به جنینهایی که در مرحله مورولا از رحم (in vivo) به دست می‌آیند، حساسیت بیشتری به دمای پائین دارند (۳).

در روش غیر انجمادی و استفاده از دمای بالای صفر درجه به علت عدم کاربرد ضدیخها و نیز عدم استفاده از دماهای زیر صفر درجه آسیبهای وارده به جنین در مقایسه با روشهای انجمادی کمتر است، اما با افزایش زمان نگهداری جنین در این روش توان زیستی (Viability) و توانایی لانه گزینی جنینها کاهش می‌یابد (۲۰، ۲۱)، علاوه بر این متابولیسم سلولی کاهش یافته و سیستمهای انتقال متابولیتی آسیب می‌بیند (۲۲، ۲۳)، در نتیجه سرعت تکوین و تسهیم جنین کاهش یافته و یا متوقف می‌گردد (۲۴). بنابراین در روش غیر انجمادی مدت نگهداری جنین محدود خواهد بود.

مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر دمای ۴ درجه سانتیگراد بر میزان رشد و لانه گزینی جنینهای هشت سلولی موش در محیط آزمایشگاه به مدت ۱۸ تا ۴۸ ساعت انجام گرفته است و از نتایج به دست آمده به عنوان الگویی مناسب برای نگهداری کوتاه مدت جنین انسان و برخی گونه‌های اهلی مانند گاو و گوسفند استفاده خواهد شد.

مواد و روشها

در این مطالعه موشهای نژاد ICR با سن ۳ تا ۴ هفته و وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم جهت تحریک تخمک گذاری و موشهایی از همین نژاد با سن ۴ تا ۶ هفته و وزن ۳۰ تا ۳۵ گرم جهت انتقال جنین بررسی شدند.

❋ تحریک تخمک گذاری

به موشهای ماده که برای سازگاری با محیط، در شرایط استاندارد از نظر سیکل نوری (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شده بودند، جهت تحریک تخمک گذاری ۵IU، PMSG به طریق داخل صفاقی (IP) و ۴۸ ساعت بعد به همان روش ۵IU، HCG تزریق شد، سپس با موشهای نر هم نژاد خود تک به تک هم قفس شده و صبح روز بعد برای مشاهده پلاک واژن بررسی شدند. موشهای پلاک مثبت تفکیک شده و در قفس جداگانه‌ای نگهداری شدند.

❋ جمع آوری و کشت جنین

موشهای پلاک مثبت ۴۸ ساعت پس از تزریق HCG به روش Cervical Dislocation کشته شده و اویداکتهای آنها به محیط کشت

www.SID.ir

Archive of SID

M2 منتقل شد، جنینهای دو سلولی به روش Flushing اویداکت جمع آوری و پس از سه بار شستشو در محیط کشت M2 و محیط M16 به قطرات ۲۵µl محیط M۱۶ منتقل شده و جهت ادامه رشد در انکوباتور نگهداری شدند. روز بعد از کشت جنینهای هشت سلولی به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل شامل جنینهایی بود که در معرض دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار نگرفته و جهت ادامه رشد در مدیوم M۱۶ مجدداً به انکوباتور منتقل شدند. گروههای تجربی ۱ تا ۴ جنینهایی بودند که به ترتیب به مدت ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای این منظور جنینهای هشت سلولی به قطرات ۲۵µl محیط M2 که توسط پارافین مایع پوشیده شده بودند، منتقل و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از زمانهای فوق جنینهای گروه تجربی شستشو و جهت ادامه رشد به محیط M۱۶ منتقل شده و در انکوباتور نگهداری شدند.

* بارداری کاذب

در هر یک از گروههای تجربی و کنترل جنینهایی که به مرحله بلاستوسیست متسع (Exp. Blastocysts) رسیدند، برای انتقال به رحم موشهایی که در مرحله بارداری کاذب بودند، انتخاب شدند. برای ایجاد بارداری کاذب (Pseudopregnancy) به موشهای ماده که حدود ۸-۶ هفته سن و ۳۵- ۳۰ گرم وزن داشتند، به روش داخل صفاقی (IP)، ۵IU، PMSG و ۴۸ ساعت بعد به همان روش ۵IU، HCG تزریق و با موشهای نر وازکتومی شده از همان نژاد تک به تک هم‌قفس شدند. صبح روز بعد موشهای پلاک مثبت جدا و در قفس جداگانه نگهداری شدند. این روز، روز اول بارداری کاذب محسوب شد.

* انتقال جنین

موشهایی که در روز چهارم بارداری کاذب بودند با تزریق داخل صفاقی Avrertin به نسبت ۱۴µl در گرم وزن بدن، بیهوش شده و با یافتن شاخ رحم از طریق شکاف ایجاد شده در جدار خلفی بدن، تعداد ۶ تا ۸ بلاستوسیست به هر شاخ رحم منتقل گردید. در گروههای تجربی سوم و چهارم به علت اینکه تعداد بلاستوسیستها جهت انتقال به رحم کافی نبود، انتقال جنین فقط در گروههای تجربی اول و دوم انجام شد. در گروه کنترل ۸ مرتبه و در هر یک از گروههای تجربی ۷ مرتبه انتقال جنین صورت گرفته و در هر مرتبه ۶ تا ۸ بلاستوسیست به شاخ چپ رحم در هر موش منتقل شد.

* روشهای آماری

میزان رشد جنینها و نیز میزان لانه گزینی آنها توسط آزمون X^2 (کای اسکور) تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها

* مقایسه میزان رشد جنینها در گروههای تجربی و کنترل

در این مطالعه جنینهای کنترل در محیط کشت، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از تزریق HCG به ترتیب در مراحل هشت سلولی، مورولا و بلاستوسیست بودند در حالی که جنینهای گروه تجربی که به مدت ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند، ۴۸-۱۸ ساعت دیرتر از گروه کنترل به مرحله مورولا و بلاستوسیست رسیدند.

نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپیک رشد جنینهای گروههای کنترل و تجربی در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس این جدول و آزمون X^2 میزان رشد جنینها تا مرحله بلاستوسیت در گروههای تجربی اول و دوم در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان نمی‌دهد (P=0.19 برای گروه تجربی اول و P=0.17 برای گروه تجربی دوم) در حالی که میزان رشد در گروههای سوم و چهارم در مقایسه با گروه کنترل به نحو معناداری کاهش یافته است (P<0.0001).

جدول ۱: میزان رشد جنینها در گروههای تجربی و کنترل

	گروه کنترل	گروه تجربی اول	گروه تجربی دوم	گروه تجربی سوم	گروه تجربی چهارم
تعداد جنینهای هشت سلولی	۲۶۵	۱۹۰	۱۸۲	۱۶۷	۱۷۲
تعداد بلاستوسیستها	۲۰۶ (۸۲/۸)	۱۵۲* (۸۰)	۱۴۲* (۷۷/۷)	۲۲** (۲۵/۷)	۱۹** (۱۲/۸)

مقادیر داخل پرانتز نشانه درصد است

* با P=۰/۱۹ و P=۰/۱۷ اختلاف معناداری بین گروه کنترل و تجربی اول و دوم وجود ندارد

** با P<۰/۰۰۰۱ اختلاف معناداری بین گروه کنترل و تجربی سوم و چهارم وجود دارد.

* مقایسه میزان لانه گزینی در گروههای تجربی و کنترل

جدول ۲ نشانگر وضعیت لانه گزینی در گروههای آزمایش و کنترل است. بر اساس جدول ۲ و آزمون X^2 میزان لانه گزینی در گروههای تجربی اول و دوم نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان نمی‌دهد (P=0.79 برای گروه اول تجربی اول و P=0.74 برای گروه تجربی دوم).

جدول ۲: میزان لانه گزینی در گروههای تجربی و کنترل

	گروه کنترل	گروه تجربی اول	گروه تجربی دوم
تعداد بلاستوسیستهای منتقل شده	۶۱	۵۲	۵۶
تعداد مجلهای لانه گزینی	۲۰ (۳۹/۲)	۲۵* (۴۷/۱)	۲۲** (۳۲/۹)

مقادیر داخل پرانتز نشانه درصد است.

* با P=۰/۷۹ اختلاف معناداری بین گروه کنترل و تجربی وجود ندارد

** با P=۰/۷۴ اختلاف معناداری بین گروه کنترل و تجربی وجود ندارد

بحث

امکان دسترسی به جنین در موش در هر مرحله‌ای از رشد (تا قبل از هچینگ بلاستوسیست) از اویداکت و شاخ رحم (in vivo) وجود دارد. در این مطالعه جنینهای موش که در محیط آزمایشگاه به مرحله هشت سلولی رسیده و به منظور ارائه مدلی مناسب برای مطالعه گونه‌هایی که دسترسی به جنینهای آنها در محیط آزمایشگاه مشکل یا غیر ممکن است، مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

در مطالعه حاضر جنینهای دو سلولی موش ۷۶ و ۱۲۰ ساعت پس از تزریق HCG به ترتیب به مرحله هشت سلولی و بلاستوسیت متسع

www.SID.ir

Archive of SID

رسیدند. همچنین تقسیمات سلولی در جنینهای نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد متوقف شده و این جنینها پس از انتقال به محیط کشت ۱۸ تا ۴۸ ساعت پس از جنینهای گروه کنترل به مرحله بلاستوسیت رسیدند.

یافته‌های این مطالعه نشان داد که میزان رشد جنینهای هشت سلولی که به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری نداشتند، در صورتی که میزان رشد جنینهای نگهداری شده به مدت ۳۶ تا ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان دادند.

علت کاهش میزان رشد جنینها با افزایش زمان نگهداری آنها در دمای ۴ درجه سانتیگراد که در مطالعات Nakamura (۱۷) Kasai (۱۳) و Miyoshi (۱۸) نیز نشان داده شده است، به درستی مشخص نیست. چنین به نظر می‌رسد که در دمای ۴ درجه سانتیگراد متابولیسم سلولی در جنین کاهش یافته و این امر ضمن کاهش یا توقف سنتز پروتئینهای جنین، سیستم انتقال متابولیتی را مختل می‌کند. احتمالاً در این شرایط پس از مدت کوتاهی عوامل امبریوتروفیک به مواد امبریوتوکسیک تبدیل شده در نتیجهٔ حساسیت جنینها نسبت به ترکیبات نامطلوب محیط کشت و نیز فقدان ترکیبات ضروری جهت رشد آنها با افزایش زمان در این مرحله مرتبط باشد، در این حالت تصور می‌شود که با تغییر ترکیبات محیط نگهداری جنین، افزودن فاکتورهای رشد و هورمونها به آن و نیز تنظیم دقیق سیستم بافرینگ قادر به افزایش مدت زمان نگهداری جنین در این دما باشیم.

نتایج این پژوهش نشان داد میزان لانه گزینی در جنینهایی که به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده‌اند در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان نمی‌دهد. در آزمایش Miyoshi (۱۸) میزان لانه گزینی بلاستوسیستهای حاصل از کشت مورولاهایی که به مدت مشابه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند از میزان لانه گزینی در مطالعه حاضر بیشتر (حدود ۶۰ درصد) و در آزمایش Nakamura (۱۷) میزان لانه گزینی بلاستوسیستهای حاصل از رشد جنینهای دو سلولی نگهداری شده در همین شرایط از مطالعه حاضر کمتر (حدود ۳۶ درصد) گزارش شده است. چنین به نظر می‌رسد جنینهایی که در مراحل مختلف رشد در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شوند، پس از رشد تا مرحله بلاستوسیست پتانسیل متفاوتی برای لانه گزینی دارند، احتمال ارتباط این تفاوت با فعال شدن ژنوم موش در Late-two-cell Stage، آغاز سنتز پروتئینها پس از این مرحله، و مقاومت جنین موش نسبت به دمای ۴ درجه سانتیگراد در مراحل بعدی رشد وجود دارد.

جنین موش را می‌توان در مراحل مختلف رشد از زایگوت تا بلاستوسیست با روشهای انجمادی بدون کاهش معنادار در میزان زنده ماندن و رشد نگهداری نمود (۲۱). اما نگهداری جنین بعضی از گونه‌ها (خوک) و یا نگهداری جنین در بعضی مراحل رشد (مورولای اولیه در گاو) و نیز نگهداری اووسیت اکثر گونه‌ها به علت خصوصیات ویژه با روشهای انجمادی مشکل یا غیر ممکن است (۳). در این موارد ذخیره کوتاه مدت آنها به روشهای غیرانجمادی (نگهداری در دمای ۰ تا ۱۰ درجه سانتیگراد) قابل بررسی است. متوقف شدن رشد جنین در حین نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد منجر به طولانی شدن فاصله بین دو مرحله رشد متوالی می‌شود، در این صورت جنین هشت سلولی یک تا دو روز دیرتر به مرحله بلاستوسیت خواهد رسید، ایجاد جنینهای تاخیری Retarded Embryos با این روش فرصت کافی را جهت بررسی‌های کلینیکی فراهم می‌آورد. از طرف دیگر هنگام انتقال جنین اهداء شده (Donation Embryo Transfer) به رحم پذیرنده، (Recipient) در صورتی که جنین و رحم پذیرنده همزمان (Synchronous) نباشند و جنین زودتر از باز شدن پنجره لانه گزینی (Implantaton Window) به مرحله بلاستوسیست برسد در این صورت می‌توان جنین را مدتی در مرحله هشت سلولی متوقف نمود تا موقعیت مناسب رحم پذیرنده جهت لانه گزینی فراهم گردد.

References

1. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P: Survival of mouse embryos frozen to -196°C, Sci 1972; 178 (59): 411-414

2 .Polge C, Lovelock JE: Preservation of bull semen at -79°C, Vet Record 1952; 64

3. Leibo SP, Martino A: Stage dependent sensitivity of oocytes and embryos to lowtemperature, Animal Rep Sci 1996; 42: 46-53

4.Trounson AO, Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo, Nature 1983; 305, 707

5. Gook DA, Osborn SM, Johnston WI: Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1, 2-propandiol and the configuration of the meiotic spindle, Hum Rep 1993; 8: 1101

6. Pollard JW, Leibo SP: Chilling sensitivity of mammalian embryos, Theriogenol 1994; 41: 101

7. Mazur P, Rall WF: Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova, Cell Biol 1984; 197: 4

8. Trounson A, Kirby C: Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling, Fertil Steril 1989; 778, 52

9. Hunterx JE, Fuller BY, Show RW: Vitrification of human oocyte following minimal exposure to cryoprotectant, Hum Rep 1995; 1184

10. Wada I, Macnamee MC, Wick K, Bradrield JM: Birth characteristics and prenatal outcome of babies conceived from cryopreserved embryos, Hum Rep 1994: 4, 543

11. Pollard JW, Leibo SP; Chilling sensitivity of mammalian embryos, Theriogenol 1994; 40: 101

12. Moore NW, Bilton RJ: The storage of fertilized sheep ova at 5°C, Aus J Biol Sci 1973; 26: 1421-1427

www.SID.ir

Archive of SID

13. Kasai M, Iritani N: A protective effect of sucrose on the survival of mouse and rat embryos stored at 0°C, J Rep Fertil 1983; 68: 377-380
14. Hughes MA, Anderson GB: Short-term storage of rabbit embryos at 4°C, Threiogenol 1982; 18: 275-282
15. Trounson AO, Willadson SM, Rowson LE: The influence of in vitro culture and cooling on the survival and development of cow embryos, J Rep Fertil 1976; 47: 367-370
16. Wilmut I, Polye C, Rowson LE: The effect of cooling to 20, 0 and -196 °C on cow embryos, J Rep Fertil 1975; 45: 409-414
17. Nakamura K, and Isunoda Y: Viability of nuclei of two- cell mouse embryos stored at 4°C and fused with blastomeres of fresh two-cell embryos, Cryobiol 1992; 29:493-499.
18. Miyoshi I, Ishikawa, Kasai M: Useful short- range transport of mouse embryos by means of anonfreezing technique. Lab Animal Sci 1992: 42(2): 198-201
19. Aksoy M, Takahashi Y, Hishinuma M, Elsheikh AS: Influences of retrieval stage and glutathione addition on post- thaw viability of quick frozen mouse morulae during in vitro culture, Theriogenol 1999; 51(4): 681-687
20. Hoppe PC, Coman OR: Reduced survival in utero from transferred mouse blastocysts compared with morulae Gamete es 1983; 7: 161-167
21. Binkerd Pe, Anderson GB: Transfer of cultured rabbit embryos. Gamete Res 1976; 2: 65-73
22. Jung T: Protein synthesis and degradation in non-cultured and vitro cultured rabbit blastocysts. J Rep Fertil 1989; 86: 507-51
23. Jung T, Fischer B, Beier H: Quantitative aspects of protein synthesis in non-cultured and cultured rabbite blastocysts. Hum Rep 1987; 2: 23-29
24. Harlow GM, Quinn P: Development of preimplantation mouse embryos in vitro and in vivo. Aust J Biol Sci 1982; 35: 187-193

www.SID.ir