Archive of SID

تأثیر هم‌کشتی با سلولهای Vero بر تکوین جنینهای ۸ سلولی موش حاصل از انجماد شیشه‌ای

مینا قانعی M.Sc.☆، منصوره موحدین Ph.D. ☆، مجتبی رضازاده Ph.D. ★♦، حسین بهاروند M.Sc.☆

☆ دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح

★ پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

چکیده

* **هدف:** بررسی تأثیر هم‌کشتی بر تکوین جنینهای ۸ سلولی موش حاصل از انجماد شیشه‌ای.

* **مواد و روشها:** بدین منظور در ابتدا جنینهای ۸ سلولی به روش فلاشینگ از لوله رحمی موشهای ماده که قبلاً تحریک تخمک‌گذاری شده بودند، خارج شده و به دو گروه تقسیم شدند. گروه آزمون ۱ شامل جنینهایی که با استفاده از محلول ضدیخ اتیلن گلیکول با غلظت ۴۰درصد به روش انجماد شیشه‌ای منجمد شده و پس از ذوب با محلول ۰/۵ مولار ساکارز به محیط کشت MEMα منتقل شدند. گروه آزمون ۲ شامل جنینهایی که با همان روش قبلی منجمد و ذوب شده و در محیط هم‌کشتی MEMα+Vero قرار گرفتند. برای هر یک از گروههای فوق، گروههای کنترلی شامل جنینهای منجمد نشده انتقال یافته به محیط MEMα (کنترل ۱) و جنینهای منجمد نشده انتقال یافته به محیط هم‌کشتی MEMα+Vero (کنترل ۲) در نظر گرفته شد. مقایسه میزان تکوین جنینها بین گروههای فوق در مدت ۱۲۰ ساعت انجام شده و داده‌ها با روش آماری Chi-square و Fisher بررسی شد.

* **یافته‌ها:** نتایج نشان داد که اختلاف در میزان خروج از زونا در ساعات پایانی کشت بین گروههای آزمون ۱ و کنترل ۱ معنی‌دار بود ($P< 0.05$). همچنین داده‌های حاصل از مقایسه دو گروه آزمون ۲ و کنترل ۲ نشان داد که اختلاف در میزان مورولا، بلاستوسیست و دژنراسیون در ساعات اولیه کشت معنی‌دار است. مقایسه دو گروه آزمون ۱ و آزمون ۲ نیز نشانگر اختلاف معنی‌دار در مرحله مورولا و میزان دژنراسیون جنین‌ها در ساعات اولیه کشت بود ($P< 0.05$).

* **نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق حاکی از آن است که جنین ۸ سلولی موش نسبت به انجماد شیشه‌ای آسیب‌پذیر نبوده و برای بهبود تکوین نیازی به هم‌کشتی با سلولهای Vero نیست.

کل واژگان: انجماد شیشه‌ای، هم‌کشتی، جنین ۸ سلولی موش

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

از زمانی که نگهداری جنین به عنوان یک روش معمولی مطرح شده، بهبود تکنیک‌ها و تحقیق برای سادگی روش انجمادی به منظور افزایش میزان حیات جنینها یک امر ضروری به‌نظر می‌رسد. همه کوششها در جهت بهبود میزان حیات و سادگی روشهای متمرکز شده است (۱، ۲). در لقاح آزمایشگاهی انسانی بدلیل موقعیتهای کلینیکی خاص، نگهداری جنین با تخمک در شرایط سرما ضروری است. یکی از روشهای نگهداری، فرایند یخ‌زدگی آهسته است که برای اولین بار توسط Whittingham در سال ۱۹۷۱ بر جنینهای موش بکار برده شد (۳). دومین روش انجمادی، انجماد شیشه‌ای است. انجماد شیشه‌ای یک فرآیند فیزیکی است که در آن یک محلول غلیظ ضدیخ در طی سرد شدن بدون تشکیل کریستال یخ، شیشه‌ای می‌شود. اولین انجماد شیشه‌ای موفق در سال ۱۹۸۶ توسط Massip و همکارانش بر مورولاهای بلاستوسیستهای ابتدایی گاو انجام شد (۴). روش انجماد شیشه‌ای اثرات اسموتیک و سمی کمتری داشته و بدلیل عبور سریع از منطقه حرارتی خطرناک فاقد آسیب شدید ناشی از سرد شدن است. محلولهای انجمادی در این روش بسیار متنوع هستند. محلول انجمادی حاوی اتیلن گلیکول، فایکل و ساکارز که اولین بار به‌وسیله Kasai و همکارانش (۵) در سال ۱۹۹۰ برای جنینهای موش در مرحله مورولا طراحی شد به‌طور موفقیت‌آمیزی برای بعضی گونه‌های دیگر جانوری نیز به کاررفت. علاوه بر آن بعضی محققین معتقدند هر چه مرحله تکاملی جنین پیشرفته‌تر باشد حتی در صورت آسیب برخی از سلولها در طی روند انجماد، با جایگزینی سلولهای دیگر، تکامل کلی جنین مختل نخواهد شد (۶). در سالهای اخیر سیستم هم‌کشتی به‌منظور بهبود در میزان موفقیت در لقاح خارج از رحمی و نیز رفع اثرات مخرب ناشی از انجماد مورد توجه قرار گرفته است. در حال حاضر روش هم‌کشتی، روش مناسب برای کشت جنین قبل از مرحله لانه‌گزینی می‌باشد. این تکنیک شامل کشت جنینها بر تک‌لایه‌ای از سلولهای سوماتیک به مدت ۶-۳ روز قبل از انتقال به رحم مادر است. از مزایای سیستم هم‌کشتی ثبات یا تغییر شرایط فیزیکوشیمیایی محیط کشت همچون PH محیط، غلظت اکسیژن و دی‌اکسیدکربن است (۷). اثرات هم‌کشتی وابسته به گونه و یا بافت خاصی نیست. ارزیابی کارایی حقیقی هم‌کشتی به‌دلیل تداخل حداقل سه پارامتر متغیر با مشکلاتی روبرو است. (این سه پارامتر عبارتند از: نوع تک‌لایه، لقاح در شرایط آزمایشگاهی و مدت زمان هم‌کشتی). سلولهایی که برای تهیه تک لایه مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل سلولهای اپی‌تلیومی رحم یا لوله رحم حیوانی و انسانی، سلولهای کومولوس یا گرانولوزای انسانی و سلولهای Vero است.

لذا برخی پیشنهاد کرده‌اند که استفاده از هم‌کشتی می‌تواند تکامل جنینهای منجمد - ذوب شده را بهبود بخشیده و به جنین برای غلبه بر فشارهای ناشی از انجماد کمک کند (۸).

با توجه به مطالعات انجام شده در زمینه هم‌کشتی با سلولهای Vero و اثرات مفید آن بر بهبود تکوین جنینها، در این تحقیق از کشت همزمان Vero به دنبال ذوب، با جنینهای ۸ سلولی موش حاصل از انجماد شیشه‌ای استفاده شد تا کیفیت تکوین جنینهای ۸ سلولی ذوب شده بررسی گردد.

مواد و روشها

* تهیه و کشت جنینهای ۸ سلولی

برای تحریک تخمک‌گذاری به موشهای ماده نژاد NMRI در سن ۱۰-۶ هفتگی، ۷/۵ واحد بین‌المللی هورمون HMG و ۴۸ ساعت بعد به همان موش ماده ۷/۵ واحد بین‌المللی هورمون HCG به روش داخل صفاقی تزریق شد و موشهای ماده تزریق شده به صورت دوتایی در مجاورت یک موش نر قرار داده شدند، صبح روز بعد موشهای دارای پلاک واژنی به عنوان شاخص جفت‌گیری جدا شدند. برای بدست آوردن جنینهای ۸ سلولی، ۶۴-۵۲ ساعت پس از تزریق HCG موشهای ماده دارای پلاک واژنی به روش نخاعی کردن، کشته شده و جنینهای ۸ سلولی به روش فلاشینگ از اویداکت خارج شده و به محیطهای کشت مناسب انتقال یافتند. جنینهای بدست آمده به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول برای کشت در محیط MEMα درنظر گرفته شد و به دو زیر گروه آزمون (انجمادی) و کنترل (منجمد نشده) تقسیم شدند. گروه دوم از جنینها نیز برای هم‌کشتی با سلولهای Vero در محیط MEMα درنظر گرفته شده و به دو زیر گروه آزمون (انجمادی) و کنترل (منجمد نشده) تقسیم شدند و تا ۱۲۰ ساعت کشت شدند.

* تهیه محلول انجمادی

در این تحقیق از انجماد به روش انجماد شیشه‌ای مطابق با پروتکل Kasai (۹) استفاده شد. محلول انجمادی در واقع همان محلول EFS، شامل اتیلن گلیکول، فایکل و ساکارز است. ابتدا به ۳۵/۱ میلی‌لیتر محیط PBI، میزان ۱۵ گرم فایکل ۷۰KD اضافه و پس از حل شدن آن، ۸/۵۶ گرم ساکارز نیز اضافه شد. پس از حل شدن ساکارز به میزان ۱۰۵ میلی‌گرم BSA اضافه و حل شد. تا این مرحله محلول بدست آمده FS نام دارد که برای تهیه محلول ۴۰درصدEFS، ۴ میلی‌لیتر اتیلن گلیکول به۶ میلی‌لیتر محلول FS اضافه شد. محلول بدست آمده پس از فیلتر کردن در دمای ۴Ċ تا ۲۰Ċ- نگهداری شد.

برای تهیه محلول ذوب (محلول ساکارز) به ۱۰cc محلول PBI، ۰/۵ مولار ساکارز اضافه کرده و سپس به میزان ۰/۰۴ گرم BSA اضافه شد. محلول حاصل پس از فیلتر شدن در دمای ۴Ċ نگهداری شد.

* روش انجماد شیشه‌ای

در این روش از نی فریز فرانسوی ۰/۲۵ میلی‌لیتر استفاده شد و در ابتدا به میزان ۶۰mm محلول ذوب (محلول ساکارز)، ۱۵mm هوا، ۳mm EFS ۴۰درصد، ۴mm هوا، و ۱۳mm EFS ۴۰درصد وارد نی شد و در هر بار آزمایش جنینها دو دقیقه در محلول ۴۰درصدEFS آبگیری شدند و سپس به محلول ضدیخ داخل نی منتقل شده و سپس ۴mm هوا و جنینهای باقیمانده نی توسط محلول ساکارز (محلول ذوب) پر شد و دهانه نی توسط هماتوکریت بسته شده و بلافاصله در تانک نیتروژن مایع غوطه‌ور شد.

www.SID.ir

Archive of SID

* روش ذوب

ابتدا نی‌ها از درون تانک نیتروژن خارج شده و به مدت ۱۵ ثانیه در درجه حرارت اتاق و سپس بمدت ۱۰ ثانیه در آب ۲۰°C قرار داده شدند. پس از گذشت این زمان محتویات نی در قطره ۱۰۰ میکرولیتری از محلول ساکارز واقع در یک پتری دیش تخلیه شده و پس از ۵ دقیقه جنینها در محیط PB1 شستشو داده شدند و به محیطهای مختلف انتقال داده شدند.

* مراحل کشت و تهیه تک‌لایه سلولهای Vero

سلولهای زنده Vero پس از ذوب در محیط FCS ۱۰درصد+MEMα به داخل فلاسک ۵۰ میلی‌لیتر برای استفاده بیشتر کشت داده شدند. سلول‌ها دو یا سه روز بعد تکثیر کرده و کف فلاسک را اشغال نمودند. تحت‌تأثیر تریپسین ۰/۵درصد و EDTA ۰/۲mg/L در محلول نمکی بافرفسفات (PBS) جدا شدند و سوسپانسیون سلولی دوبار به وسیله معلق سازی در ۵ میلی‌لیتر FCS ۱۰درصد+MEMα و سانتریفوژ کردن شسته شد. سپس سلولها دوباره در همان محیط با دانسیته 1×10^5 سلول در میلی‌لیتر معلق شده و قطره‌گذاری از این محیط در پتری‌دیش انجام شد و روی آن با روغن پارافین مایع پوشانده شد و به انکوباتور ۵درصد Co_2 با حرارت ۳۷°C منتقل شد. دو روز بعد محیط روی تک‌لایه Vero توسط محیط MEMα عوض شد و بعد از ۲۴ ساعت جنینها به محیطهای هم‌کشتی منتقل شدند.

* آزمون آماری

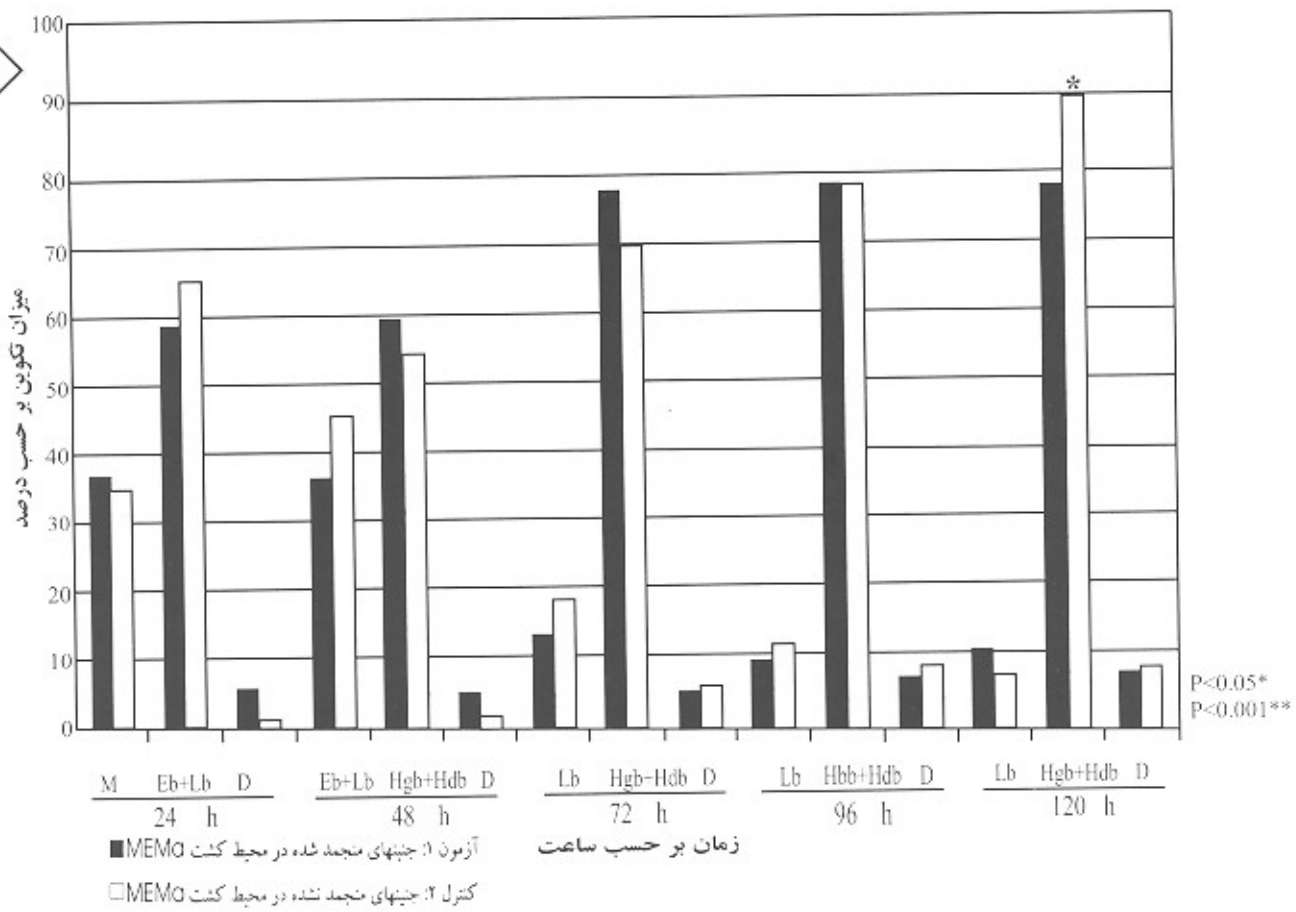
میزان درصد تکامل جنینها و زنده ماندن آنها بین گروههای کنترل و آزمون به وسیلهٔ روش آماری Chi-Square و Fisher بررسی شد.

یافته‌ها

* مقایسه میزان تکوین جنینهای منجمد شده (آزمون ۱) و منجمد نشده (کنترل ۱) در محیط کشت MEMα

نتایج مقایسه تکوین دو گروه فوق در نمودار ۱ آمده است.

گروه آزمون ۱ شامل ۱۱۳ جنین ۸ سلولی بود که با استفاده از اتیلن گلیکول ۴۰درصد منجمد و در محیط MEMα کشت داده شد و گروه کنترل ۱ شامل ۱۴۲ جنین ۸ سلولی منجمد نشده بود که در محیط MEM α کشت داده شد.



نمودار ۱: مقایسه میزان تکوین جنینهای ۸ سلولی منجمد شده و گروه کنترل با استفاده از محیط کشت MEMα

www.SID.ir

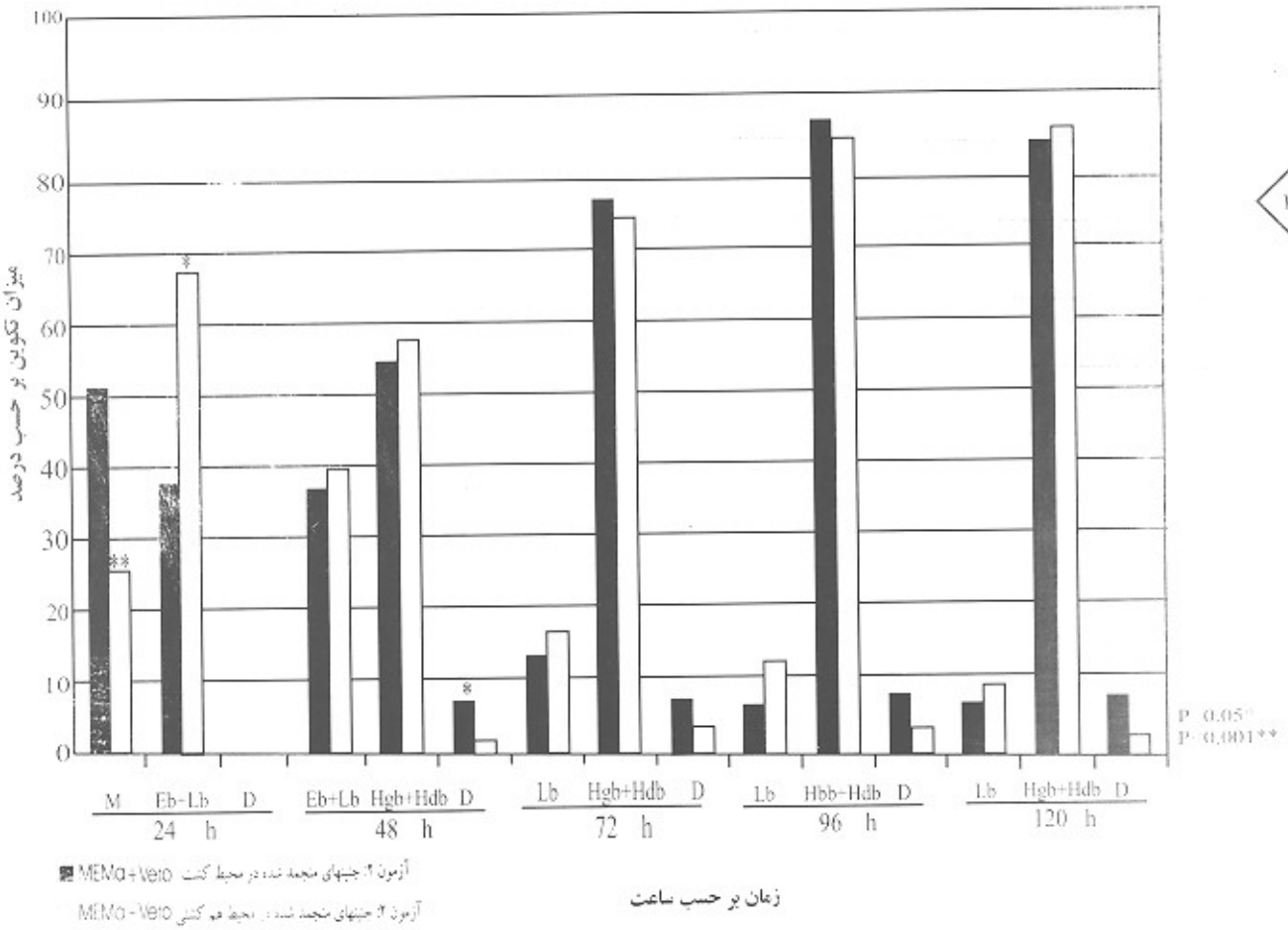
Archive of SID

باگذشت ۲۴ ساعت از زمان‌کشت بیشترین درصد جنینهای هر دوگروه آزمون و کنترل در مرحله بلاستوسیست (اولیه و ثانویه) بودند. (۵۹درصد در زیرگروه منجمد شده و ۶۴درصد در زیرگروه کنترل). میزان دژنراسیون جنینها درگروه آزمون ۱ بیش ازگروه کنترل ۱ بود اما این تفاوت معنی‌دار نبود. پس از ۴۸ ساعت از زمان کشت، بیشترین درصد جنینهای هر دوگروه در مرحله بلاستوسیست (هچینگ[1] و هچ[2]) بودند (۵۹درصد در زیرگروه منجمد شده و ۵۴درصد در زیرگروه کنترل ۱). میزان دژنراسیون درگروه آزمون ۱ بیش ازگروه کنترل ۱ بود. (۶درصد). پس از ۷۲ ساعت کشت، بیشترین درصد جنینهای هر دو گروه در مرحله بلاستوسیست (هچینگ و هچ) بودند (۷۸درصد در گروه آزمون ۱ و ۷۰درصد درگروه کنترل ۱). میزان دژنراسیون در گروه کنترل ۱ بیش ازگروه آزمون ۱ بود که البته این تفاوت ظاهری بوده و معنی‌دار است.

پس از ۹۶ ساعت کشت نیز بیشترین درصد جنینهای هر دوگروه در مرحلهٔ بلاستوسیست (هچینگ و هچ) بودند (۸۰درصد در هر دوگروه آزمون ۱ و کنترل ۱). میزان دژنراسیون درگروه کنترل ۱ بیش از گروه آزمون ۱ بود که این تفاوت نیز ظاهری و معنی‌دار است. باگذشت ۱۲۰ ساعت از زمان کشت، بیشترین درصد جنینها در هر دوگروه در مرحله بلاستوسیست (هچینگ و هچ) بودند (۸۰درصد از گروه آزمون ۱ و۹۲درصد درگروه کنترل ۱) که این تفاوت معنی‌دار بود ($P< 0.05$). میزان دژنراسیون درگروه کنترل ۱ بیش از گروه آزمون ۱ بود که البته این تفاوت معنی‌دار نیست.

مقایسه میزان تکوین جنینهای منجمد شده (آزمون ۲) و جنینهای منجمد نشده (کنترل ۲) در محیط هم‌کشتی MEMα+Vero انجام شد. نتایج مزبور در نمودار ۲ آمده است.

در گروه آزمون ۲ تعداد ۸۴ جنین ۸ سلولی با استفاده از اتیلن گلیکول ۴۰درصد منجمد شده و به محیط هم‌کشتی منتقل شدند. در گروه‌کنترل ۲ تعداد ۲۱۵ جنین ۸ سلولی منجمد نشده به محیط هم‌کشتی MEMα+Vero منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت از زمان‌کشت، بیشترین درصد جنینهای گروه آزمون ۱ در مرحله مورولا (۵۱درصد) و بیشترین درصد جنینها درگروه کنترل ۲، در مرحله بلاستوسیست (اولیه و ثانویه) ۶۸درصد بود. اختلاف بین درصد جنینهای مرحله مورولا در هر دوگروه آزمایشی معنی‌دار بود ($P< 0.001$). میزان دژنراسیون جنینهای هر دوگروه صفر بود. پس از ۴۸ ساعت، بیشترین درصد

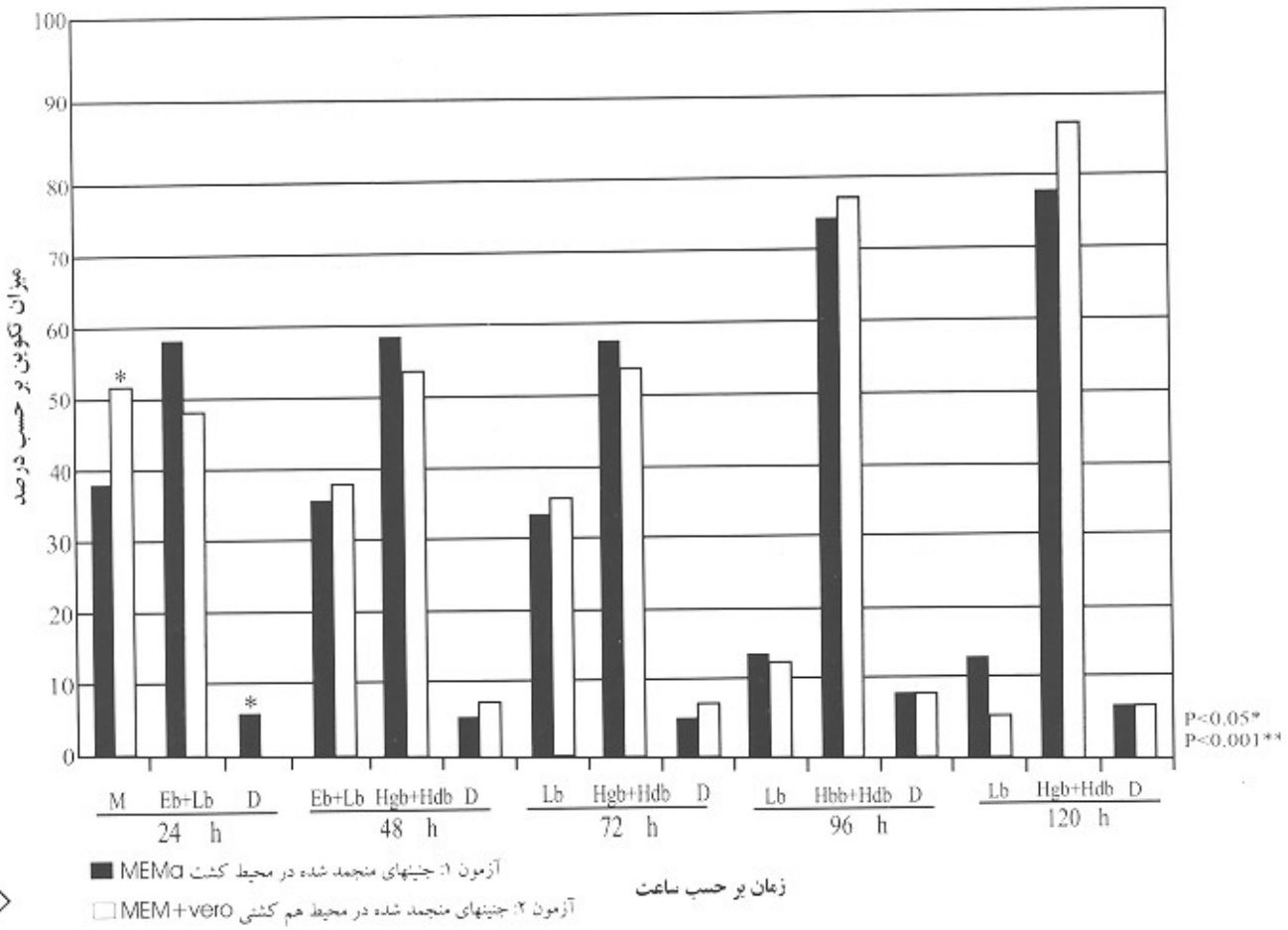


نمودار ۲: مقایسه میزان تکوین جنینهای ۸ سلولی منجمد شده و گروه کنترل با استفاده از α محیط کشت MEM+Vero

1. Hatching: خروج از زونا
2. Hatched: خروج کامل از زونا

www.SID.ir

Archive of SID



۵

نمودار ۳: مقایسه میزان تکوین جنینهای ۸ سلولی منجمد شده و گروه کنترل با استفاده از محیط کشت MEMα

جنینهای هر دو گروه در مرحله بلاستوسیست (هچینگ و هچ) بودند.میزان دژنراسیون جنینها در گروه آزمون ۲ بیش از گروه کنترل ۲ بود که این تفاوت معنی‌دار است ($P< 0.05$). پس از ۷۲ ساعت کشت‌نیز بیشترین درصد جنینهای هر دو گروه در مرحله بلاستوسیست (هچینگ و هچ) بودند (۷۹درصد در گروه آزمون ۲ و ۷۸درصد در گروه کنترل ۲). میزان دژنراسیون جنینهای گروه آزمون ۲ بیش از گروه کنترل ۲ بود. با گذشت ۹۶ ساعت از زمان کشت، بیشترین درصد جنینهای هر دو گروه در مرحله بلاستوسیست (هچینگ و هچ) بودند. میزان دژنراسیون جنینهای گروه آزمون ۲ بیش از گروه کنترل ۲ بود که البته این تفاوت معنی‌دار نبود. پس از ۱۲۰ ساعت از زمان کشت، بیشترین درصد جنینهای هر دو گروه در مرحله بلاستوسیست (هچینگ و هچ) بودند (۸۶درصد در گروه آزمون ۲ و ۸۷درصد در گروه کنترل ۲)، میزان دژنراسیون جنینها در گروه آزمون ۲ بیش از گروه کنترل ۲ بود اما این اختلاف معنی‌دار نیست.

مقایسه میزان تکوین جنینهای منجمد شده در محیط کشت MEMα (آزمون ۱) و هم‌کشتی MEMα+Vero (آزمون ۲) نتایج حاصل در نمودار ۳ آمده است.

در گروه آزمون ۱، تعداد ۱۱۳ جنین ۸ سلولی منجمد شده و سپس در محیط MEMα کشت داده شدند. در گروه آزمون ۲، تعداد ۸۴ جنین ۸ سلولی منجمد شده در محیط هم‌کشتی MEMα+Vero کشت داده شدند. برای بررسی تأثیر هم‌کشتی، مقایسه‌ای بین سرعت تکوین جنینهای هر دو گروه انجام شد. با گذشت ۲۴ ساعت از زمان کشت، بیشترین درصد جنینهای گروه آزمون ۱ در مرحله بلاستوسیست (اولیه و ثانویه) بوده (۵۹درصد) که میزان این مرحله تکوینی در گروه آزمون ۲، ۴۹ درصد بود. در حالی که بیشترین درصد جنینها در گروه آزمون ۲ در مرحله مورولا بودند (۵۱درصد) که این میزان در گروه آزمون ۱، ۳۶درصد بود که این اختلاف معنی‌دار بود ($P< 0.05$). میزان دژنراسیون جنینهای گروه آزمون ۱ بیش از گروه آزمون ۲ بود که این اختلاف معنی‌دار بود ($P< 0.05$). پس از ۴۸ ساعت، بیشترین درصد جنینهای هر دو گروه در مرحله بلاستوسیست (هچینگ و هچ) بودند(۵۹درصد در گروه آزمون ۱ و ۵۵درصد در گروه آزمون ۲) که این تفاوت معنی‌دار نیست. میزان دژنراسیون در گروه آزمون ۲ بیش از گروه آزمون ۱ بود که البته این تفاوت ظاهری بوده و معنی‌دار نیست.

با گذشت ۷۲ ساعت، بیشترین درصد جنینهای هر دو گروه در مرحله بلاستوسیست (هچینگ و هچ) بودند. میزان دژنراسیون گروه آزمون ۲ بیش از گروه آزمون ۱ بود که البته این تفاوت معنی‌دار نیست.

www.SID.ir

Archive of SID

پس از ۹۶ ساعت کشت نیز بیشترین درصد جنینهای هر دو گروه در مرحله بلاستوسیست (هچینگ و هچ) بودند. میزان دژنراسیون جنینهای گروه آزمون ۲ بیش از آزمون ۱ بود که این تفاوت نیز معنی‌دار نیست.

با گذشت ۱۲۰ ساعت از زمان کشت نیز بیشترین درصد جنینهای هر دو گروه در مرحله بلاستوسیست (هچینگ و هچ) بودند. میزان دژنراسیون جنینهای گروه آزمون ۲ بیش از گروه آزمون ۱ بود ولی اختلاف ظاهری بوده و معنی‌دار نیست.

بحث

در این مطالعه تأثیر محیط کشت MEMα و کارایی هم‌کشتی با سلولهای Vero بر تکوین جنینهای ۸ سلولی حاصل از انجماد بررسی شد. طبق نتایج حاصل از این پژوهش میزان کارایی محیط کشت MEMα در زمینه تکوین بسیار بالا بود اما هم‌کشتی با سلولهای Vero در محیط MEMα تأثیری در افزایش میزان بهبود تکوین جنینها نداشت. اما Lai و همکارانش (۱۰) نشان دادند که هم‌کشتی با سلولهای Vero تکامل جنین موش را بهبود می‌بخشد. همچنین Schillachi و همکارانش (۱۱) و Menezo و همکارانش (۱۲) افزایشی را در میزان تکامل و لانه‌گزینی جنین انسان پس از هم‌کشتی با سلولهای Vero مشاهده کردند. تفاوت معنی‌دار مرحله خروج از زونا در بین جنینهای منجمد شده و جنینهای منجمد نشده در محیط MEMα، بیانگر آن است که علیرغم آنکه محیط MEMα در ساعات پایانی کشت توانسته بر فشارها و استرسهای ناشی از انجماد فائق آید، اما با توجه به درصد بالای جنینهای مرحله خروج از زونا در تمام ساعات کشت می‌توان دریافت که محیط MEMα برای کشت جنینهای مرحله ۸ سلولی حاصل از انجماد مناسب بوده و اثرات مخرب ناشی از انجماد را رفع می‌کند. جنینها طی انجماد از فشارهای اسمزی، سمیت ضدیخها و تورم ناشی از ذوب متأثر می‌شوند (۱۳). البته مرحله جنینی و سازماندهی اسکلت سلولی در هر یک از بلاستومرها در میزان موفقیت انجماد مؤثر است. در زمینه انجماد همانگونه که Bautista و همکارانش (۱۴) اظهار داشتند پس از آبدهی، ضدیخ بطور کامل نمی‌تواند از سلولهای جنین خارج شود و مدت زمانی لازم است تا خروج کامل اتفاق بیفتد و با توجه به اینکه ضدیخی همچون اتیلن گلیکول علیرغم سمیت کم تا حدودی برای سلولهای جنینی سمی است، خروج تدریجی باقیمانده آن از سلول تعادل محیط کشت را برهم می‌زند. علاوه بر این ثابت شده است که انجماد توانایی جنینهای دوسلولی هامستر را برای تنظیم PH داخل سلولی کاهش داده و در نتیجه پس از ذوب، PH به سرعت افزایش می‌یابد (۱۵). لازم به ذکر است که این تغییرات در ساعات اولیه پس از انجماد ایجاد می‌شود. اخیراً نشان داده شده است که توانایی تکوین جنینهای مرحله تسهیم (برای حمایت از شایستگی تکوینی) در کشت، وابسته به توانایی تنظیم PH داخل سلولی است (۱۶). PH درون سلولی دارای نقش کلیدی در تنظیم بسیاری از فرآیندهای سلولی همچون متابولیسم، تولید انرژی و تقسیم سلولی (۱۷) و نیز توانایی تنظیم هومئوستازی درون سلولی است و برای تکوین طبیعی سلولی ضروری به‌نظر می‌رسد. بنابراین کاهش میزان توانایی تکوین جنینها در ساعات اولیه پس از انجماد، تا حدودی ناشی از کاهش توانایی تنظیم PH درون سلولی است و نتیجه آن اختلال در متابولیسم و نقص در تولید انرژی می‌باشد (۱۵). معنی‌داری اختلاف میزان درصد جنینهای مرحله مورولا بین گروههای انجمادی و غیرانجمادی و نیز معنی‌دار بودن اختلاف بین جنینهای مرحله بلاستوسیست (اولیه و ثانویه) در هر دو گروه (نمودار ۲) نشانگر آن است که جنینهای منجمد شده در ساعات اولیه کشت دچار تأخیر در رشد شوند، زیرا همانگونه که ذکر شد انجماد توسط مکانیسمهای مختلف باعث کندی میزان تکوین جنینی می‌شود. البته در این زمینه استثناءهایی نیز وجود دارد.

به عنوان مثال در نمودار ۳، میزان مورولا در ۲۴ ساعت اول کشت در جنینهای منجمد شده در محیطهای هم‌کشتی نسبت به محیط کشت ساده از درصد بالاتری برخوردار بوده و این اختلاف معنی‌دار است ($P<0.05$). انتظار می‌رود هم‌کشتی با سلولهای Vero با توجه ترشح موادی جلوگیری کننده از تأخیر رشد، سودمند باشد. اما احتمالاً به دلیل ایجاد تغییرات فراساختاری بدنبال انجماد، استفاده از سلولهای Vero در ساعات اولیه کشت برای از بین بردن کندی رشد جنینها مؤثر نبوده و نتوانسته باعث تحریک رشد جنینها شود، اما علیرغم عدم تأثیر در تسریع رشد جنینها، از دژنره شدن آنها در محیط هم‌کشتی جلوگیری می‌کند. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که انتخاب مرحلهٔ تکاملی جنینی مناسب در میزان موفقیت انجماد نقش بسزایی داشته، به‌گونه‌ای که مرحله جنینی ۸ سلولی برای انجماد بسیار مناسب است. علاوه بر آن استفاده از محیط MEMα در کشت جنینهای ۸ سلولی موش پس از انجماد شیشه‌ای باعث بهبود میزان تکوین جنینها شده و برای کشت بسیار مناسب است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که سلولهای Vero در محیط MEMα تأثیری در افزایش بهبود میزان تکوین جنینهای ۸ سلولی حاصل از انجماد نداشته و نقشی در افزایش کارایی محیط MEMα ندارند.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این طرح برمبنای قرارداد شماره ۲۹۷/ب/۷۹ مورخ ۷۹/۵/۵ از بودجه تحقیقاتی پژوهشکده رویان تأمین گردیده است.

References

1. Leibo SP: Field trial one-step frozen bovine embryos transfered non-surgically. Theriogenology, 1983; 19:139

2. Renard JP, Buixuan NN, Garnier V: Two step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. J Rep Fertil 1984; 71: 537-580

3. Whittingham DG: Survival of mouse embryos after

www.SID.ir

Archive of SID

freezing and thawing. Nature 1971; 233: 125-126
4. Massip A, Van Der Zwalmen P, Scheffen B, Ectors F: Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. Cryo-Letters, 1986; 7: 270-273
5. Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T, Kasai M: Successful vitrification of bovine blastocysts derived by in vitro maturation and fertilization. Mol Reprod Dev 1993. 34:266-271
6. Smorage Z, Gajda B, Wieczorek B, Jura: Stage-depenednt viability of vitrified embryos. Theriogenology, 1989; 31; 1227-1231
7. Bongso A, Soon-Chye Ng, Fong CY, Ratnam SS: Co-culture: A new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Fertil Steril 1991a; 56: 179-191
8. Paria BC, Dey SK: Preimplantation embryo development in vitro cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc Natl Acad Sci USA, 1990: 87, 4756-4790
9. Kasai M: Principles of the cryopreservation of mammalian embryos by vitrification.Reproductive Biology Update.Assessment of environment toxicity. Myamoto M. and Marabe N. Eds. Shoukadou Bookseller company Okgoto Japan, 1998; 415-424
10. Lai YM: Evaluation of Vero cell co-culture system for mouse embryos in various media. Hum Rep, 1992; 7:276-280
11. Schillachi R, Ciriminna R, Ceflu E: Vero celleffect on in vitro human blastocyst development: Preliminary results Hum Reprod 1994; 9(6): 1131-1135
12. Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B: Co-culture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in human. Hum Rep. (suppl.1): 1992; 101-106
13. Takagi M, Otoi T, Suzuki T: Survival rate of frozen-thawed bovine IVM/IVF embryos in relation to post-thaw exposure time in two cryoprotctants.Cryobiology, 1993; 30:466-469
14. Bautista JAN, Takahashi Y, Kanagawa H: Invitro viability of mouse zygotes vitrified in ethylene glycol. JPN J Vet Res, 1998; 45(4): 193-198
15. Lane M, Lyons EA, Bavister BD: Cryopreservation reduces the ability of hamster 2-cell embryos to regulate intracellular PH. Hum Rep, 2000; 15(2): 389-394
16. Lane M, Baltz JM, Bavister BD: Bicarbonate/ chloride exchange regulates intracellular PH of embryos but not oocytes of the hamster. Biol Rep, 1999a; 61:452-457
17. Regula CS, Pfeiffer JR, Berlin RD: Microtubule assembly and disassembly at alkaline PH. J Cell Biol, 1981; 89:45-53

www.SID.ir