بررسی روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای بر بقاء و تکوین جنینهای دوسلولی موش

مینا رمضانی M.Sc.[☆♣]، مجتبی رضازاده ولوجردی Ph.D.[☆★]، کاظم پریور Ph.D.[☆]

☆دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی

★ پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

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

پست الکترونیک: info@royaninstitute.org

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۱۲/۱۸، پذیرش مقاله: ۸۳/۵/۱۴

* **هدف:** مقایسه اثرات سه روش مختلف انجماد شیشه‌ای [closed pulled straw (CPS), Open pulled straw (OPS), Conventional (C)] بر بقاء مورفولوژیکی جنینهای دو سلولی موش و تکوین آنها به بلاستوسیستهای Hatched

* **مواد و روشها:** جنینهای دو سلولی موش به چهار گروه کنترل (۱۹۴) C، (۱۶۰) OPS، (۱۵۰) و CPS (۱۵۵) تقسیم شدند. جنینهای گروه کنترل در محیط HTF به مدت ۱۲۰-۹۶ ساعت کشت داده شدند. در گروههای انجمادی جنینها با اتیلن گلیکول ۵/۵ مولار و یک مول سوکروز با سه روش مختلف منجمد و پس از ذوب سریع در دمای اطاق، جنینها درمحلولهای سوکروز (۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ مولار) به صورت مرحله به مرحله آبدهی شدند و پس از سه بار شستشو در محیط HTF کشت داده شدند. پس از ذوب، جنینهای زنده در هر روش تعیین شد. توانایی جنینهای زنده برای ادامه تکوین براساس کشت In vitro آنها مشخص و با گروه کنترل مقایسه شد. در تمامی موارد از آزمون آماری χ^2 استفاده شد.

* **یافته‌ها:** میزان بقاء جنینها پس از ذوب به طور معنی‌داری در CPS ۷۶درصد بیشتر از OPS (P<۰/۰۱، ۶۲درصد) و C (P<۰/۰۵، ۶۶درصد) است.

میزان بلاستوسیستهای hatched در C (۵۸درصد)، OPS (۵۵درصد) و CPS (۶۴درصد) اختلاف معنی‌داری نداشت. اما به طور معنی‌دار کمتر از کنترل (۷۲درصد) در گروههای C (P<۰/۰۵) و OPS (P<۰/۰۱) بود.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه حاکی از آن است که روش CPS احتمالا راه مفیدتری برای انجماد جنینهای دو سلولی موش است.

گل واژگان: انجماد شیشه‌ای، نی کشیده شده باز (OPS)، نی کشیده شده بسته (CPS)

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۷۴-۶۹

مقدمه

از زمان ابداع روش انجماد شیشه‌ای (vitrification) در زمینه تولید مثل توسط Rall و Fahy حدود دو دهه می‌گذرد (۱). اساس انجماد شیشه‌ای بر عدم تشکیل کریستال یخ به علت استفاده از غلظتهای بالای محافظین انجمادی و سرعت بالای سرد و گرم شدن، استوار است. در این روش مایعات داخل جنین به هنگام سرد شدن بدون تشکیل کریستال یخ ، به جامد شیشه‌ای تبدیل می‌شوند.

از زمان ارائه روش فوق محققین سعی نموده‌اند با به‌کارگیری ضد یخهای با سمیت کمتر، تغییر غلظت ضد یخها و استفاده از ماکروملکول ها برای افزایش سرعت آبگیری، کارآیی انجماد شیشه‌ای را افزایش دهند (۲، ۳، ۴، ۵). در این رابطه Ali و Shelton پس از بررسی ترکیبات مختلف، ترکیب VS_{14} (اتیلن گلیکول ۵/۵ مولار و سوکروز ۱ مولار) را به عنوان مناسبترین ترکیب برای انجماد شیشه ای تمام مراحل جنینی موش به جز یک سلولی ارائه کردند VS_{14}. حتی پس از ۳۰ دقیقه در معرض قرار گیری برای جنینهای موش سمی نبود (۵). همچنین عده ای از محققین در پی نظریه اثرات مفید افزایش سرعت تغییرحرارت ، انجماد شیشه ای با روشهای فوق سریع (ultrarapid) را مطرح کردند.

اولین گزارش از روش انجماد شیشه ای فوق سریع، توسط Leibo و همکارانش ارائه شد (۶). آنها سیستم انجماد شیشه ای با استفاده از گرید های میکروسکوپ الکترونی را توصیف کردند .این سیستم باعث افزایش انتقال گرما به هنگام انجماد در نیتروژن مایع می‌شود. Martino روش اخیر را در تخمکهای گاو به کار برد و با قرار دادن مستقیم تخمکها بر روی گرید های میکروسکوپ الکترونی، سرعت تغییر حرارت را افزایش داد. وی نشان داد که میزان آسیب سرمایی (chilling damage) در تخمکهای گاو کاهش یافته و درصد بالاتری بلاستوسیست زنده نسبت به نی معمولی به دست

Archive of SID

www.SID.ir

می‌آید (۷). دو سال بعد Vajta و همکارانش روش OPS(Open pulled straw) را مطرح کردند و گزارش نمودند که پتانسیل باروری تخمکهای منجمد شده با این روش در مقایسه با نی معمولی افزایش می‌یابد (۸). Vajta نی‌های معمولی فریز (نی فرانسوی) را بر روی شعله گرفت تا گرم شود، سپس آنها را کشید به طوری که طول آنها دو برابر و قطر آنها نصف شد. در نی ops به دلیل قطر کاهش یافته و همچنین طریقه پر کردن نی، حجم کمی از محلول انجمادی نسبت به نی معمولی استفاده می‌شود. بنابراین، به دلیل حجم کم محیط انجمادی و ارتباط مستقیم محیط دارای جنین با نیتروژن مایع، سرعت تغییر حرارت افزایش می‌یابد. البته از معایب آن ارتباط مستقیم جنین با نیتروژن مایع و احتمال آلودگی است. اخیراً روشی به نام CPS(Closed Pulled Straw) توسط Chen ارائه شده است که علاوه بر اینکه مزایای OPS را در سرعت گرم و سرد شدن‌دارد، مزایای نی معمولی را نیز به عنوان یک روش غیرتماسی دارد (۹). وی از نی‌های OPS استفاده نمود و طوری آن را پر کرد که دو طرف محلول انجمادی حاوی جنین توسط حباب هوا و سپس محلول انجمادی بسته شود. بدین طریق یک سیستم بسته ایجاد کرد. Chen روش CPS را برای انجماد شیشه‌ای تخمکهای موش، با روشهای نی معمولی OPS و گرید مقایسه و گزارش نمود که میزان بقاء در روش CPS و نی معمولی به طور معنی‌داری بیشتر از روش OPS و گرید است (۱۰). یافتن منافع ومعایب نی های معمولی OPS و CPSو ارائه بهترین روش انجماد شیشه‌ای که درآن جنینها پس از انجماد قدرت تکوین و حیات خود را به میزان زیادی حفظ کنند، هنوز به مطالعه بیشتری نیاز دارد. بنابراین در پژوهش حاضر سعی شده است که برای اولین بار اثر سه روش مختلف انجماد شیشه‌ای (C, OPS و CPS) بر میزان بقاء جنینهای دو سلولی موش و سپس تکوین آنها به بلاستوسیست بررسی شود.

مواد و روشها

تحریک تخمک گذاری و تهیه جنین

در این تحقیق از موشهای سوری ۱۰-۵ هفته‌ای نژادNMRI (مؤسسه پاستور) استفاده شد. موشها در دمای ۳±۲۴ ، رطوبت ۵۰-۴۰ درصد و روشنایی از ساعت ۱۶ الی ۲۰ نگهداری شدند. به موشها به میزان ۷/۵ واحد PMSG (Intervet)[1] به صورت درون صفاقی تزریق کرده و پس از ۴۶ تا ۴۸ ساعت به همان میزان HCG(Organon)[2] تزریق شد. پس از انجام جفت‌گیری با موش نر از همان نژاد، صبح روز بعد موشهای دارای پلاک واژنی جدا شده و ۴۶ تا ۴۸ ساعت پس از دومین تزریق، موشها به طریق قطع نخاع کشته شده و جنینهای دو سلولی توسط flushing از اویداکت آنها خارج، و به محیط کشت HTF حاوی ۴mg/ml سرم آلبومین گاوی (Sigma) منتقل شدند. جنینهای دو سلولی به طور تصادفی به ۴ گروه کنترل و انجماد شیشه‌ای به طریقه CPS، C و OPS تقسیم شدند. تمامی آزمایشات ۱۲ بار تکرار شد.

آماده سازی محلولهای انجماد و ذوب

برای تهیه محلولهای مورد نیاز انجماد و ذوب از Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) حاوی ۲۰درصد Human Serum Albumin (HSA, Biotest) استفاده شد. در همه روشهای انجمادی، جنینها ابتدا با دو غلظت ۱/۵ مولار (۵ دقیقه) و۵/۵ مولار اتیلن گلیکول (یک دقیقه) (Sigma) به تعادل رسیدند. محلولهای انجمادی از اتیلن‌گلیکول ۵/۵ مولار و ۱ مول سوکروز تهیه شد. محلولهای ذوب نیز به ترتیب شامل سوکروز ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۰/۱۲۵ مولار بود که جنینها به مدت ۲/۵ دقیقه در هر کدام قرار گرفتند. مدت زمان انجماد حداقل ۲۴ ساعت و حداکثر ۵ روز بود.

انجماد وذوب به طریقه معمولی

برای انجماد، از نی‌های انجماد فرانسوی ۰/۲۵ میلی‌لیتری متصل به یک سرنگ ۱ میلی‌لیتری استفاده شد. با استفاده از سرنگ ابتدا ۱ سانتی‌متر محیط انجمادی وارد کرده، سپس ۰/۵ سانتی‌متر هوا، ۲ سانتیمتر محیط انجمادی حاوی ۱۲-۱۰ جنین، ۰/۵ سانتیمتر هوا و ۳/۵ سانتیمتر محیط انجمادی کشیده و انتهای نی را توسط خمیر هماتوکریت بسته (شکل 1a) و وارد تانک نیتروژن مایع شد. به منظور ذوب، ابتدا نی از تانک خارج شد و به مدت ۵ ثانیه در هوای اطاق و سپس در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه قرار گرفت. پس از آن جنینها در غلظتهای مختلف سوکروز به منظور ذوب قرار گرفته و در محیط کشت انکوبه شدند. جنینهای انکوبه شده به مدت ۱۲۰ ساعت مطالعه شدند (۱۰).

انجماد و ذوب به طریقهٔ OPS

نی‌های انجمادی با حرارت نرم و سپس کشیده می‌شدند تا طول آنها دو برابر و قطر آنها نصف شود. پس از آبگیری جنینها، حدود ۵ تا ۶ جنین را داخل یک قطره ۲ میکرولیتری از محیط انجمادی گذارده و با استفاده از خاصیت موئینگی به داخل نی کشیده شده (شکل1b) و به سرعت وارد تانک نیتروژن شد. برای ذوب، نوک نی داخل ۴۰۰ میکرو لیتر محلول سوکروز ۰/۵ مولار قرار گرفت تا جنینها خارج شوند. جنینها پس از ذوب و انکوباسیون به مدت۱۲۰ ساعت مطالعه شدند (۱۰).

1. Pregnant Mares Serum Gonadotropin
2. Human Chorionic Gonadotropin

Archive of SID
www.SID.ir

انجماد و ذوب به طریقهٔ CPS

در این روش، نی OPS به ترتیب با ۲ میلی‌متر محیط انجمادی، ۲ میلی‌متر هوا، ۲ میلی‌متر محیط انجمادی حاوی جنین، ۲ میلی‌متر هوا و ۲ میلی‌متر محیط انجمادی پر شده (شکل 1c) و به سرعت وارد تانک نیتروژن مایع شد. برای ذوب، انتهای نی توسط انگشت نشانه بسته شده و محتوی نی در ۴۰۰ میکرو لیتر محلول سوکروز ۰/۵ مولار قرارگرفت، سپس مراحل ذوب و انکوباسیون انجام شد و جنینها به مدت ۱۲۰ ساعت مطالعه شدند (۱۰).

مطالعه جنینها

در گروه کنترل، بلافاصله پس از به دست آوردن جنینهای دو سلولی، جنینهای با ظاهر طبیعی را در محیط کشت HTF در داخل انکوباتور با ۵ درصد CO_2 کشت داده و هر ۲۴ ساعت از مراحل تکوین جنینها و تعدادجنینهای دژنره گزارش تهیه شد.

در گروههای انجمادی، پس از انجماد و ذوب جنینها، آنها را چندین بار در محیط کشت شستشو داده، سپس توسط میکروسکوپ معکوس جنینهای زنده مشخص و کشت شد. هر ۲۴ ساعت از مراحل تکوین آنها گزارش تهیه شد.

جنینهای دارای غشاء پلاسمایی، لایه زونا و بلاستومرهای سالم با سیتوپلاسم انکساری، زنده تلقی شدند.

در تمام موارد از تست χ^2 به عنوان آزمون آماری استفاده شد و سطح معنی‌دار بودن P<۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

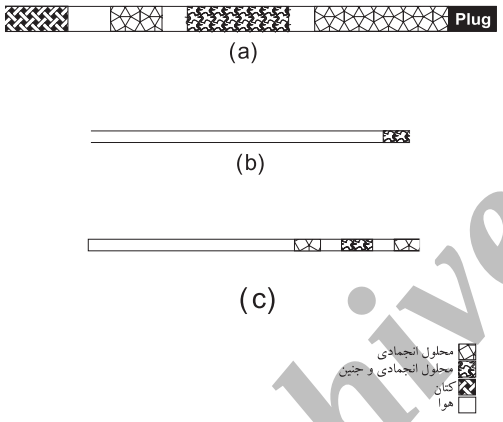
اثر انجماد بر میزان بقا جنینها

در این مطالعه تعداد ۱۹۴ جنین دو سلولی در گروه کنترل و ۴۶۵ جنین دو سلولی با روشهای مختلف منجمد شدند، C (۱۶۰)، OPS (۱۵۰) و CPS (۱۵۵). نتایج نشان داد که در گروه CPS درصد بقا جنینها پس از ذوب (۷۶ درصد) به طور معنی‌داری بیشتر از C (۶۶درصد)، (P<۰/۰۵) و OPS (۶۲درصد)، (P<۰/۰۱) بود. گروه انجمادی C و OPS اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (نمودار ۱).

اثر انجماد بر میزان تکوین جنینها

* ۲۴ ساعت اول کشت

میزان کلیواژ به مرحله ۸-۴ سلولی در گروه کنترل با گروههای OPS, C و CPS تقریبا یکسان بود. اما میزان تکوین به مورولا در گروههای مختلف انجمادی به طور معنی‌داری پایین‌تر از کنترل بود، به ترتیب (۰درصد، ۰درصد، ۰درصد در مقابل ۵درصد) تعداد جنینهای دژنره نیز در گروههای انجمادی C (۲۲درصد) و OPS (۲۳درصد) به طور معنی‌داری بیشتر ازکنترل (۱۱درصد) بود، به ترتیب (p<۰/۰۵) و (p<۰/۰۱). گروهCPS اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت.



شکل ۱: a: طریقهٔ پر کردن نی انجماد به روش معمولی، b: طریقهٔ پر کردن نی انجماد به روش OPS (نی گشیدهٔ باز)، c: طریقهٔ پر کردن نی انجماد به روش CPS (نی کشیدهٔ بسته).

جدول ۱: مقایسه تکوین جنینهای دو سلولی پس از به کار گیری روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای (C، OPS، CPS) و ۱۲۰ ساعت کشت

تیمار	تعداد	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۹۶ تا ۱۲۰ ساعت			۹۶ تا ۱۲۰ ساعت
		۴ تا ۸ سلولی	مورولا	مورولا و بلاستوسیست اولیه	بلاستوسیست انتهایی	بلاستوسیست انتهایی	بلاستوسیست وسیع شده	بلاستوسیست در حال خروج از زونا	بلاستوسیست خارج شده از زونا
کنترل	۱۹۴ (٪)	۱۶۳ (۸۴)	۹ (۵)	۱۵۰ (۷۷)	۱۵ (۸)	۱۳ (۷)	۹۷ (۵۰)	۴۴ (۲۳)	۱۴۰ (۷۲)
C	۱۰۵ (٪)	۸۲ (۷۸)	۰ (۰) a	۷۴ (۷۰)	۱ (۱) a	۲۷ (۲۶) b	۳۴ (۳۲) b	۱۲ (۱۱) a	۶۱ (۵۸) a
OPS	۹۶ (٪)	۷۴ (۷۷)	۰ (۰) a	۶۲ (۶۵) a	۱ (۱) a	۱۵ (۱۶) a	۳۵ (۳۶/۵) a	۱۱ (۱۱) a	۵۳ (۵۵) b
CPS	۱۱۴ (٪)	۹۵ (۸۳)	۰ (۰) a	۸۰ (۷۰)	۳ (۳)	۱۷ (۱۵) c	۴۳ (۳۸) a	۱۷ (۱۵)	۷۳ (۶۴)

C: انجماد با روش معمولی، OPS: انجماد با روش نی کشیده باز، CPS: انجماد با روش نی کشیده بسته، a: مقایسه C، OPS، CPS با کنترل؛ P<۰/۰۵، b: مقایسه C، OPS، CPS با کنترل: P<۰/۰۱، c: مقایسه CPS با C: P<۰/۰۵.

Archive of SID
www.SID.ir

* پس از ۴۸ ساعت کشت

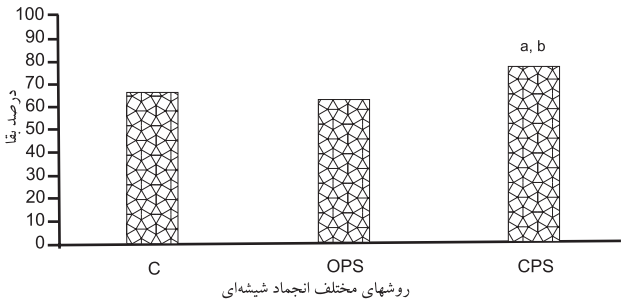
درصد جنینهای مرحله مورولا و بلاستوسیست اولیه، تنها درگروه OPS (۶۵درصد) به طور معنی داری کمتر از کنترل بود (P<۰/۰۵). درصد جنینهایی که به مرحله بلاستوسیست انتهایی رسیده بودند در گروههای C (۱درصد) و OPS (۱درصد) به طور معنی‌داری کمتر از کنترل (۸درصد) بود (P<۰/۰۵). در گروهCPS اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد. تعداد جنینهای دژنره در گروهOPS (۱۱/۵درصد) و CPS (۱۰/۵درصد) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل (۵ درصد) بود.

* پس از ۷۲ ساعت کشت

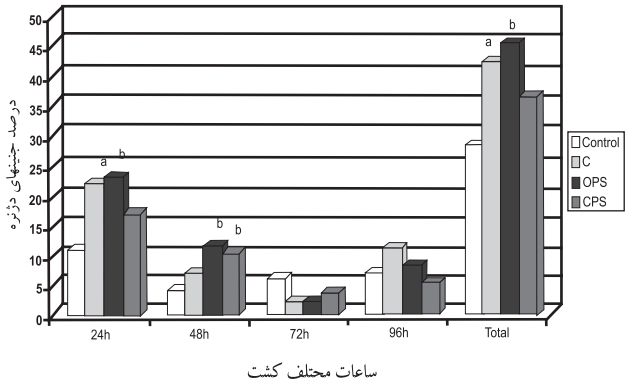
درصد جنینهای مرحله بلاستوسیست انتهایی در گروههای انجمادی C (۲۶درصد)، OPS (۱۶درصد) و CPS (۱۵درصد) به طور معنی‌داری بیشتر از کنترل (۷درصد) بود، به ترتیب (P<۰/۰۱)، (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۵) که نشان دهنده تاخیر در رشد جنینهای منجمد شده بود.

مقایسه گروههای انجمادی با یکدیگر نشان داد، درصد بلاستوسیستهای انتهایی در گروه CPS به طور معنی‌داری کمتر از C بود (۱۵درصد در برابر ۲۶درصد، P<۰/۰۵). بلاستوسیستهای وسیع شده در گروههای انجمادی C (۳۲درصد)، OPS (۳۶/۵درصد) و CPS (۳۸درصد) به طور معنی‌داری از کنترل (۵۰درصد) کمتر بود، به ترتیب (P<۰/۰۱)، (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۵). تعداد بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا (Hatching) درگروههایC و OPS به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود (۱۱درصد و ۱۱درصد در برابر ۲۳درصد، P<۰/۰۵)، اما گروه CPS (۱۵درصد) اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت.

تعداد جنینهای دژنره در هیچ کدام از گروههای انجمادی اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت.



نمودار ۱: مقایسهٔ درصد بقاء جنینهای دو سلولی موش پس از به کار گیری روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای (C، OPS، CPS). C: انجماد شیشه‌ای با روش معمولی، OPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ باز، CPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ بسته. a: مقایسهٔ CPS و C؛ P<۰/۰۵. b: مقایسهٔ CPS، OPS؛ P<۰/۰۱



نمودار ۲: مقایسهٔ روزانهٔ درصد جنینهای دژنرهٔ موش پس از به کار گیری روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای (C، OPS، CPS). C: انجماد شیشه‌ای با روش معمولی، OPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ باز، CPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ بسته. a: مقایسهٔ C، OPS، CPS با کنترل؛ P<۰/۰۵. b: مقایسهٔ C، OPS، CPS، OPS با کنترل P<۰/۰۱.

* پس از ۹۶ تا ۱۲۰ ساعت کشت

تعداد بلاستوسیستهای خارج شده از زونا در گروههای C (۵۸درصد) و OPS (۵۵درصد) به طورمعنی‌داری از گروه کنترل (۷۲درصد) کمتر بود، به ترتیب (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۱). اما گروه CPS (۶۴درصد) اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت. تعداد جنینهای دژنره نیز در هیچ کدام از روشهای انجمادی اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشت. پس از ۱۲۰ ساعت کشت تعداد کل جنینهای دژنره در گروه C (۴۲درصد)، OPS (۴۵درصد) بیشتر از کنترل (۲۸درصد) بود، به ترتیب (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۱) اما گروهCPS (۳۶درصد) اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت (جدول ۱، نمودار ۲).

بحث

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که درصد بقاء جنینهای دوسلولی پس از فرآیند انجماد شیشه‌ای در روش CPS بیشتر از نی معمولی و OPS است.

نتایج این پژوهش با یافته‌های Chen مطابق است. Chen اثر روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای را بربقاء تخمکهای موش بررسی و گزارش کرد که شانس بقاء تخمکهای موش در روش CPS (۷۹درصد) و نی معمولی (۷۷درصد) بیشتر ازروش OPS (۶۷درصد) و استفاده از گریدهای میکروسکوپ الکترونی (۳۴درصد) است (۱۰).

Lopez جنینهای مرحله مورولا و مراحل مختلف بلاستوسیست خرگوش را با استفاده از روشی مشابه CPS با مخلوطی از ۲۵درصد گلیسرول و۲۵درصد اتیلن گلیکول منجمد کرد. نتایج، میزان بالاتر بقاء را در روش CPS (۸۸/۲درصد) نسبت به نی معمولی(۷۸/۸درصد) نشان داد که شبیه نتایج ما است. همچنین بلاستوسیستهای خرگوش که با روشCPS منجمد شدند میزان مشابهی از تکوین *In vivo* را پس

Archive of SID

www.SID.ir

* پس از ۴۸ ساعت کشت

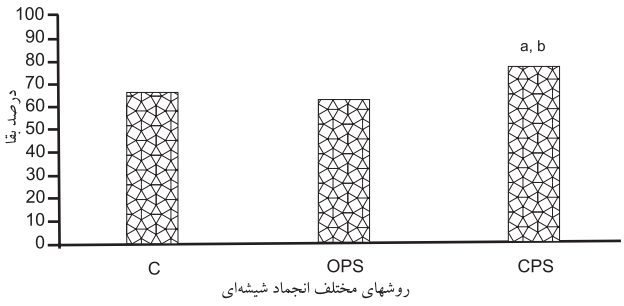
درصد جنینهای مرحله مورولا و بلاستوسیست اولیه، تنها درگروه OPS (۶۵درصد) به طور معنی داری کمتر از کنترل بود (P<۰/۰۵). درصد جنینهایی که به مرحله بلاستوسیست انتهایی رسیده بودند در گروههای C (۱درصد) و OPS (۱درصد) به طور معنی‌داری کمتر از کنترل (۸درصد) بود (P<۰/۰۵). در گروهCPS اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد. تعداد جنینهای دژنره در گروهOPS (۱۱/۵درصد) و CPS (۱۰/۵درصد) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل (۵ درصد) بود.

* پس از ۷۲ ساعت کشت

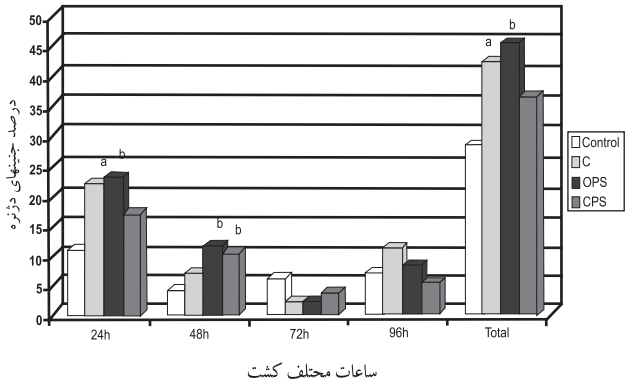
درصد جنینهای مرحله بلاستوسیست انتهایی در گروههای انجمادی C (۲۶درصد)، OPS (۱۶درصد) و CPS (۱۵درصد) به طور معنی‌داری بیشتر از کنترل (۷درصد) بود، به ترتیب (P<۰/۰۱)، (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۵) که نشان دهنده تاخیر در رشد جنینهای منجمد شده بود.

مقایسه گروههای انجمادی با یکدیگر نشان داد، درصد بلاستوسیستهای انتهایی در گروه CPS به طور معنی‌داری کمتر از C بود (۱۵درصد در برابر ۲۶درصد، P<۰/۰۵). بلاستوسیستهای وسیع شده در گروههای انجمادی C (۳۲درصد)، OPS (۳۶/۵درصد) و CPS (۳۸درصد) به طور معنی‌داری از کنترل (۵۰درصد) کمتر بود، به ترتیب (P<۰/۰۱)، (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۵). تعداد بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا (Hatching) درگروههایC و OPS به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود (۱۱درصد و ۱۱درصد در برابر ۲۳درصد، P<۰/۰۵)، اما گروه CPS (۱۵درصد) اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت.

تعداد جنینهای دژنره در هیچ کدام از گروههای انجمادی اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت.



نمودار ۱: مقایسهٔ درصد بقاء جنینهای دو سلولی موش پس از به کار گیری روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای (C، OPS، CPS). C: انجماد شیشه‌ای با روش معمولی، OPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ باز، CPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ بسته. a: مقایسهٔ CPS و C؛ P<۰/۰۵. b: مقایسهٔ CPS، OPS؛ P<۰/۰۱



نمودار ۲: مقایسهٔ روزانهٔ درصد جنینهای دژنرهٔ موش پس از به کار گیری روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای (C، OPS، CPS). C: انجماد شیشه‌ای با روش معمولی، OPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ باز، CPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ بسته. a: مقایسهٔ C، OPS، CPS با کنترل؛ P<۰/۰۵. b: مقایسهٔ C، OPS، CPS، OPS با کنترل P<۰/۰۱.

* پس از ۹۶ تا ۱۲۰ ساعت کشت

تعداد بلاستوسیستهای خارج شده از زونا در گروههای C (۵۸درصد) و OPS (۵۵درصد) به طورمعنی‌داری از گروه کنترل (۷۲درصد) کمتر بود، به ترتیب (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۱). اما گروه CPS (۶۴درصد) اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت. تعداد جنینهای دژنره نیز در هیچ کدام از روشهای انجمادی اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشت. پس از ۱۲۰ ساعت کشت تعداد کل جنینهای دژنره در گروه C (۴۲درصد)، OPS (۴۵درصد) بیشتر از کنترل (۲۸درصد) بود، به ترتیب (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۱) اما گروهCPS (۳۶درصد) اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت (جدول ۱، نمودار ۲).

بحث

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که درصد بقاء جنینهای دوسلولی پس از فرآیند انجماد شیشه‌ای در روش CPS بیشتر از نی معمولی و OPS است.

نتایج این پژوهش با یافته‌های Chen مطابق است. Chen اثر روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای را بربقاء تخمکهای موش بررسی و گزارش کرد که شانس بقاء تخمکهای موش در روش CPS (۷۹درصد) و نی معمولی (۷۷درصد) بیشتر ازروش OPS (۶۷درصد) و استفاده از گریدهای میکروسکوپ الکترونی (۳۴درصد) است (۱۰).

Lopez جنینهای مرحله مورولا و مراحل مختلف بلاستوسیست خرگوش را با استفاده از روشی مشابه CPS با مخلوطی از ۲۵درصد گلیسرول و۲۵درصد اتیلن گلیکول منجمد کرد. نتایج، میزان بالاتر بقاء را در روش CPS (۸۸/۲درصد) نسبت به نی معمولی(۷۸/۸درصد) نشان داد که شبیه نتایج ما است. همچنین بلاستوسیستهای خرگوش که با روشCPS منجمد شدند میزان مشابهی از تکوین *In vivo* را پس

Archive of SID

www.SID.ir

از ذوب نسبت به جنینهای کنترل نشان دادند (۱۱).

Kong در مطالعه ای انجماد شیشه‌ای بلاستوسیستهای موش به روش OPS را با میکروپیپت شیشه ای مقایسه کرد و نشان داد که میزان بقاء در روش OPS (۹۳/۵درصد) و روش میکروپیپت شیشه‌ای (۹۵درصد) تفاوت معنی‌داری ندارد. میزان بلاستوسیست در حال خروج از زونا نیز به ترتیب۸۸/۷درصد و ۹۳/۵درصد بود که تفاوت معنی‌داری نداشت اما به طور معنی‌داری از کنترل کمتر بود (۱۲). درصد بالاتر بقاء گزارش شده در این مطالعه نسبت به مطالعه ما احتمالا به مرحله جنینی به کار رفته است. زیرا مطا لعات زیادی نشان داده که انجماد جنین در مرحله بلاستوسیست میزان بالاتری بقاء وتکوین را نسبت به انجماد جنین در مراحل دیگر ایجاد می کند (۱۱، ۱۳).

در این مطالعه، بررسی تکوین جنینها در محیط کشت پس از عمل انجماد و ذوب نشان می‌دهد که در روش CPS تعداد بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا و تعداد جنینهای دژنره پس از ۱۲۰ ساعت کشت اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل ندارد. اما در روشهای Ops و نی معمولی تعداد بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا به طور معنی داری کمتر از کنترل و تعداد جنینهای دژنره بیشتر از گروه کنترل است. همچنین بررسی جدول۱ نشان میدهد که سرعت تکوین جنینها کمتر از کنترل است اما در روش Cps در اغلب موارد اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل دیده نمی‌شود. علل نتایج فوق را می توان به مزیت نی‌های کشیده شده نسبت داد. اولا: این نی‌ها به علت قطر کم، میزان محلول انجمادی کمتری را جذب می کنند. ثانیا: دیواره‌های آن نسبت به نی‌های معمولی نازکتر است، بنابراین از سرعت سرد شدن (۲۰/۰۰۰°C/min) و گرم شدن (۱۸۰/۰۰۰°C/min) بیشتری نسبت به نی معمولی برخوردارند(۲۵۰۰ °C /min). از طرفی به دلیل سرعت بالای سرد وگرم شدن، عبور از منطقه آسیب حرارتی که بین ۱۵ تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد است، خیلی سریعتر صورت می‌گیرد. بنابراین میزان آسیب سرمایی که گزارش شده در جنینهای قبل از مورولا بسیار زیاد است، به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (۱۴، ۱۵). احتمالا درصد پایین‌تر بقاء وتکوین جنین در روش OPS نسبت به CPS به علت تماس مستقیم جنین با نیتروژن مایع باشد که یک اثر منفی بر جنین دارد.

از آنجا که آسیب به جنین طی انجماد علاوه بر نوع نی وروش پر کردن آن، بستگی به عوامل مختلفی از جمله نوع ضد یخ به کار رفته، غلظت ضدیخ، مدت زمان و دمای در معرض قرارگیری، دمای انجماد و روش آبدهی دارد (۱۶). در این مطالعه سعی شد، شرایط انجماد برای هر سه روش انجمادی یکسان باشد و فقط تغییرات نوع نی ونحوه پر کردن آن بررسی شود. علایمی از قبیل شکستگی در زونا و جنین پس از ذوب مشاهده نشد که موافق با گزارشاتی است که انجماد شیشه‌ای آسیب و شکستگی در زونا ایجاد نمی کند (۱۷).

در این مطالعه از اتیلین گلیکول به عنوان ضدیخ استفاده شده است. میزان درصد بقاء جنینها در این مطالعه در مقایسه با برخی مطالعاتی که در آنها از یک ضد یخ دیگرعلاوه بر اتیلن گلیکول استفاده شده (۲، ۱۸، ۱۹) یا ترکیبات دیگر ضد یخ به کار رفته (۴، ۶) پایین‌تر است، اما درصد تکوین جنینها تا مرحله بلاستوسیست بالاتر است. این مسأله احتمالا به خواص شیمیایی ضد یخ به کار رفته مربوط می شود. اتیلن گلیکول به علت وزن مولکولی پایین نفوذپذیری سریعی دارد، بنابراین به هنگام ذوب به سرعت ازسلولها خارج شده و عوارض کمتری بر تکوین جنین می گذارد. نتایج این پژوهش حاکی از آن است که در روش CPS درصد بقاء و تکوین جنینها به مرحله بلاستوسیست در حال خروج از زونا بیشتر از نی معمولی وOPS است، بنابراین به نظر می رسد روشCPS یک راه ساده، مناسب و ارزان برای انجمادجنین دوسلولی موش باشد. روش CPS می‌تواند به عنوان گزینه‌ای جدید برای انجماد جنین انسان نیز در نظر گرفته شود. البته لازم به ذکر است که برای استفاده از این روش در جنین انسان باید اثرات تخریبی و تغییرات ژنتیکی احتمالی به دقت مورد بررسی قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان و دانشگاه آزاد اسلامی به شمارۀ۱۱۸۶/p/۸۱ است و محل اجرای آن در بخش تحقیقات پژوهشکدۀ رویان بوده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدتهای صمیمانۀ مسئولین محترم پژوهشکدۀ رویان ابراز می‌دارند.

References

1. Rall WF, Fahy GM: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196°C by vitrification. Nature (London) 1984; 313: 573-575

2. Kasai M, Niwa K, Iritani A: Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. J Reprod Fert 1981; 63:175-180

3. Nowshahri MA, Brem GJ: Effects of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. Hum Reprod 2001; 15(11): 2368-2373

4. Nematollahi N, Rezazadeh Valogerdi M: Effect of Vero cell coculture on the development of frozen-thawed two-cell mouse embryos. J Assi Reprod Gen 1999; 16(7): 380-384

5. Ali J , Shelton JN: Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. J Reprod Fert 1993; 99: 471-477

6. Leibo SP, McGrath JJ, Cravalho RG: Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized

Archive of SID
www.SID.ir

mouse ova as a function of cooling rate. Cryobiology 1978; 15: 257-271
7. Martino A, Songsasen N, Leibo SP: Development in to blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. Biol Reprod 1996; 54: 1059-1069
8. Vajta G, Holm P, Kuwayame M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callensen H: Open pulled straw (OPS) vitrification;a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Dev 1998; 51: 53-58
9. Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, HO HN, Yang YS: Open pulled straw for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. Hum Reprod 2000; 15: 2598-2603
10. Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN ,Yang YS: Vitrification of oocytes using closed pulled straws(CPS) achives a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles,compared with conventional straws, open pulled straws(OPS) and grids. Hum Reprod 2001; 16: 2350-2356
11. Lopez BM,Lopez MF: Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. Theriogenology 2002;58(8):1541-1552
12.Kong IK,Lee SI,Cho SG,Cho SK,Park CS: Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. Theriogenology 2000; 53(9): 1817-1826
13. Lopatarova M, Cech S, Havlicek V, Holy L: Effect of vitrification in open pulled straws on survival of bovine embryos from superovulated cows. Acta Vet Brno 2002; 71: 93-99
14. Rall WF, Meyer TK: Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. Theriogenology 1989; 31: 683-692
15. Kasai M, Zhu SE, Pedre PB, Nakamura K, Sakuri T, Edashige K: Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. Cryobiol 1996; 33: 459-464
16. O'Neil L, Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW: Murine oocyte cytoskeletal changes, fertilization and embryonic development following exposure to a vitrification solution. Cryo-Lett 1997; 18: 17-26
17. Kasai M: Principles of the cryopreservation of mammalian embryos by vitrification. Reproductive Biology Update, Out Print 1998; 414-424
18. Rezazadeh Valojerdi M, Movahedin M, Hosseini A: Improvement of development of vitrified two-cell mouse embryos by vero cell coculture. J Assi Reprod Gen 2001;19: 31-38
19. Nowshari MA, Nayuda PI, Hodges JK: Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid thawed pronuclear stage mouse embryos. Theriogenology 1998; 50(7): 1001-1013

Archive of SID

www.SID.ir