Original Article

Investigating the Effect of Laser Assisted Hatching on the Development and Quality of Vitrified-Warmed 4-Cell Stage Mouse Embryos

R. Fathi, M.Sc.[1], M. Rezazadeh Valojerdi, Ph.D.[1,2]*, P. Eftekhari Yazdi, Ph.D.[2]

1. Anatomy Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University
2. Embryology Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR

** Corresponding Address: P.O.Box: 14155-111, Anatomy Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: Mr_valojerdi@yahoo.com

Abstract

Received: 12/Jan/2008, Accepted: 20/Apr/2008

Objective: The aim of this study was to investigate the effect of laser assisted hatching on the development and quality of vitrified-warmed 4-cell stage mouse embryos.

Materials and Methods: The vitrified-warmed 4-cell mouse embryos were divided into two groups: control group (without laser assisted hatching) and experiment group (with laser assisted hatching). All embryos in both groups were cultured in sequential media containing G1TMver3 and G2TMver3. Afterward, all expanded blastocysts were randomly selected and stained with differential (for cellularity) and TUNEL (for cell death) methods.

Results: On day 1(24hrs) of culture, the difference between the control and the experimental groups was insignificant in the rate of blastocyst formation. But on day 2(48hrs) of culture, 87.61% of embryos in the experimental group reached the blastocyst stage. This rate did not increase significantly as compared to the control group (78.14%). Finally on day 3 (72 hrs), the rate of blastocyst formation reached 94.40% and 81.75%, respectively, in both the experimental and control groups. The difference between these two groups were significant ($p<0.05$). The number of blastomeres and apoptotic cells were similar in the experimental and control groups.

Conclusion: The laser assisted hatching has no decreasing effect on cellularity, but it has increasing effect on incidence of cell death. In addition, the assisted hatching significantly increases the blastocyst formation rate of intact vitrified-warmed 4-cell stage mouse embryos.

Keywords: Vitrification, Laser Assisted Hatching, Development, Mouse Embryos

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 2, Summer 2008, Pages: 121-128

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی تکوین و کیفیت جنین های چهار سلولی موش حاصل از انجماد شیشه‌ای پس از سوراخ کردن زونا به وسیله لیزر

روح الله فتحی .M.Sc[1]، مجتبی رضازاده ولوجردی .Ph.D[2,1*]، پوپک افتخاری یزدی .Ph.D[2]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح
۲. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه جنین شناسی

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح
پست الکترونیک: Email: mr_valojerdi@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۱۰/۲۲، پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۱

* **هدف:** بررسی اثر سوراخ کردن زونا به وسیله لیزر بر تکوین و کیفیت جنین های چهار سلولی موش حاصل از انجماد شیشه‌ای

* **مواد و روش‌ها:** جنین های چهار سلولی موش به دنبال انجماد شیشه‌ای به روش Closed Pulled Straw (CPS) (با استفاده از اتیلن گلیکول و سوکروز) به دو گروه کنترل (بدون دستکاری زونا) و آزمون (استفاده از لیزر برای سوراخ کردن زونا) تقسیم شدند. جنین های هر دو گروه در سیستم کشت متوالی شامل G_1^{TM}ver3 و G_2^{TM}ver3 کشت شده و در مرحله بلاستوسیست گسترده به صورت تصادفی کیفیت آنها با روش‌های رنگ آمیزی افتراقی (برای تعیین تعداد سلول) و TUNEL (برای تعیین تعداد سلول های آپوپتوتیک) بررسی شد.

* **یافته‌ها:** در ۲۴ ساعت اول کشت (۲۴ ساعت پس از لیزر)، اختلاف معنی‌داری در میزان تشکیل بلاستوسیست بین دو گروه وجود نداشت. پس از ۴۸ ساعت، درصد تشکیل بلاستوسیست گروه آزمون (۸۷/۶۱ درصد) نسبت به گروه کنترل (۷۸/۱۴ درصد) افزایش نامعنی‌دار یافت. نهایتا پس از ۷۲ ساعت، درصد تشکیل بلاستوسیست در گروه آزمون به ۹۴/۴۰ درصد رسید که نسبت به گروه کنترل (۸۱/۷۵ درصد) اختلاف معنی‌دار پیدا کرد ($p<0/05$). میزان سلولاریتی و تعداد سلول‌های مرده در جنین‌های گروه کنترل و آزمون یکسان بود.

* **نتیجه‌گیری:** سوراخ کردن زونای جنین‌های چهار سلولی سالم موش حاصل از انجماد شیشه‌ای به وسیله لیزر، اثر کاهنده بر میزان سلولاریتی جنین‌ها و یا اثر افزاینده بر تعداد سلول‌های مرده نداشت. به علاوه موجب افزایش میزان شکل گیری بلاستوسیست در جنین‌های سالم چهار سلولی موش حاصل از انجماد شیشه‌ای شد.

کلیدواژگان: انجماد شیشه ای، لیزر هچینگ، تکوین، جنین موشی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات: ۱۲۸-۱۲۱

مقدمه

از زمان اولین انجماد موفق جنین موش توسط واتینگهام (۱)، فرایند انجماد جنین در گونه‌های مختلف پستانداران در زمینه‌های طب تولید مثل، پرورش حیوانات و حفظ تغییرات ژنتیکی، به کار گرفته شده است. علی‌رغم تلاش‌های بسیار، فرایند انجماد هنوز باعث تغییرات جدی کروموزومی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جنین می‌شود. این تغییرات شامل ایجاد جنین‌های پلی‌پلوییدی (۲)، آسیب غشا (۳)، آسیب عملکرد ارگانل‌های سلولی (۴)، از هم گسیختگی ساختار سیتوپلاسم و فراگمنته شدن DNA است (۵). چنین تغییراتی منجر به مرگ بلاستومر و در نهایت جنین شده و باعث کاهش رشد و قابلیت لانه‌گزینی می‌شود. به طور کلی یکی از دغدغه‌های اصلی موفقیت انجماد، تولید جنین‌هایی با کیفیت خوب بدون کاهش قابلیت رشد است. برای حل این مشکل، تمام تلاش‌ها بر روی بهبود روش‌های انجماد یا شرایط کشت تمرکز یافته است. در دهه گذشته مطالعات زیادی در زمینه بهبود روش‌های انجماد (۶) و نیز نوع مواد انجمادی (۷) و تاثیر آنها بر میزان تکوین جنین صورت گرفته است و به نظر می‌رسد انجماد شیشه‌ای نسبت به سایر روش‌ها (انجماد آهسته، سریع و فوق سریع) در دسترس‌تر (۸) و ساده‌تر است و امکان تشکیل یخ‌های داخل و خارج سلولی و به دنبال آن آسیب‌های سلولی را کاهش می‌دهد. سرعت بالای انجماد و ذوب از ویژگی‌های بارز این تکنیک است. اما مانع اصلی بر سر راه موفقیت انجماد شیشه‌ای، حجم زیاد ماده ضدیخ است که در دمای اتاق برای جنین سمی است (۹). اخیرا برای افزایش میزان زنده ماندن جنین‌ها تغییرات زیادی در روش انجماد شیشه‌ای متداول (Conventional Straw: CS) صورت گرفته است. از جمله آنها می‌توان به تغییر در شکل نی انجمادی اشاره نمود. واجتا و همکارانش روش نی کشیده باز (Straw Pulled Opened: SPO) را ابداع کرده‌اند. آنها گزارش کردند پتانسیل حاملگی تخمک‌های حاصل از انجماد شیشه‌ای به روش نی کشیده باز در مقایسه با نی متداول بیشتر شده است (۱۰).

مدتی بعد چن و همکارانش روش نی کشیده بسته (Closed Pulled Straw: CPS) را با تغییر در نحوه قرار دادن جنین‌ها در نی ابداع کردند (۱۱). در این روش انتهای باز نی توسط محلول انجمادی بسته شد تا جنین‌ها در تماس مستقیم با نیتروژن مایع قرار نگیرند. در بین سه تکنیک نی انجمادی، گزارش شده است در روش CPS، میزان زنده ماندن جنین‌ها بهتر از سایر روش‌ها بوده است (۸، ۱۲). با وجود این، برخی معایب این روش انجمادی از جمله سختی زونا، کاهش رشد جنین‌ها تا بلاستوسیست و ظهور پدیده نکروز در برخی یا تمام بلاستومرها پس از ذوب قابل چشم پوشی نیست. این مشکلات می‌تواند با نحوه انتخاب اولیه جنین‌ها برای انجماد (۱۵-۱۳)، نوع روش انجمادی به کار گرفته شده (۱۸-۱۶) و یا نوع هورمون به کار رفته به منظور القای

Archive of SID
www.SID.ir

تخمک‌گذاری (۱۹، ۲۰) در ارتباط باشد. پدیده سخت شدن زونا در اثر انجماد می‌تواند در میزان تشکیل بلاستوسیست تاثیر بگذارد و رشد جنین را مختل کند و به دنبال آن میزان لانه‌گزینی و حاملگی را نیز کاهش دهد (۲۱). یکی از راهکارهایی که برای جبران اثر این آسیب اندیشیده شده، دست‌کاری به منظور فرار از دام زونا است. اخیرا محققان زیادی تاثیر مثبت زونا هچینگ را بر میزان لانه‌گزینی جنین انسان و افزایش حاملگی گزارش کرده‌اند (۲۲). مطالعه قبلی ما نشان داد با استفاده از لیزر زونا هچینگ بر روی جنین‌های حاصل از انجماد آهسته، میزان حاملگی و لانه‌گزینی در بیمارانی که از جنین های لیزر هچ شده استفاده کردند، به ترتیب به ۱۲/۸ و ۳۱/۲ درصد رسید که این میزان نسبت به گروه کنترل (به ترتیب ۴/۲ و ۱۱/۱ درصد) افزایش معنی‌داری رانشان داد (۲۲).

هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر سوراخ کردن زونا به وسیله لیزر بر کیفیت و تکوین جنین‌های چهار سلولی سالم موش حاصل از انجماد شیشه‌ای به روش CPS تغییر یافته است.

مواد و روش ها

تحریک تخمک گذاری و گرفتن جنین

موش‌های ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای نژاد (Institute Research Medical National: NMRI) از موسسه رازی تهیه شدند. با تزریق ۷/۵ واحد بین‌المللی (IU) هورمون (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin: PMSG) و (Human Corionic Gonadotropin: HCG) با فاصله ۴۸ ساعت، تحریک تخمک‌گذاری انجام شد. بلافاصله پس از تزریق، هر موش ماده با موش نر همان نژاد جفت انداخته و صبح روز بعد، وجود پلاک واژنی نشان‌دهنده روز یکم بارداری بود. ۴۴ تا ۴۸ ساعت پس از تزریق HCG موش‌ها به روش قطع نخاع گردنی کشته شدند و جنین‌های دو سلولی موش به وسیله محلول T_6 به همراه ۱۰درصد آلبومین سرم گاوی (Fraction V, Sigma) و (Serum Bovin Albumin: BSA) و با روش فلاش از لوله‌های رحمی خارج شدند. جنین‌هایی که از لحاظ ظاهر، نرمال تشخیص داده شدند، در محلول اول محیط کشت متوالی یعنی G_1^{TM} ver3 (Vitrolife, Sweden) به همراه ۱۰ درصد آلبومین سرم انسانی نوترکیب (Recombinant Human Albumin; rHA, Vitrolife, Sweden) قرار داده شدند. این جنین‌ها تا مرحله چهار سلولی پیش رفتند و با تکنیک انجماد شیشه‌ای و روش CPS منجمد شدند.

محلول‌ها و روش انجمادی

جنین‌های چهار سلولی گروه آزمایشی با روش CPS (۸) با کمی تغییر منجمد شدند. تمامی محلول‌های پیش تیمار و آزمایشی در محلول T_6 تهیه شدند. محلول پیش تیمار شامل ۱/۵ مول بر لیتر اتیلن‌گلیکول (Ethylene Glycol: EG, Sigma, USA) و محلول انجمادی شامل ۵/۵ مول بر لیتر اتیلن‌گلیکول به همراه ۱ مول بر لیتر سوکروز (Sucrose; Sigma, USA) بود. جنین‌ها ابتدا در محلول پیش تیمار به مدت ۴/۵ دقیقه در دمای محیط و در شرایط محیط آزمایشگاه به منظور آماده‌سازی برای تماس با محلول انجمادی قرار داده شدند. سپس در دمای اتاق به محلول انجمادی منتقل و به مدت ۱ دقیقه در آن باقی ماندند. سپس جنین‌های آبگیری شده به نی انجمادی آماده شده به نحوی که در زیر اشاره می شود منتقل شدند:

انتهای یک نی انجمادی ۰/۲۵ میلی‌متری (IMV Technologies; L,Aigel, France) ابتدا با استفاده از حرارت یک صفحه گرم (Hot Plate) نرم و سپس کشیده شد تا حدی که قطر داخلی آن ۰/۸ میلی‌متر و ضخامت دیواره آن به ۰/۰۷ میلی‌متر رسید. پس از سرد شدن نی در دمای اتاق، به وسیله قیچی قسمت انتهایی آن به همراه پلاگ کتانی (Cotton Plaque) بریده و نی کوچک شده، با محلول انجمادی پر شد. به این ترتیب که ابتدا نی به یک سرنگ انسولین متصل و با مکش به ترتیب ۲میلی‌متر محلول انجمادی و به دنبال آن ۲ میلی‌متر هوا به داخل نی کشیده شد. سپس ۲میلی‌متر محلول انجمادی به همراه ۶ عدد جنین، ۲ میلی‌متر هوا و سرانجام ۲ میلی‌متر محلول انجمادی به داخل نی کشیده شد. مقدار اخیر موجب بسته شدن نی شده و فرایند CPS کامل شد. نی پر شده سریعا وارد نیتروژن مایع شد.

محلول‌ها و روش ذوب

بعد از یک هفته، نی انجمادی از داخل تانک نیتروژن خارج شد و در معرض دمای اتاق قرار گرفت. سپس با لمس دیواره نی توسط انگشتان، محلول کاملا ذوب شد و محتویات آن به داخل محلول اول ذوب (محلول ۰/۵ مول بر لیتر سوکروز) غوطه‌ور شدند. جنین‌ها مرحله به مرحله در محلول‌های ذوب ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ مول بر لیتر سوکروز به مدت ۲ دقیقه در هر محلول شست و شو داده شد. جنین‌های سالم به دست آمده پس از ذوب در قطرات محیط G_1^{TM}ver3 حاوی ۱۰ درصد rHA و زیر روغن مینرال تست شده، قرار گرفتند.

گروه‌های مطالعه

به منظور بررسی اثر سوراخ کردن زونا پلوسیدا بر روی تکوین جنین‌های چهار سلولی منجمد–ذوب شده سالم موش، آنها در دو گروه اصلی کنترل و آزمون قرار گرفتند. جنین‌های گروه اول به عنوان جنین‌های منجمد هچ نشده در محیط کشت G_1^{TM} ver3 قرار داده شدند. جنین‌های گروه دوم به عنوان گروه منجمد هچ شده تحت عمل سوراخ کردن زونا به وسیله لیزر (Laser Assisted Hatching) قرار گرفتند و سپس وارد محیط کشت G_1^{TM} ver3 شدند. جنین‌های هر دو گروه تا مرحله هشت سلولی پیش رفتند و سپس به محیط کشت G_2^{TM} ver3 منتقل و تا مرحله بلاستوسیست گسترده مراقبت شدند. قابلیت حیات جنین‌های ذوب شده به وسیله میکروسکوپ معکوس و با بررسی یکپارچگی غشای بلاستومرها و نرمال بودن سیتوپلاسم، نیم ساعت پس از ذوب انجام شد.

سوراخ کردن زونا به وسیله لیزر

جنین‌های ذوب شده یک ساعت در محلول G_1^{TM} ver3 کشت داده شدند تا از لحاظ سالم بودن آنها اطمینان حاصل شود. جنین‌هایی که کاملا سالم ماندند در محیط Ham's F10 (Gibco, USA) حاوی بافر فسفات HEPES قرار گرفتند. عمل سوراخ کردن زونا به وسیله میکروسکوپ مدل نیکون TE 300 مجهز به سیستم لیزر (Zona Infrared Laser Optical System; Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA) انجام شد.

اشعه لیزر به شعاع ۱/۴۸ میکرومتر و با تناوب زمانی ۰/۵ میلی‌ثانیه شلیک شد. به این ترتیب، بر روی زونا، سوراخی به اندازه ۱۲ تا ۱۷ میکرومتر ایجاد شد. جنین‌ها پس از سوراخ شدن زونایشان به محیط G_1^{TM} ver3 منتقل و چندین بار در آن

Archive of SID

www.SID.ir

شست و شو داده شدند .پس از رسیدن به مرحله هشت سلولی، جنین‌ها به محیط کشت G_2^{TM} ver3 انتقال یافتند. جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست گسترده مراقبت شده و در این مرحله به وسیله رنگ آمیزی افتراقی و TUNEL به ترتیب از لحاظ میزان سلولاریتی و آپوپتوز بررسی شدند.

بررسی تکوین جنین‌ها

بلافاصله پس از شروع کشت، جنین‌های گروه آزمایشی در میزان رسیدن به بلاستوسیست با گروه کنترل مقایسه شدند. کیفیت جنین‌ها از لحاظ ظاهری در زیر میکروسکوپ معکوس (Olympus, Japan) بررسی شد. سپس بلاستوسیست‌های گسترده به صورت تصادفی انتخاب شدند تا برای شمارش تعداد بلاستومر کل، بلاستومرهای توده سلولی داخلی (Inner Cell Mass: ICM) و تروفواکتودرم (Trophoectoderm: TE) و نیز بررسی میزان مرگ سلولی، تحت رنگ‌آمیزی قرار گیرند.

رنگ‌آمیزی افتراقی

جنین‌های مرحله بلاستوسیست گسترده ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۰۰ میکرولیتر از محلول اول قرار داده شدند که شامل محیط (Human Tubal Fluid: HTF) فاقد سرم به همراه ۱درصد تریتون X100(Triton; Sigma, USA) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروپیدیم یدید (Propidium Iodide; PI, Sigma, USA) بود. پس از ۱۷ ثانیه، جنین‌ها به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول دوم منتقل شدند که از ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بیس بنزامید (Bies Benzamid; Hoechst 33258; Calbiochem, USA) در اتانول ۱۰۰درصد تشکیل شده بود. جنین‌های هچ نشده به مدت ۲۴ ساعت و جنین‌های هچ شده به مدت ۸ تا ۱۲ ساعت در محلول فوق و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در روز بعد بلاستوسیست‌های گسترده از محلول دوم خارج و به قطره‌ای از گلیسرول (Glycerol; Sigma; USA) که بر روی یک لام قرار داده شده بود، منتقل شدند و سپس روی آن با یک لامل پوشانده شد. شمارش بلاستومرها در زیر میکروسکوپ فلورسنت (Florescent Microscope; Olympus BX51, Japan) با طول موج‌های بین ۳۸۰ تا ۴۲۰ نانومتر به ترتیب برای رنگ‌های آبی و قرمز صورت گرفت که رنگ آبی بیانگر سلول‌های ICM و رنگ قرمز نشانگر سلول‌های TE بود (۲۳) (شکل B و A۱).

رنگ آمیزی TUNEL

تعدادی از جنین‌های مرحله بلاستوسیست گسترده با کیت TUNF(In Situ Cell Death Detection System; Roche, Germany) رنگ‌آمیزی شدند. این تکنیک مخصوص نشان دادن سلول‌های آپوپتوتیک است. پس از سه بار شست و شوی جنین‌ها در بافر فسفات (PBS) عمل فیکس در محلول فرمالدئید ۴ درصد (Sigma, USA) محلول در PBS به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. جنین‌ها در PBS حاوی ۰/۳درصد پلی‌وینیل پایرولیدون (PVP; Sigma, USA) شش بار شست و شو داده شده و به مدت دو دقیقه در تریتون ۰/۱درصد بر روی یخ قرار گرفتند. پس از این مدت، سه بار در محلول PBS/PVP شست و شو داده شدند و سپس به مدت یک ساعت در محلول TUNEL انکوبه شدند. مراحل مشاهده جنین‌های رنگ‌آمیزی شده به روش فوق در زیر میکروسکوپ فلورسنت درست مانند روش رنگ‌آمیزی افتراقی است. سلول‌های به رنگ زرد تا سبز به عنوان سلول آپوپتوتیک در نظر گرفته شدند (۲۴) (شکل D و C۱).

آنالیز آماری

نتایج به دست آمده از بررسی تکوین جنین‌ها و نیز شمارش تعداد بلاستومرها و سلول‌های آپوپتوتیک به وسیله نرم‌افزارهای آماری تجزیه تحلیل شدند. اختلاف در میانگین تکوین جنین‌ها در گروه‌های آزمون و کنترل و اختلاف بین تعداد بلاستومرهای کل، بلاستومرهای ICM و TE و نیز اختلاف در میانگین درصد بلاستوسیست‌ها و تعداد سلول‌های آپوپتوتیک پس از نرمال شدن با تست کولموگروف اسمیرنوف به وسیله آزمون t-test و تحت نرم‌افزار SPSS (Software Program, Version 13; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) آنالیز شدند.

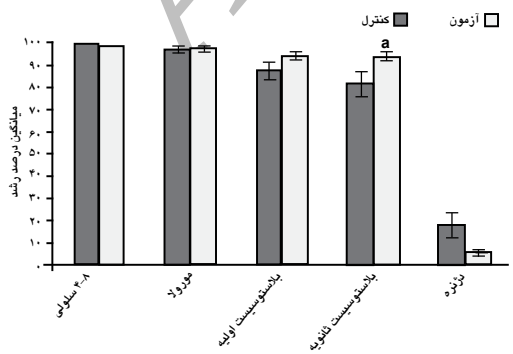
نتایج

اثر انجماد شیشه‌ای بر میزان زنده ماندن جنین‌های چهار سلولی موش

تعداد ۵۲۹ جنین موش در مرحله چهار سلولی با روشی که در بخش مواد و روش‌ها به آن اشاره شد منجمد-ذوب شدند. پس از ذوب تعداد ۵۰۹ (۹۶/۲۱درصد) جنین، ۱۰۰درصد بلاستومر سالم داشتند. سایر جنین‌های ذوب شده از یک تا چهار بلاستومر نکروز داشتند (۳/۷۹درصد) و از آزمایش حذف شدند.

تکوین جنین‌ها و مقایسه میزان شکل‌گیری بلاستوسیست در گروه‌های کنترل و آزمون

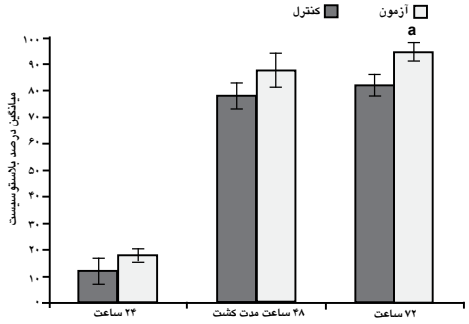
نتایج میزان تکوین جنین‌ها طی شمارش آنها در مدت کشت در نمودار ۱ آمده است. تعداد ۲۷۵ جنین، در گروه منجمد هچ نشده (کنترل) و تعداد ۲۵۲ جنین در گروه منجمد هچ شده (آزمون) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهد میانگین درصد تکوین جنین‌های گروه کنترل در مرحله چهار تا هشت سلولی و مورولا به ترتیب ۱۰۰ و ۹۷/۲۸درصد است. این مقادیر در گروه آزمون به ترتیب ۱۰۰ و ۹۷/۵۷درصد بود که نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار ندارند. همچنین میانگین درصد شکل‌گیری بلاستوسیست اولیه و گسترده در گروه کنترل به ترتیب ۸۷/۶۷ و ۸۱/۷۵ درصد و در گروه آزمون به ترتیب ۹۴/۴۰ و ۹۴/۴۰ درصد بود که در گروه آزمون، میانگین درصد شکل‌گیری بلاستوسیست ثانویه نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داده است ($p<0/05$). پس از پایان مدت زمان کشت، همین روند در مورد جنین‌های دژنره تکرار شده است. به طوری که بیشترین تعداد جنین دژنره مربوط به گروه کنترل (۱۸/۲۵ درصد) بود و که نسبت به گروه آزمون (۵/۶۰ درصد) معنی‌دار است ($p<0/05$).



نمودار ۱: مقایسه میانگین درصد تکوین جنین ها در گروه‌های کنترل و آزمون
a: اختلاف میان گروه‌های کنترل و آزمون معنی‌دار است ($p<0/05$).

Archive of SID
www.SID.ir

نمودار ۲ به تفکیک ساعات کشت، میانگین درصد شکل گیری بلاستوسیست را در دو گروه کنترل و آزمون طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت، نشان می‌هد. در ۲۴ ساعت اول کشت درصد تشکیل بلاستوسیست در گروه کنترل ۱۱/۹۵درصد و در گروه آزمون ۱۸/۰۱درصد است که از لحاظ آماری تفاوتی ندارند. پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت جنین‌ها، تشکیل بلاستوسیست در گروه آزمون (۸۷/۶۱ درصد) افزایش یافته ولی نسبت به گروه کنترل (۷۸/۱۴ درصد) اختلاف معنی‌دار پیدا نکرده است. نهایتا در روز آخر کشت مشاهده می‌شود که کمترین میانگین درصد شکل گیری بلاستوسیست مربوط به گروه کنترل (۸۱/۷۵ درصد) بوده که نسبت به گروه آزمون (۹۴/۴۰ درصد) کاهش معنی‌دار داشته است (p<۰/۰۵).



نمودار ۲: مقایسه میانگین درصد شکل‌گیری بلاستوسیست در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت پس از ذوب در گروه‌های کنترل و آزمون
a: اختلاف میان گروه‌های کنترل و آزمون معنی‌دار است(p<۰/۰۵).

جدول ۱: مقایسه کیفیت جنین های موشی در گروه های کنترل و آزمون از لحاظ تعداد بلاستومرهای کل، توده سلولی داخلی (ICM) و تروفواکتودرم (TE)

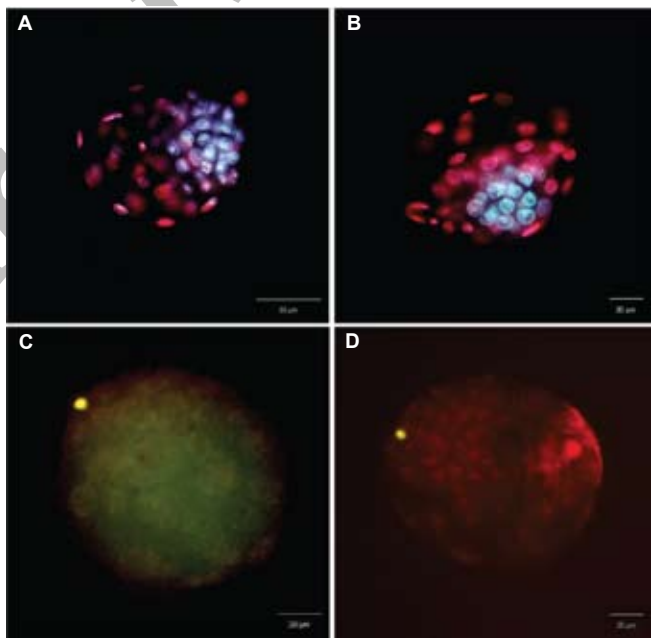
گروه	تعداد	میانگین کل سلول‌ها ±SE	میانگین سلول‌های ICM±SE	میانگین سلول‌های TE±SE	ICM index ±SE
کنترل	۳۰	۵۷/۷۳ ±۵/۴	۱۷/۹۳ ±۲	۳۹/۸۰ ±۴/۴	۰/۳۲ ±۰/۰۲
آزمون	۳۶	۵۴/۳۰ ±۲/۳۰	۱۴/۶۵ ±۰/۹۰	۳۹/۸۸ ±۱/۵	۰/۲۴ ±۰/۰۱

ICM: توده سلولی داخلی، **TE:** تروفواکتودرم، **SE:** میانگین خطای استاندارد
a : اختلاف بین گروه‌های کنترل و آزمون معنی‌دار است(p<۰/۰۵).

جدول ۲: مقایسه کیفیت جنین‌های موشی در گروه‌های کنترل و آزمون از لحاظ تعداد سلول‌ها و درصد بلاستوسیست‌های آپوپتوتیک Apoptotic index

گروه	تعداد	میانگین درصد بلاستوسیست‌های آپوپتوتیک±SE	میانگین سلول‌های آپوپتوتیک±SE	Apoptotic index±SE
کنترل	۲۷	۲۴(۸۸/۸۸±۳/۰۰ درصد)	۰/۹۰±۰/۳۰	۰/۰۱۶±۰/۰۰۶
آزمون	۳۰	۲۵(۸۱/۰۰±۳/۰۰ درصد)	۰/۸۰±۰/۱۰	۰/۰۱۵±۰/۰۰۳

SE: میانگین خطای استاندارد
- اختلاف بین گروه های کنترل و آزمون در تمامی ستون‌ها معنی‌دار نیست.



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از رنگ‌آمیزی افتراقی (A) گروه کنترل و (B) گروه آزمون و تکنیک TUNEL (C) گروه کنترل و (D) گروه آزمون بلاستوسیست موش. A و B: رنگ آبی نشان دهنده توده سلولی داخلی (ICM) و رنگ صورتی (قرمز) نشان دهنده سلول‌های تروفواکتودرم (TE) است. C و D : نقاط قرمز براق نشان دهنده سلول نکروتیک و نقاط زرد براق نشان دهنده سلول آپوپتوتیک است. Bar: ۲۰ میکرومتر

Archive of SID
www.SID.ir

تعداد بلاستومرهای کل، ICM و TE

تعداد بلاستومرهای کل در بلاستوسیست‌های گروه کنترل به طور متوسط ۵/۴۰±۵۷/۷۳ بود. تعداد بلاستومرهای کل در بلاستوسیست های گروه آزمون به طور متوسط ۲/۳۰±۵۴/۳۰ بود و این میزان نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در تعداد بلاستومرهای TE نیز تفاوتی در هر دو گروه دیده نشد. اما متوسط تعداد بلاستومرهای ICM در گروه آزمون (۰/۹۰±۱۴/۶۵) نسبت به گروه کنترل (۲±۱۷/۹۳) کاهش معنی‌دار نشان داد (p<۰/۰۵). در میزان ایندکس ICM نیز تفاوت‌ها معنی‌دار نبود (جدول۱).

تعداد و درصد بلاستوسیست های آپوپتوتیک

تعداد بلاستومرهای آپوپتوتیک در گروه کنترل ۰/۰۳±۰/۰۹، و در گروه آزمون ۰/۱۰±۰/۸۰ بود و بین این دو تفاوت معنی‌دار دیده نشد. این نشان دهنده آن است که انجماد به روش فوق و همچنین سوراخ کردن زونا به وسیله لیزر پس از انجماد موجب افزایش آپوپتوزیس در جنین نشده است. در میزان درصد بلاستوسیست‌های آپوپتوتیک نیز در هر دو گروه تفاوت معنی‌دار دیده نشد (جدول ۲).

بحث

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر سوراخ کردن زوناپلوسیدا به وسیله لیزر بر تکوین و کیفیت جنین‌های چهار سلولی سالم موش حاصل از انجماد شیشه‌ای است. با توجه به نتایجی که در گزارش‌های مختلف آمده است، سوراخ کردن زونا می‌تواند بلاستوسیست هچینگ را افزایش دهد ولی در شکل گیری بلاستوسیست اثری ندارد (۲۵، ۲۶). در پژوهش حاضر بر خلاف مطالعات ذکر شده، ثابت شده است که سوراخ کردن زونا می‌تواند میزان شکل گیری بلاستوسیست را در جنین‌های منجمد-ذوب شده سالم، به طور معنی‌داری افزایش دهد (کنترل: ۸۱/۷۵ درصد، آزمون: ۹۴/۴۰ درصد)(p<۰/۰۵). این افزایش در حالی است که در میزان سلولاریتی جنین‌ها کاهشی مشاهده نشده است (کنترل: ۵/۴۰±۵۷/۷۳، آزمون: ۲/۳۰±۵۴/۳۰). همچنین میزان وقوع مرگ سلولی در جنین‌های گروه آزمون، ثابت مانده و نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا نکرد (کنترل: ۰/۰۳±۰/۹۰، آزمون: ۰/۱۰±۰/۷۰).

اختلاف نتایج در کیفیت جنین‌ها و میزان رشد به سمت بلاستوسیست بین مطالعه حاضر و گزارش‌های گذشته، ممکن است بنا بر علل مختلف، از جمله نحوه طراحی مطالعه، نژاد حیوان مورد آزمایش، روش انجماد و شرایط آزمایشگاه باشد. طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه، احتمالا استفاده از نژاد NMRI، روش مناسب انجماد، و نیز شرایط مطلوب آزمایشگاه باعث شده است که جنین‌های سالم حاصل از انجماد شیشه‌ای از لحاظ سلولاریتی و میزان مرگ سلولی در حد قابل قبول باقی بمانند و دچار افت کیفی نشوند.

ثابت شده است که اثرات شیمیایی و فیزیکی انجماد می‌تواند یک تغییر ناخواسته در جنین به وجود آورد (۵) و بر توانایی زنده ماندن بلاستومرها و نهایتا جنین تاثیر بگذارد. بسته به نوع روش انجمادی، مواد ضدیخ مصرفی و یا زمان‌بندی پروسه انجماد و ذوب، شدت آسیب تغییر می‌کند. به طور مثال در انجماد شیشه‌ای به علت سرعت بالای انجماد، کریستال‌های یخ که از آسیب‌های فیزیکی مهم به حساب می‌آیند فرصت شکل گیری را از دست می‌دهند (۲۷).

از آسیب‌های متداولی که در اثر انجماد به جنین تحمیل می‌شود، سخت شدن یا ترک برداشتن زوناپلوسیدا است که باعث اختلال در روند رشد طبیعی جنین و میزان شکل گیری بلاستوسیست شده و هچینگ را کاهش می‌دهد (۲۶). سخت شدن زونا باعث می‌شود تا تبادلات غذایی بین جنین و محیط دست‌خوش تغییر شود، بنابراین جنین نمی‌تواند مواد مغذی مورد نیاز را در اسرع وقت و به سهولت دریافت کند. سوراخ کردن کمکی زوناپلوسیدا از لحاظ کلینیکی برای بیمارانی که پیش‌آگهی خوبی نسبت به نتیجه فرایندهای ART ندارند، مانند کسانی که بیش از دو نوبت در IVF ناموفق بوده‌اند (۲۸)، بیماران دارای جنین‌های با کیفیت پایین (۲۹)، زنان با سنین بالاتر از ۳۷ سال (۳۰) و نیز جنین‌های منجمد-ذوب شده (۲۲)، مفید است. روش‌های مختلفی برای سوراخ کردن زونا در مقالات آمده است. از جمله، استفاده از اسیدتایرود (۳۱)، سوراخ کردن زونا با سوزن‌های بسیار ظریف و یا اشعه لیزر (۲۲) و یا استفاده از یک روش جدید به نام Pizo (۳۲). در بسیاری از مقالات بر استفاده از لیزر به عنوان یک روش تاثیرگذار نسبت به سایر تکنیک‌ها تاکید شده است (۳۳، ۳۴).

ایجاد سوراخ در زونا، موجب خروج مواد ضدیخ سمی باقی‌مانده در جنین شده و در عوض مواد مغذی محیط کشت با سرعت بیشتری در اختیار بلاستومرهای جنین قرار می‌گیرند. با خروج مواد سمی از جنین، سیگنالینگ سطح بلاستومرها روند عادی خود را از سر می‌گیرند و ارتباطات بین‌سلولی بهتر انجام می‌شود. همچنین ایجاد این سوراخ در زونا شاید باعث کاهش سختی و افزایش خاصیت انعطاف‌پذیری آن شود که فضای بهتری برای رشد بلاستومرها ایجاد می‌کند. همچنین خروج بلاستومرها از زونا راحت‌تر صورت خواهد گرفت و لانه‌گزینی افزایش می‌یابد (۲۲). می‌توان گفت کمک به خروج بلاستومرها از زونایی که در اثر انجماد سخت شده است (۲۶)، و نیز بهبود سیگنالینگ سلولی بر اثر خروج کامل مواد سمی در جنین‌های منجمد-ذوب شده، موجب می‌شوند تا شرایط لازم برای برقراری ارتباط بهتر بین بلاستومرهای جنین و سلول‌های اپی‌تلیالی اندومتر فراهم آید تا عمل لانه‌گزینی راحت‌تر صورت پذیرد.

نتیجه گیری

انجماد شیشه‌ای به روش CPS، اثر مخرب بسیار کمی بر کیفیت و میزان تکوین جنین‌ها دارد و می‌توان به عنوان روشی برای ذخیره جنین‌ها از آن استفاده کرد. سوراخ کردن زوناپلوسیدای جنین های حاصل از انجماد شیشه‌ای به وسیله لیزر راهی است مناسب برای فرار جنین از دام زونا برای انجام مرحله حساس هچینگ. سوراخ کردن زونا، علاوه بر اینکه موجب افزایش معنی‌دار میزان شکل گیری بلاستوسیست در جنین‌های منجمد-ذوب شده می‌شود، سلولاریتی و میزان وقوع مرگ سلولی را در حد قابل قبول حفظ می‌کند و از کیفیت جنین‌ها نمی‌کاهد.

References

1. Whittingham DG, Wood M, Farrant J, Lee H, Halsey JA. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196 degrees C. J Reprod Fertil 1979; 56(1): 11-21

2. Balakier H, Cabaca O, Bouman D, Shewchuk AB, Laskin C, Squire JA. Spontaneous blastomere fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism. Hum Reprod 2000; 15(11): 2404-2410

3. Pfaff RT, Agca Y, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser

Archive of SID

www.SID.ir

JK. Cryobiology of rat embryos I: determination of zygote membrane permeability coefficients for water and cryoprotectants, their activation energies, and the development of improved cryopreservation methods. Biol Reprod 2000; 63(5): 1294-1302
4. Saunders KM, Parks JE. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. Biol Reprod 1999; 61(1): 178-187
5. Ahn HJ, Sohn IP, Kwon HC, Jo DH, Park YD, Min CK. Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos. Mol Reprod Dev 2002; 61(4): 466-476
6. Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Forman R, Hazout A, Volante M, et al. Human embryo viability related to freezing and thawing procedures. AM I Obstet Gynecol 1987; 157: 168-171
7. Camus M, Van den Abbeel E, Van Waesberghe L, Wisnto A, Devroey P, Van Steirteghem AC. Human embryo viability after freezing with dimethylsulfoxide as a cryoprotectant. Fertil Steril 1989; 51: 460-465
8. Ramezani M, Rezazadeh Valojerdi M, and Parivar K. Effect of three vitrification methods on development of two-cell mouse embryos. Cryoletter 2005; 26(2): 85-92
9. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. Biol Reprod 2002; 67(6):1671-80 Review
10. Vajta G, Holm p, Kuwayame M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Devel 1998; 51, 3-58
11. Chen SU, lien YR, Cheng YY, Chen HF, HO HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves 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
12. Rienzi L, Nagy ZP, Ubaldi F. Laser-assisted removal of necrotic blastomers frome cryopreserved embryos that were partially damaged. Fertil Steril 2002; 77: 145-151
13. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocycst using a novel cryoloop container-less technique. Fertil Steril 1999; 72 : 1073-1078
14. Hartshorne GM, Wick K, Elder K, Dyson H. Effect of cell number at freezing upon survival and viability of cleaving embryos generated from stimulated IVF cycles. Hum Reprod 1990; 7: 857-861
15. Camus M, Van den Abbeel E, Van Waesberghe L, Wisnto A, Devroey P, Van Steirteghem AC. Human embryo viability after freezing with dimethylsulfoxide as a cryoprotectant. Fertil Steril 1989; 51: 460-465
16. Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Forman R, Hazout A, Volante M, et al. Human embryo viability related to freezing and thawing procedures. AM I Obstet Gynecol 1987; 157: 168-171
17. Testart J, Lassalle B, Forman R, Gazengel A, Belaisch-Allart J, Hazout A, et al. Factors influencing the success rate of human embryo freezing in an in vitro fertilization and embryo transfer program. Fertil Steril 1987; 48: 107-112
18. Van den Abbeel E, Camus M, Van Waesberghe L, Devroey P, Van Steirteghem AC. A randomized comparison of Cryopreservation of one-cell human embryos with a slow controlled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging in to liquid nitrogen. Hum Reprod 1997; 12: 1554-1560
19. Van der Auwera I, Meuleman C, Koninckx PR. Human menopausal gonadotropin increase pregnancy rate in comparison with clomiphen citrate during replacement cycle of frozen / thawed per nucleate ova. Hum Reprod 1994; 9: 1556-1560
20. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Camus M, Smitz J, Van Waesberghe L, Devroey P. Long-term evaluation of implantation of fresh and cryopreserved human embryos following ovarian stimulation with buserelin acetate-human menopausal gonadotropin (HMG) or clomiphen citrate-HMG. Hum Reprod 1996; 11: 2097-2106
21. Van den Abbeel E, Camus M, Van Waesberghe L, Devroey P, Van Steirteghem AC. Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation. Hum Reprod 1997; 12: 2006-2010
22. Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Ashtiani SK. Effect of laser zona pellucida opening on clinical outcome of assisted reproduction technology in patients with advanced female age, recurrent implantation failure, or frozen-thawed embryos. Fertil Steril 2007; 21; [Epub ahead of print]
23. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod Biomed Online 2001; 3(1): 25-29
24. Brison DR, Schultz RM. Increased incidence of apoptosis in transforming growth factor alpha-deficient mouse blastocysts. Biol Reprod 1998 Jul; 59(1): 136-144
25. Rienzi L, Ubaldi F, Lacobelli M. Developmental potential of fully intact and partially damaged cryopreserved embryos after laser-assisted removal of necrotic blastomers and post-thaw culture selection. Fertul Steril 2005; 84(4): 888-894
26. Nagy Z, Taylor T, Elliott T, Massey J, Kort H, Shapiro D. Removal of lysed blastomeres from frozen-thawed embryos improves implantation and pregnancy rates in frozen embryo transfer cycles. Fertil Steril 2005; (84)6: 1605-1612
27. Kasai M. Cryopreservation of mammalian embryos. Mol Biotechnol 1997; 7(2): 173-179

Archive of SID

www.SID.ir

28. Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Pontes A, Franco Junior JG. Zona thinning with a noncontact diode laser in ICSI embryos from women of advanced age. J Assist Reprod Genet 2002; 19: 206-512
29. Tucker MJ, Luecke NM, Wiker SR, Wright G. Chemical removal of the outside of the zona pellucida on day 3 human embryos has no impact on implantation. J Assist Reprod Genet 1993; 10: 187-191
30. Makrakis E, Angeli I, Agapitou K, Pappas K, Dafereras A, Pantos K. Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes. Fertil Steril 2006;86:1596-1600
31. Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. Hum Reprod 1992; 7: 685-691
32. Nakayama T, Fujiwara H, Tastumi K, Fujita K, Higuchi T, Mori T. A new assisted hatching technique using a piezo-micromanipulator. Fertil Steril 1998; 69: 784-788
33. Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacretaz G, Fakan S. Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48 mm diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. Fertil Steril 1995; 64: 604-611
34. Antinori S, Selman HA, Caffa B, Panci C, Dani GL, Versaci C. Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. Hum Reprod 1996; 11: 2488-2492

Archive of SID

www.SID.ir