Archive of SID

اثر انجماد شیشه ای بر تعداد و حیات توده سلول داخلی بلاستوسیست‌های گاوی رشد یافته در آزمایشگاه

حجت ا... کریمی جشنی (Ph.D.)* محمدحسین نصر اصفهانی(Ph.D.)* حسین ایمانی (Ph.D.)**
حسین بهاروند(M.Sc.)* محمدمردانی(Ph.D.)***

چکیده

سابقه و هدف: از کشت توده سلول داخلی بلاستوسیست در محیط مناسب، سلول‌های بنیادی جنینی به‌دست می‌آید . از این سلول‌ها به عنوان یک ابزار تحقیقاتی در تولید حیوانات ترانس ژنیک و مطالعه تکوین جنین استفاده می‌شود. با روش انجماد شیشه‌ای می‌توان بلاستوسیست‌های تولید شده را برای استفاده‌های بعدی نگهداری کرد. هدف از این مطالعه بررسی تعداد و میزان حیات سلول‌های توده داخلی بلاستوسیست‌های منجمد شده به روش انجماد شیشه‌ای است. به امید این‌که بتوان از جنین‌های منجمد شده نیز جهت تولید سلول‌های بنیادی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها : پس از بلوغ ولقاح آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ گاو، جنین‌ها در محیط $Ham's\ F_{10}$ بر لایه سلول‌های vero به مدت ۷ روز در دمای $39^{\circ}C$ ، ۵٪ CO_2 کشت داده شد. ۵۰۰ عدد بلاستوسیست انتخاب و به دو گروه تقسیم گردید. یک گروه به عنوان شاهد و گروه دیگر به روش انجماد شیشه‌ای (۴۰درصد اتیلن گلیکول،۱۸درصد فایکل، ۰/۳ مولار ساکارز) منجمد شد. پس از ذوب، جنین‌ها به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و جنین‌های متسع شده، انتخاب و همراه با گروه شاهد با روش Immunosurgery توده سلولی داخلی آن‌ها جدا شد. برای بررسی حیات سلول‌ها از رنگ‌آمیزی تریپان بلو استفاده گردید.

یافته ها : درصد حیات توده سلول داخلی بلاستوسیست های روز هفتم در گروه شاهد و انجماد به‌ترتیب ۹۶درصد و ۸۵ درصد و میانگین تعداد سلول‌ها به‌ترتیب $17/4 \pm 3$ و 14 ± 2 بود. درصد حیات توده سلول داخلی بلاستوسیست‌های روز هشتم در گروه شاهد و انجماد به‌ترتیب ۹۵درصد و ۸۲ درصد و میانگین تعداد سلول‌ها به‌ترتیب $18/6 \pm 3$ و 15 ± 2 بود.

استنتاج : درصد حیات و تعداد سلول‌های توده داخلی بلاستوسیست‌های گروه شاهد و انجماد درروز هفتم و هشتم دارای اختلاف معنی داری است. به روش انجماد شیشه ای درصد حیات و تعداد سلول‌ها به‌طور معنی داری کاهش می‌یابد. لذا بهتر است که جهت تولید سلول‌های بنیادی از بلاستوسیست‌های منجمد نشده استفاده شود.

واژه های کلیدی : بلاستوسیست، عفونت بلاستوسیستی، توده سلولی داخلی

---

* گروه جنین شناسی ، پژوهشکده رویان ، تهران ✉ تهران : خیابان ولی عصر، زعفرانیه، خیابان آصف، کوه سمین، پژوهشکده رویان
** متخصص آناتومی و عضو هیأت علمی(استادیار) دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) *** متخصص آناتومی و عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
تاریخ دریافت:۸۲/۸/۳ تاریخ تصویب:۸۲/۱۱/۲۹

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه به‌دلیل پاسخگویی به‌نیازهای غذایی جمعیت روزافزون، مسؤولین صنایع دامداری با هدایت تحقیقات پایه به سمت افزایش تولید دام، تولیدگونه‌های مقاوم به بیماری و توان شیردهی بالا و تولید پروتئین‌های خاص که می‌توان از آن‌ها به عنوان دارو استفاده کرد، مبادرت به سرمایه‌گذاری جهت تولید دام‌های ترانس ژنیک نموده‌اند(۱). یکی از راه‌های تولید دام ترانس ژنیک استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی است. سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های تمام ظرفیتی هستندکه از سلول‌های توده داخلی بلاستوسیست‌ها به دست می‌آیند (۲،۱). در آزمایشگاه، توده سلولی داخلی را به روش ایمونوسرجری از بلاستوسیست جدا می‌کنند و در محیط مناسب کشت می‌دهند ولی اجازه تمایز به آن‌ها داده نمی‌شود(۴،۳). این روش اولین بار جهت استخراج توده سلول داخلی در جنین موش استفاده گردید(۴). سپس این روش در سایر پستانداران از جمله گاو به کار گرفته شد. Sims و First (۱۹۹۳) با استفاده از روش ایمونوسرجری توده‌سلولی داخلی جنین گاو را استخراج نمودند و پس از کشت در محیط مناسب از آن‌ها سلول‌های شبه بنیادی جنینی تولید کردند و با انتقال این سلول‌ها به اووسیت بدون هسته، اقدام به تولید گاو نمودند (۳).

درایمونوسرجری ابتدا جنین‌ها در معرض آنتی‌بادی با رقت مشخص قرار می‌گیرند و سپس به طور جداگانه در مجاورت کامپلمان قرار داده می‌شوند و در نتیجه سلول‌های تروفوبلاست تخریب می‌شوند. ولی سلول‌های توده داخلی سالم باقی می‌مانند. از مزایای روش ایمونوسرجری این است که در یک دورهٔ زمانی نسبتاً کوتاه می‌توان تعداد زیادی توده سلول داخلی خالص جهت تحقیقات به دست آورد(۴). از سلول‌های بنیادی به عنوان ابزار تحقیقاتی درشبیه‌سازی- درتولید حیوانات ترانس ژنیک و کایمر و در مطالعه تکوین جنین استفاده می شود(۱تا۳).

برای تولید سلول‌های بنیادی نیاز به مقدماتی شامل تهیه سلول‌های تغذیه کننده؛ متوقف کردن رشد میتوزی سلول‌های فیبروبلاست و هماهنگی نمودن ، جهت داشتن بلاستوسیست با کیفیت مناسب می‌باشد(۲). لذا ایجاد مقدمات فوق می‌تواند استفاده به موقع از بلاستوسیست‌های تازه را محدود سازد. جهت تسهیل وساده‌تر نمودن مراحل فوق و همچنین صرفه‌جویی در وقت و هزینه در این روند استفاده از جنین‌های منجمد شده پیشنهاد شده است.

از آن‌جایی‌که انجماد جنین گاو به دلایل علمی و اقتصادی دارای اهمیت بالایی است، تحقیقات در زمینه انجماد، بیش‌تر روی گونه گاو متمرکز شده است. معمولی‌ترین روش جهت‌نگهداری جنین‌های‌گاو، روش انجماد شیشه‌ای است. محققین با استفاده از این روش و محلول انجمادی اتیلین گلیکول ، فایکل، ساکارز میزان حیات جنین های گاو را بالاتر از انجماد آهسته گزارش نموده‌اند. برخلاف روش انجماد آهسته در این روش، شانس تشکیل بلورهای یخ کاهش می‌یابد، اما جنین با تغییرات اسموتیک بسیارشدیدی روبرومی‌شود. همچنین در این روش به علت استفاده از غلظت بالای ضدیخ، جنین با مسمومیت سلولی مواجه می‌گردد(۶،۵).

تحقیقات نشان داده است که در طی انجماد جنین گاو، تعداد سلول‌های توده داخلی در بلاستوسیست کاهش یافته و شانس بقاء آن‌ها نیز تحت تأثیر روش انجمادی قرار می‌گیرد(۸،۷).

لذا هدف این مقاله تعیین تعداد ومیزان حیات سلول‌های توده داخلی بلاستوسیست‌های تولید شده در آزمایشگاه پس از انجمادشیشه‌ای متعاقب ایمونوسرجری می‌باشد به امید این‌که بتوان از توده سلولی جدا شده در تولید سلول‌های بنیادی استفاده کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

همهٔ محیط‌ها و موادی که در این تحقیق مصرف شده‌اند از شرکت Sigma تهیه شده‌اند؛ مگر مواردی که به آن‌ها اشاره خواهد شد.

محیط‌هایی که در این تحقیق ساخته و از آن‌ها استفاده شده عبارتند از :

۱- محیط بلوغ : HEPES -TCM 199 . از این محیط به عنوان محیط بلوغ استفاده شد و به هر میلی‌لیتر از این محیط ۲۲ میکروگرم سدیم پیروات، ۱ میکروگرم استرادیول، ۱ واحد HMG،۲/۲ میلی‌گرم سدیم بیکربنات، ۰/۵ میلی‌گرم استرپتوماسین، ۰/۵ میلی‌گرم پنی‌سیلین و ۱۰٪ FCS اضافه شد.

۲- محیط شست و شوی تخمک‌ها وجنین : HEPES - TCM 199، که مشابه محیط بلوغ است ولی فاقد هورمون می‌باشد.

۳- محیط لقاح : TALP، که شامل ۱۱٤ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۳/۱۵میلی‌مولار کلرید پتاسیم، ۰/۳۹ میلی‌مولار فسفات سدیم، ۳/۱۳ میلی‌مولار لاکتات سدیم، ۲ میلی‌مولار کلرید کلسیم، ۰/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۲۵ میلی‌مولار بی‌کربنات سدیم، ۰/۲ میلی‌مولار پیروات سدیم که به هر میلی‌لیتر از این محیط ۱ میکرومولار اپی نفرین، ۱۰ میکرو مولار هیپوتورین، ۲۰ میکرومولار پنی سیلامین ۱۰ میکروگرم هپارین، ٦ میلی‌گرمBSA، ۰/۲۵ میلی‌گرم استرپنوماسین، ۰/۲۵ میلی‌گرم پنی‌سیلین اضافه شد.

٤- محیط کشت جنین : Ham's F_{10} +FCS10%که به هر میلی‌لیتر از آن ۲/۱ میلی‌گرم بیکربنات سدیم و۰/۲۵ میلی‌گرم لاکتات کلیسم و ۰/۰٦ میلی‌گرم پنی سیلین و ۰/۰٦ میلی‌گرم استرپتومایسین اضافه شد.

۵- محلول بافر نمکی : PBS که به هر میلی‌لیتر آن ۰/۱ میلی‌گرم فسفات پتاسیم و ۰/۱ میلی‌گرم کلرید کلسیم و ۸ میلی‌گرم کلرید سدیم و ۲/٦ میلی‌گرم فسفات سدیم اضافه شد.

٦- محلول پایه برای تهیه محلول انجماد و ذوب : PB_1 . که شامل PBS – ۵/۵ مولار گلوکز، ۳/۳ میلی‌مولار پیروات سدیم- ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین- ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA می‌باشد.

۷- محلول انجمادی : EFS. (٤۰٪ اتیلین گلیکول + ۱۸٪ فایکل +۰/۳ مولار ساکارز در محلول پایه)

۸- محیط شست و شوی بلاستوسیست‌ها در ایمونوسرجری : SOF_{aa} که شامل ۱۰۸ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۷/۲ میلی‌مولار کلرید پتاسیم، ۰/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۱/۲ میلی‌مولار فسفات پتاسیم، ۳/۳ میلی‌مولار لاکتات سدیم، ۲۵ میلی‌مولار بیکربنات سدیم، ۱/۷ میلی‌مولار کلرید کلسیم، ۰/۳۳ میلی‌مولار پیروات سدیم، ۱/۵ میلی‌مولار گلوکز، ۱ میلی‌مولار گلوتامین،۱٪ اسید آمینه غیر ضروری، ۲٪ اسید آمینه ضروری می‌باشد که به هر میلی‌لیتر آن ۱ میلی‌گرم پلی‌ونیل الکل ۱ میلی‌گرم پلی‌ونیل پیرولیدون، ۰/۲۵ میلی‌گرم پنی‌سیلین،۰/۲۵میلی‌گرم استرپتومایسین اضافه گردید.

بالغ نمودن اووسیت‌ها در آزمایشگاه :

تخمدان‌های گاو از کشتارگاه جمع‌آوری و در سالین ۹ درصد و دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. مایع فولیکولی، فولیکول‌های ۸-۲ میلی‌متری توسط سوزن شماره ۱۸ کشیده شد ودر لوله‌های مخروطی جمع‌آوری و پس از گذشت ۱۵-۱۰ دقیقه ته‌نشین حاصل به دیش‌های بزرگ انتقال داده شد و در زیر استریومیکروسکوپ توده تخمک، کومولوس‌هایی [Cumulus-oocyte complex(COC)]

www.SID.ir

Archive of SID

که حداقل سه لایه سلول کومولوس در اطراف خود داشتند انتخاب شدند و ۳ بار در محیط شست و شو و دوبار در محیط بلوغ شسته شدند و ۱۰-۵ عدد COC به قطره ۵۰ میکرولیتری از محیط بلوغ در زیر روغن منتقل شدند ودر دمای ۳۹ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO2 و حداکثر رطوبت به مدت ۲۴-۲۲ ساعت کشت داده شدند.

لقاح آزمایشگاهی :

COC ها دوبار در محیط لقاح شسته شدند و در گروه‌های ۱۰ عددی به قطره‌های ۵۰ میکرولیتری از همین محیط در زیر روغن منتقل شدند. سمن تازه گاو از مرکز اصلاح نژاد دام اصفهان تهیه گردید. جهت تهیه اسپرم‌های متحرک از لایه‌های پرکول (Serono -Germany) ۴۵ درصد و ۹۰ درصد که در محیط لقاح رقیق شده بود، استفاده شد. ته‌نشین حاصل دوبار در محیط لقاح شسته شد و پس از تعیین غلظت (۵ میلیون در میلی‌لیتر) توسط سمپلر ۱۰ میکرولیتر از اسپرم به COC ها اضافه گردید. به این ترتیب غلظت نهایی اسپرم‌ها در قطرات حاوی COC به ۱ میلیون در میلی‌لیتر رسید. COCهای تلقیح‌شده برای مدت ۲۴-۱۸ ساعت در شرایط ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 و حداکثر رطوبت کشت داده شدند.

تهیه تک لایه سلول‌های Vero:

سلول‌های زنده Vero پس از ذوب در محیط کشت، به داخل فلاسک ۵۰ میلی‌لیتری برای استفاده بیش‌تر کشت داده شدند. سلول‌های انکوبه شده تحت تأثیر تریپسین ۰/۵٪ در PBS جدا شدند. سوسپانسیون سلولی دوبار شسته شد و سپس غلظت سلول‌ها به 1×10^5 در میلی‌لیتر رسانده شد و از آن‌ها جهت تولید لایه تک سلولی Confluent در زیر روغن استفاده گردید.

کشت جنین در آزمایشگاه :

پس از گذشت ۲۴-۱۸ ساعت از زمان تلقیح، جهت جدا سازی جنین‌ها از سلول‌های کومولوس اطراف به مدت ۲ دقیقه در محیط شست و شو ورتکس شدند . جنین‌ها پس از انتخاب دوبار در محیط کشت شسته شدند ودر گروه‌های ۲۰-۱۰ عددی در هر قطره ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت در زیر روغن بر روی تک لایه سلول‌های Vero شدند و در شرایط ۳۹ درجه سانتی‌گراد ۵٪ CO_2 و حداکثر رطوبت به مدت ۷ روز کشت داده شدند.

گروه‌های آزمایشی :

به منظور بررسی اثر انجماد برروی تعداد و حیات سلول‌های توده داخلی، تعداد ۵۰۰ عدد بلاستوسیست تولید شده در آزمایشگاه در روز هفتم و هشتم پس از لقاح، انتخاب شدند و به دو گروه تقسیم گردیدند: ۱- گروه شاهد ۲- گروهی که انجماد روی آنها انجام گرفت. توده سلولی داخلی هر دو گروه به روش ایمونوسرجری به شرح زیر جدا شد و با ا ستفاده از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو، توان زیستی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

روش انجماد شیشه‌ای :

در این تحقیق از روش انجماد شیشه‌ای بر طبق پروتکل kasai که توسط Zhn و همکارانش(۱۹۹۳) تغییر داده شده استفاده گردید(۹). ابتدا دو تا سه عدد جنین در محلول ۲۰درصد اتیلن گلیکول (تهیه شده در محلول پایه) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس جنین‌ها به محلول انجمادی منتقل شدند و پس از گذشت ۴۵-۳۰ ثانیه به نی‌فریز منتقل شدند ونی‌فریز به صورت افقی به مدت ۲ دقیقه روی بخار نیتروژن نگه داشته شد و سپس درون نیتروژن مایع غوطه‌ور گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

روش ذوب :

پس از خارج کردن نی‌فریز حاوی جنین از درون نیتروژن مایع و نگه داشتن آن در هوا به‌مدت ٦-٥ ثانیه ، نی به‌مدت ١٥-١٠ ثانیه در آب با دمای ٣٠ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس محتویات آن به درون دیش تخلیه شد. جنین‌ها به محلول ٠/٥ مولار ساکارز منتقل شدند و پس از گذشت ٥ دقیقه جنین‌ها دو بار شسته شدند و به محیط کشت روی تکه لایه سلول‌های Vero منتقل و به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٩ درجه سانتیگراد و ٥٪ co_2 و حداکثر رطوبت کشت داده شدند.

روش ایمونوسرجری:

برای جداسازی توده سلولی داخلی از روش Michelle (١٩٩٣) استفاده شد(٣). پس از گذشت ٢٤ ساعت از کشت مجدد بلاستوسیست‌های ذوب شده، بلاستوسیست‌های متسع شده انتخاب شدند. برای برداشتن زونا از پروناز ٠/٥ درصد به‌مدت ٣-١ دقیقه استفاده شد. سپس جنین‌ها در قطره‌های ٥٠ میکرولیتری از محیط شست و شو، ٤ تا ٥ بار شسته شدند و به قطره Rabbit- antibovine Antibody(sigma B 8270) که به نسبت ١:١٠ رقیق شده بود منتقل و در دمای ٣٩ درجه سانتی‌گراد به مدت ٣٠ دقیقه انکوبه شدند. سپس جنین‌ها شسته شدند و به قطره Guinea pig Complement (Sigma – 1639) که به نسبت ١:٥ رقیق شده بود منتقل و در دمای ٣٩ درجه سانتی‌گراد به مدت ٣٠دقیقه انکوبه شدند. در زیر استریومیکروسکوپ با استفاده از پیپت پاستور توده سلول داخلی از سلول‌های تروفوبلاست لیز شده جدا شد. توده سلولی جدا شده به قطره تریپسین روی لام منتقل شد و با استفاده از پیپت پاستور سلول‌ها، از هم جدا شدند پس از گذشت سه دقیقه محیط حاوی FCS به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید. سپس قطره رنگ تریبان بلو ٠/٤ درصد به سوسپانسیون سلولی اضافه شد و بلافاصله در زیر میکروسکوپ نوری شمارش سلولی انجام گرفت. سلول‌های مرده به رنگ آبی و سلول‌های زنده بدون رنگ بودند. جهت تجزیه و تحلیل آماری از روش Student .t.tests ونرم افزار spss استفاده شد.

یافته ها

تولید جنین آزمایشگاهی گاو ، شامل مراحل بلوغ آزمایشگاهی ، لقاح آزمایشگاهی و کشت آزمایشگاهی جنین است. در این مطالعه برای دست یابی به بلاستوسیست، ابتدا مراحل سه گانهٔ فوق انجام شد. بدین منظور در طی ٢٠٠ تکرار و با استفاده از حدود ١٤٥٠٠ عدد اووسیت کشیده شده از تخمدان گاو، مراحل فوق الذکر راه اندازی گردید. سپس طی ٥٠ تکرار ٣٥٠٠ عدد اووسیت انتخاب و کشت داده شد و پس از بلوغ ، با اسپرم تلقیح شده و به‌مدت ٧ و٨ روز در محیط آزمایشگاه کشت داده شدند. حدود ٢٠درصد از اووسیت های تلقیح شده به مرحلهٔ بلاستوسیست رسیدند. ٢٥٠ عدد بلاستوسیست روز هفتم و ٢٥٠ عدد بلاستوسیست روز هشتم که از نظر ساختمانی دارای کیفیت بهتری بودند انتخاب و به دو گروه شاهد و انجماد تقسیم گردیدند. ١٥٠ عدد بلاستوسیست مربوط به هر روز منجمد – ذوب شد و پس از کشت مجدد حدوداً ٧٠درصد از آنها متسع شدند که همراه با گروه شاهد با روش ایمونوسرجری، توده سلولی داخلی آن‌ها جدا گردید و با روش تریپان بلو رنگ شدند. سلول‌های مرده به رنگ آبی در آمدند. برای انجام ایمونوسرجری می بایستی زوناپلوسیدا توسط پروناز برداشته شود. در این مطالعه ٢/٥درصد از بلاستوسیست های گروه انجماد با وجود این که برای مدت ١٥ دقیقه هم در پروناز قرار گرفتند، زونا برداشته نشد. این زونا پلوسیداها ضخیم تر و تیره تر به نظر می رسیدند.

www.SID.ir

Archive of SID

۱۰درصد از بلاستوسیست های گروه انجماد پس از انجام ایمونوسرجری تمام سلول‌هایشان تخریب شدند؛ در صورتی که در گروه شاهد موردی مشاهده نشد.

در برخی از نمونه های گروه انجماد پس از برداشتن زونا ریزش بقایای سلول‌های تخریب شده از اطراف جنین مشاهده گردید.پس از جدا سازی سلول‌های توده داخلی از یکدیگر، سلول‌های شکسته شده و تغییر شکل داده در بعضی از نمونه های گروه انجماد مشاهده شد.در برخی از نمونه های گروه شاهد و انجماد، شمارش توده سلول داخلی به علت پایین بودن کیفیت جنین انجام نگرفت و از فهرست آمار حذف گردید.

جدول شماره ۱ میانگین تعداد ودرصد حیات سلول‌های توده داخلی در گروه شاهد و گروه انجماد در روز هفتم را نشان می‌دهد. تعداد سلول‌های توده داخلی در جنین‌های گروه انجماد کم‌تر از گروه شاهد است و از نظر آماری تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار می باشد (P<۰/۰۰۱). همچنین درصد حیات سلول‌های توده داخلی کم‌تر از جنین‌های گروه شاهد است(P<۰/۰۰۱).

جدول شماره ۱: میانگین تعداد ودرصد حیات سلول‌های توده داخلی درگروه شاهد و گروه انجماد در روز هفتم.

درصد حیات سلول‌ها	میانگین تعداد سلول‌ها	گروه‌های آزمایشی
٪۹۶	۱۷/٤ ± ۳	کنترل
٪۸۵	۱٤±۲	انجماد

جدول شماره ۲ ، میانگین تعداد و درصد حیات سلول‌های توده داخلی در گروه شاهد و گروه انجماد در روز هشتم را نشان می دهد. تعداد سلول‌های توده داخلی در جنین های گروه انجماد کم‌تر از جنین های گروه شاهد است . تفاوت بین آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار می باشد. (P<۰/۰۰۱) . همچنین درصد حیات سلول‌های توده داخلی در جنین های گروه انجماد، پایین‌تر از گروه شاهد است و از نظر آماری تفاوت بین آن‌ها معنی دار است .(P<۰/۰۰۱ و chi-square = ۵۹/٦).

جدول شماره ۲: میانگین تعداد و درصد حیات سلول‌های توده داخلی در گروه شاهد و انجماد در روز هشتم.

درصد حیات سلول‌ها	میانگین تعداد سلول‌ها	گروه‌های آزمایشی
٪۹۵	۱۸/۶ ± ۳	کنترل
٪۸۲	۱۵±۲	انجماد

بحث

جنین در طی فرآیند انجماد – ذوب به وسیلهٔ عوامل مختلفی در معرض آسیب قرار می‌گیرد. این عوامل عبارتند از : ۱- مسمومیت ناشی از ضد یخ‌ها ۲- آسیب‌ناشی از حساسیت در برابر سرما ۳- آسیب فیزیکی ناشی از یخ خارج سلول ٤- مسمومیت ناشی از الکترولیت‌های تغلیظ شده ٥- تشکیل و رشد یخ داخل سلولی ٦- آسیب ناشی از شکست روناپلوسیدا ۷- تورم سلولی ۸- درهم ریختگی اندام‌های داخل سلولی، سیتوسکلتون و اتصال سلول به سلول (۱۰ تا ۱٤). لازم به ذکر است که در طی انجماد شیشه‌ای، بلاستوسیست‌ها چروکیده شده و بلاستوسل آن‌ها روی هم می‌خوابد که پس از ذوب و کشت مجدد تعدادی از آن‌ها زنده مانده وحفره بلاستوسل آن‌ها مجدداً متسع می‌شود (۱۵).

در این مطالعه ۷۰درصد از بلاستوسیست‌ها پس از کشت مجدد متسع شدند. محقیق دیگر این میزان را بین ۵۷درصد تا ۹۵درصد گزارش کرده‌اند (۱٦،۱۳ تا ۱۹). تفاوت درمیزان حیات بلاستوسیست‌ها پس از ذوب را به کیفیت جنین‌ها و روش انجمادی نسبت داده اند(۲۰-۲۱).

www.SID.ir

Archive of SID

در ضمن تعداد سلول‌های توده داخلی و سلول‌های تروفوبلاست، ملاک معتبری برای توان زیستی و کیفیت جنین پستانداران است(۲۳،۲۲). نتایج تحقیق حاضر میانگین تعداد سلول‌های توده داخلی درگروه شاهد و گروه انجماد روز هفتم را به ترتیب ۱۷/۵ و ۱٤ عدد و روز هشتم را ۱۸/٦ و ۱۵ عدد نشان می‌دهد (جدول شماره ۱ و جدول شماره۲). در مطالعات انجام گرفته در این زمینه تعداد سلول‌های تودهٔ داخلی بین ۱۱ تا ۸٤ عدد گزارش شده است (۸،۲۲ تا ۲٤).

لازم به ذکر است که میزان حیات بلاستوسیست‌های تولید شده در موجود زنده پس از ذوب وکشت مجدد نسبت به بلاستوسیست‌های آزمایشگاهی بیش‌تر است و همچنین تعداد کل سلول‌ها و تعداد سلول‌های توده داخلی نیز بیش‌تر از تعداد سلول‌های جنین آزمایشگاهی است (۲۵،۲٦). این تفاوت می‌تواند ناشی از بلوغ آزمایشگاهی و تأثیرات محیط کشت باشد. تحقیقات توسط Galli (۲۰۰۳) و Hiroyohi (۲۰۰۳) نشان داد که وجود سرم باعث تجمع غیر طبیعی قطرات چربی در سیتوپلاسم سلول جنین می شود و این امر میزان حیات بلاستوسیست‌ها بعد از انجماد را کاهش می‌دهد.(۲۸،۲۷)

در این مطالعه تمام سلول‌ها در برخی از بلاستوسیست های گروه انجماد پس از ایمونوسرجری تخریب شدند که احتمالاً علت آن می تواند آسیب اتصال بین سلول‌های تروفوبلاست در اثر انجماد باشد. این امر باعث عبور آنتی بادی از بین این سلول‌ها شده و به سلول‌های توده داخلی می‌رسد که پس از افزودن کامپلمان، سلول‌های توده داخلی نیز تخریب می شوند. همچنین مشاهده بقایای سلول‌های تخریب شده پس از برداشت زونا و شکسته شدن و تغییر شکل سلول‌های توده داخلی در گروه انجماد ناشی از آسیب سلول‌ها در طی انجماد – ذوب می باشد.

آسیب ناشی از انجماد شیشه‌ای شامل کاهش تعداد میکروویلی‌ها در سلول‌های تروفوبلاست، آسیب تمامیت غشاء پلاسمایی، تغییرات میتوکندری، تورم شبکه آندوپلاسمیک خشن وتشکیل وزیکول‌های کوچک است، ظاهراً بعضی از این تغییرات قابل برگشت هستند. اما مرگ سلولی نیز روی می‌دهد که باعث کاهش تعداد سلول‌ها می‌شود (۳۰،۲۹).

تحقیقات نشان داده است که پس از ذوب جنین‌های گاوی تولید شده در آزمایشگاه، تعداد کل سلول‌ها کاهش می‌یابد و مرگ سلول‌های توده داخلی نیز اتفاق می‌افتد(۲۲). همچنین در طی فرآیند انجماد – ذوب میزان نکروزیس وآپیتوزیس در سلول‌های جنینی گاو افزایش می‌یابد که این امر هم موجب کاهش تعداد کل سلول‌ها و هم باعث مرگ سلولی در توده داخلی بلاستوسیست می‌شود(۳۱). تحقیق حاضر درصد حیات سلول‌های توده داخلی را برای گروه شاهد در روز هفتم وهشتم به ترتیب ۹٦درصد و ۹۵درصد و برای گروه انجماد به ترتیب ۸۵درصد و ۸۲درصد نشان می‌دهد. محققین دیگر این میزان را در گروه انجماد بسته به نوع ضدیخ بکار برده شده بین ٦۷درصد تا ۷۷درصد و برای گروه شاهد ۸٤ درصد گزارش کرده‌اند. افزایش درصد حیات در این تحقیق نسبت به دیگران می‌تواند ناشی ازتفاوت در سیستم کشت، روش انجماد، مراحل تکاملی جنین یا تفاوت در کیفییت جنین باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که بین تعداد و درصد حیات سلول‌های توده داخلی جدا شده به روش ایمونوسرجری از بلاستوسیست‌های منجمد شده در روز هفتم وهشتم با گروه شاهد تفاوت وجود دارد و بهتراست از بلاستوسیست‌های منجمد نشده برای تولید سلول‌های بنیادی استفاده گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از طرح «کلونینگ گاو » مصوب شورای‌علمی پژوهشکده رویان ودفترجهاد دانشگاهی (کد طرح ۲۱-۵۹٤) است. بدین وسیله نویسندگان بر خود واجب می‌دانند که از همکاری بی دریغ آقای دکتر سعیدکاظمی‌آشتیانی،آقای دکتر وثوق،آقای عبدالحسین شاهوردی مسؤولین و کارکنان مرکز باروری و ناباوری اصفهان ومسؤولین کشتارگاه صنعتی اصفهان و مسؤولین محترم اصلاح نژاد دام اداره جهاد کشاورزی اصفهان تشکر و قدردانی نمایند.

فهرست منابع

1. Wheeler M.B, walters E.M. Transgenic Technology and Applications in Swine. ***Theriogenology*** 2001; 56: 1345-1369.
2. Strelchenko. N. Bovine pluripotent stem cells. ***Theriogenology*** 1996; 45:131-140.
3. Sime M and First. N.L. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cel mass cells. ***Proc. Natl. Acad. Sci*** USA 1993; 90: 6143-6147.
4. Solter D, Knowles B. Immunosurgery of mouse blastocyst. ***Immunology*** 1975; 72(12): 3189-3192.
5. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H,Sakurai T, Machida T. A simple Method for mouse embryo. Cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreiable loss of viability. ***J Reprod fertile*** 1990; 89: 91-97.
6. Kuwayama M, Fujikalua S, Nagai T .Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in gly 1.2 propanediol using 2 and 16 step procedures ***Cryobiology*** 1994;31:415-422.
7. Takagi M, Sakonju I, Otoi T, Hamana K, Suzuki T. Postthow viability of the inner cell mass of in vetro matured/in vitro-fertilized bovine embryo frozen in various cryoprotectants.***Cryobiology***; 1994; 31: 398-405.
8. Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I. Effect of conventional controlled – rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocyst produced in vitro.***Biology of Reproduction***; 2001; 65: 1127-1134.
9. Zhn SE, Kasai M, Otage H, Sakurai T, Machida T. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solution. ***J Reprod and fertile***; 1993; 98: 139-145.
10. Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservtion of embryos.***Theriogenology;*** 1996; 45:17-26.
11. Kasai M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. ***Theriogenology***; 1996; 42: 67-75.
12. Vagta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. A***nimal Repro sei*** 2000; 60-61: 357-364.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Saha D, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. Viability of bovine blastocysts obtained after 7,8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step rehydration. ***Theriogenology***; 1996; 46:331-343.
14. Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos implication for their cryopreservation. ***Human Reprod***; 1995; 10: 3004-3011.
15. Mtango NR, Varisanga MD, Dong Y.J, Rajamahendran R, Suzuki T. Growth factors and growth hormon enhance in vitro emhryo production and post thaw survival of vitrified bovine blastocysts. ***Theiogenology*** 2003; 59: 1393-1402.
16. Martines AG, de Matos DG, Furnus CC, Brogliatii GM. In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. ***Theriogenology***; 1998; 50: 757-767.
17. Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT, Dekruif A. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two step addition of cryoprotectant and dilution on embryonic survival. ***J Reprod Fertil*** 1995; 103: 33-39.
18. Papaioannov V.E, Ebert. K.M. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectrderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. ***Development*** 1988; 102: 793-803.
19. Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. ***Theriogenology*** 1996; 45:683-689.
20. Kaidi S, Donnay I, Vanlangendonck A, Dessy, Massip A. Camparison of two co-culture system to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification. ***Anim Reprod sci***; 1998; 52: 39-50.
21. Rizos D, ward F, Boland MP, Lonergan P. Effect of culture system on the yield and guality of bovine blastosysts as assessed by survival ofter vitrification. ***Theriogenology*** 2001; 56: 1-16.
22. Iwasaki S, yoshikane Y, Lix, Wtanabe S, Nakara T. Effects of freezing of bovine preimplantation embryos derived from oocytes fertilzed in vitro on survival of their inner cell mass cells. ***Mol Reprod.*** 1994; 37: 272-275.
23. Stojkovic M, Buttner M, Zakhartchenko V, Brem G, wolf E. A reliable procedure for differential staining of in vitro produced bovine blastocysts:Comparison of tissue culture medium 199 and Menezo's B_2 medium. ***Animal Reprod sci*** 1998; 50: 1-9.
24. Takagi M, Sakonju I, Suzuki T. Effects of cryopreservation on DNA synthesis in

www.SID.ir

Archive of SID

the nner cell mass of in vetro matured / in vitro fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectant, ***J vet Med sci*** 1996; 58: 1237-1238.

25. Du F, Looney C.R, Yangx. Evaluation of bovine embryos produced in vitro vs. in vivo by differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells. ***Theriogenaloys*** 1996.
26. Enright BP, Lanergon P, Dinnyes A, Fair T, Ward F.A, Yang X, Boland Mp. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo iImplication for early embryo development and quality. ***Theriogenology*** 2000;54:659-673.
27. Galli C, Duchi R, crotti G, Turini P, ponderato N, collooni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine embryo technologies. Theriogenclogy 2003; 59: 599-616.
28. Hiroyoshi Hoshi. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. ***Theriogenology*** 2003; 59: 675-685.
29. Vajta G, Hyttel P, Callesen H. Morphological changes of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification in- straw direct rehydration and culture, ***Mol Reprod*** 1997; 48: 9-17.
30. Kaidi S, Van langendonekt A, Massip A, Dessy F, Donnay I. Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for vitrification of in vitro Produced bovine embryos. ***Theriogenolagy*** 1999; 52: 515-525.
31. Baguisi A, Lanergon P, Overs trom EW, Boland MP. Vitrification of bovine embryos: incidence of necrosis and apoptosis. ***Theriogenalagy*** 1999; 51: 162.

www.SID.ir