مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۷، شماره۴، مهر و آبان۱۳۹۱(شماره پی در پی ۷۰)

میزان بقاء، باروری و تکامل تخمک و جنین پس از انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ و غلظت‌های اندک ضدیخ درمحلول انجمادی

امرالله روزبهی[۱]، طهمورث شهریور[۲]، اصغر حیدریان[۳]، سحر الماسی ترک[۴*]

[۱]دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، [۲]دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، [۳]دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، کمیته تحقیقات دانشجویی، [۴]دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

تاریخ دریافت : ۱۳۹۰/۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۱۷

چکیده

زمینه و هدف : از موارد نیاز به ذخیره سازی انجمادی می‌توان به نگهداری جنین‌ها، جلوگیری از چند قلوزایی و کسب نتایج موفق‌تر بعد از برگشت فیزیولوژی رحم به سیکل طبیعی اشاره کرد. هدف این مطالعه ارزیابی میزان بقاء، باروری و تکامل تخمک و جنین پس از انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ و غلظت‌های اندک ضدیخ درمحلول انجمادی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی تخمک‌های منجمد شده موش‌های نژاد C57Bl/6 با محلول‌های۷/۵، ۱۰ و۱۲ درصد محلول انجماد شیشه ای بارور شده و میزان تکامل آنها تا جنین دو سلولی ثبت شد. پس از انجماد شیشه‌ای جنین‌ها، آنها را تا بلاستوسیست کشت داده و میزان تکامل در هر مرحله ثبت شد. داده‌ها با آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و الاس‌دی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در گروه‌های تخمک‌های منجمد شده با محلول ۱۲/۵ و ۱۵ درصد نتایج با یکدیگر و با گروه کنترل مشابه بود. در جنین‌های منجمد شده با محلول۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵ درصد نتایج با هم و با گروه کنترل مشابه بود. نتایج حاصل از انجماد با محلول ۷/۵ درصد در همه گروه‌ها، نتایج ضعیفی بود.

نتیجه‌گیری: انجماد شیشه‌ای تخمک و جنین با استفاده ازکرایوتاپ، کاهش غلظت ضدیخ را تا محلول‌های۱۰ و ۱۲/۵ درصد به جای محلول ۱۵، امکان‌پذیر می‌کند و می‌تواند گامی در جهت بهینه کردن پروتکل متداول به شمار آید.

واژه‌های کلیدی: انجماد، تخمک، جنین، شیشه ای، کرایوتاپ

نویسنده مسئول: دکتر سحر الماسی ترک، بوشهر، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
Email: s.almasi@bpums.ac.ir

Archive of SID

مقدمه

در درمان‌های ناباروری، با گامت‌های گرفته شده از زوجین، جنین‌های متعددی تولید می‌شود که جهت جلوگیری از احتمال چند قلوزایی نباید همهٔ جنین‌ها را به رحم مادر انتقال داد. بدین ترتیب از نیتروژن مایع برای ذخیره سازی انجمادی[1] جنین‌های مازاد استفاده می‌شود(۱). جلوگیری از هم‌زمان شدن لانه گزینی جنین تازه[2] با احتمال وقوع سندرم تحریک بیش از حد تخمدان[3] که احتمال به خطر انداختن پروسهٔ لانه گزینی را در بر دارد، از فواید استراتژی ذخیره‌سازی جنین به منظور انتقال در زمان مناسب‌تر می‌باشد(۲). ذخیره‌سازی انجمادی گامت ماده به جای جنین می‌تواند راه حل مناسبی برای محدودیت‌های اخلاقی باشد. با این روش، مشکل عقیمی که پس از شیمی درمانی و اشعه درمانی در بیماران سرطانی به وجود می‌آید قابل اجتناب است، اضافه بر این که در زنانی که دچار مشکلات ارگان‌های تولید مثلی هستند که به نوعی در عملکرد تخمدان‌ها تأثیر منفی دارند با کارکرد مؤثر این تکنیک می‌توانند از حفظ توان باروری خود مطمئن باشند. هم‌چنین ذخیره‌سازی انجمادی گامت ماده می‌تواند بخشی از برنامهٔ اهداء تخمک و تأسیس بانک تخمک در آینده باشد(۳).

تعریف فیزیکی انجماد شیشه‌ای، جامد شدن سریع یک محلول از حالت مایع به حالت شیشه‌ای با افزایش ویسکوزیته درحین کاهش دما است(۴). در این روش کریستال یخ تشکیل نمی‌شود و از خطر شکست پرده شفاف و بلاستومر جلوگیری می‌شود، اما سلول‌ها در معرض غلظت زیاد ضدیخ‌ها قرار می‌گیرند(۵). محققان این رشته علمی‌بر این باورند که در انجماد شیشه‌ای الزاماً نیاز به به کار بردن غلظت زیاد ضد یخ نیست، چرا که اگر سرعت سرد کردن به اندازهٔ کافی زیاد باشد حتی آب خالص را هم می‌توان منجمد شیشه‌ای کرد و به همین ترتیب با استفاده از غلظت زیاد ضد یخ، انجماد شیشه‌ای با سرعت متوسط یا حتی سرعت آهسته دست یافتنی است(۷ و۶).

به کار گیری توأمان چند ضد یخ از تأثیر سمی مخصوص به یک ضد یخ خاص می‌کاهد. مخلوط ضدیخی که بیشتر متداول است حاوی اتیلن گلیکول[4]، دی متیل سولفوکساید[5] و سوکروز است(۸). باید علاوه بر انتخاب صحیح نوع ضدیخ، غلظت کمتر آنها را به کار برد، اما در عین حال به انجماد شیشه‌ای دست یافت(۷). فاکتور مورد مطالعه بعدی تأثیر سرعت سرد کردن است که با افزایش زیاد سرعت سرد کردن می‌توان از میزان غلظت ضدیخ کاست و سلول‌ها را در معرض سمیت کمتر ضدیخ‌ها یا شرایط غیر سمی‌قرار داد(۷).

کاستن از حجم محلول انجماد شیشه‌ای، نه تنها باعث افزایش سرعت سرد کردن و یا گرم کردن می‌شود، بلکه شانس تشکیل کریستال‌های یخ را در

1-Cryopreservation
2-Fresh Embryo
3-Ovarian Hyperstimulation Syndrom
4-Ethylen Glycol (EG)
5-Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Archive of SID

www.SID.ir

سلول‌ها کاهش می‌دهد و هر چه سرعت سرد کردن بیشتر باشد از غلظت محلول انجمادی می‌تواند کاسته شود(۹). به منظور کم کردن حجم محلول انجمادی هنگام انجماد، استفاده از ظروف انجمادی مختلفی برای انجماد شیشه‌ای پیشنهاد شده است. جدیدترین ظرف انجمادی، کرایوتاپ می‌باشد که در ابداع آن به کاهش حجم محلول انجمادی توجّه شده است(۵). در صورت استفاده از این وسیله، سرعت سرد کردن به ۲۳۰۰۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش می‌یابد، در نتیجه از صدمات ناشی از سرما جلوگیری می‌شود. علاوه بر آن با کاهش حجم محلول با این وسیله، سرعت گرم کردن مجدد نیز به ۴۲۰۰۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش می‌یابد و در نتیجه از تشکیل کریستال‌های یخ حین گرم کردن جلوگیری می‌شود(۵). تکنیک‌های انجماد متنوعی برای انجام موفق‌تر انجماد تخمک پیشنهاد شده است، اما علی‌رغم تلاش‌فراوان، پیشرفت‌ها در این زمینه کند است(۱۰). برای حصول به بیشترین احتمال موفقیت در تکنیک‌های کمک باروری استفاده از با کیفیت‌ترین گامت اصل اساسی به شمار می‌رود(۱۱). پروتکل‌های مختلف کمک باروری با محاسبه میزان حفظ کیفیت گامت و جنین‌های منجمد شده ارزشیابی می‌شوند(۱۲). هدف این مطالعه ارزیابی میزان بقاء، باروری و تکامل تخمک و جنین پس از انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ و غلظت‌های اندک ضدیخ درمحلول انجمادی بود.

روش بررسی

این مطالعه تجربی پس از تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بوشهر بر روی موش نژاد C57Bl/6 انجام شد. موش‌ها به طور تصادفی به ۶ گروه مساوی شامل؛ ۵ گروه آزمون و یک گروه کنترل تقسیم شدند. تخمک‌ها و جنین‌های گروه‌های آزمون ۵ ـ ۱ به ترتیب با محلول‌های تعادلی و انجمادی ۰/۵، ۶/۲۵، ۷/۵، ۱۰ و۱۲/۵ درصد و ۳/۷۵ و ۷/۵ درصد منجمد و سپس گرم شدند. پس از گرم کردن، تخمک‌ها بارور شدند و تا مرحله دو سلولی کشت داده شدند. جنین‌های چهار سلولی نیز پس از گرم شدن، مراحل بعدی تکامل را تا بلاستوسیست طی کرده و ثبت شدند. نمونه‌های گروه کنترل نیز بدون انجماد شیشه‌ای مراحل مختلف را همانند گروه‌های آزمون طی کردند. هر آزمایش حد اقل ۷ بار تکرار شد.

کیت انجماد شیشه‌ای شامل؛ محیط پایه HEPES-buffered TCM 199 ، محلول تعادلی و محلول انجمادی بود که هر دو از محیط پایه غنی شده با سرم تشکیل شده و حاوی ضد یخ‌های اتیلن گلیکول و دی‌متیل سولفوکساید می‌باشند. محلول‌های تعادلی و انجمادی به ترتیب فاقد و دارای قند سوکرز بودند. محلول‌های گرم کردن، رقیق کردن و شستشو محیط‌های پایه غنی شده با سرم بودند و غلظت‌های مختلفی از سوکرز داشتند. محیط برای دست‌کاری‌های تخمک و جنین بر اساس پروتکل ارگلو و همکاران[1]

1-Eroglu et al

Archive of SID

www.SID.ir

محیط هایپر مدیوم تهیه و به کار گرفته شد(۱۳). قبل از شروع کار، از محیط کشت انکوبه شده درون انکوباتور با اتمسفر مرطوب دارای ۶ درصد دی اکسید کربن و حرارت ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد استفاده شد.

موش‌های ماده ۱۰-۸ هفته‌ای، نژاد C57Bl/6 که از انستیتو پاستور تهیه شده بودند به روشی که قبلاً منتشر شده است تحریک تخمک گذاری شدند (۱۴). برای گرفتن تخمک متافاز II مدت ۱۴-۱۳ ساعت و برای گرفتن جنین چهار سلولی ۵۷-۵۶ ساعت پس از تزریق هورمون گونادوتروپین انسانی، به ترتیب از پاره کردن ناحیه آمپول لوله رحمی و تکنیک فلاشینگ استفاده شد. برای جداسازی سلول‌های کومولوس از تخمک از محلول ۰/۱ درصد هیالورونیداز به مدت ۴-۳ دقیقه استفاده شد.

تکنیک انجماد شیشه‌ای برای تخمک و جنین به یک روش و بر اساس آنچه که قبلاً منتشر شده بود انجام شد(۱۵). در هربار تکرار آزمایش، تعداد نمونه‌ها از ۳ یا ۴ موش جمع‌آوری می‌شد و پس از مخلوط کردن نمونه‌های تمام موش‌ها، تخمک‌هایی که ظاهر و اندازهٔ طبیعی و دارای یک جسم قطبی مشخص بودند، برای انجماد انتخاب شدند. در مورد جنین‌ها نیز، جنین‌هایی که ظاهر طبیعی و چهار بلاستومر هم اندازه و سالم داشتند برای انجماد انتخاب شدند. روی هر کرایوتاپ۶-۵ نمونه قرار داده می‌شد. مدت زمان قرار گیری نمونه‌ها در محلول تعادلی به ترتیب برای تخمک‌ها و جنین‌ها ۸-۷ و ۵ دقیقه در نظر گرفته شد، تا اندازه و شکل طبیعی نمونه‌ها بازگردانده شود. ذخیره‌سازی انجمادی از نیتروژن مایع و به مدت ۵ روز استفاده شد. بعد از گرم کردن، نمونه‌هایی که به مرفولوژی طبیعی بازگشتند، به عنوان نمونه‌های زنده در نظر گرفته شده و به محیط کشت منتقل و انکوبه شدند.

برای باروری تخمک‌ها از اسپرم موش‌های نر ۱۴-۱۲ هفته‌ای از نژاد C57Bl/6J و به روشی که قبلاً منتشر شده است، استفاده شد(۱۶). برای لقاح تخمک با کمی تغییر از روش بالابان و همکاران[1](۲۰۰۳) و بعد از ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون استفاده شد(۱۸و۱۷). در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محلی دور از جسم قطبی، حدود ۱۵-۱۰ درصد از پرده شفاف تخمک‌های منجمد شده که دارای سیتوپلاسم شفاف، غشای سلولی و پرده شفاف یکپارچه، فضای اطراف زرده ای طبیعی و جسم قطبی دوم بودند به وسیله نیدل بریده می‌شد. اسپرمی با مرفولوژی و تحرک طبیعی را انتخاب کرده و پس از جدا کردن سر، به داخل تخمک تزریق شد. بعد از چهار بار شستشو در محیط هایپرمدیوم ۴ درصد غنی شده با آلبومین سرم گاوی، در دیش‌های ۶۰ میلی‌متری و در قطره های ۲۰ میکرولیتری و تحت روغن مینرال تخمک‌های بارور شده کشت داده می‌شدند. مدت ۶ ساعت بعد از تزریق، تخمک‌هایی را که دارای دو جسم قطبی بودند، بارور شده فرض کرده و تخمک‌های دژنره حذف شدند. مدت ۲۴ ساعت بعد از تزریق تعداد جنین‌های دو

1-Balaban et al

Archive of SID

www.SID.ir

سلولی با ظاهر طبیعی و بلاستومرهای هم اندازه و سالم محاسبه و ثبت شدند.

جنین‌های منجمد شده که دارای بلاستومرهای طبیعی و پرده شفاف یکپارچه بودند قطره‌های ۲۰ میکرولیتری از محیط هایپر مدیوم ۴ درصد غنی شده با آلبومین سرم گاوی، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۶ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده می‌شدند. روند تکامل جنین‌ها با میکروسکوپ معکوس هر ۲۴ تا ۱۲۰ ساعت پس از کشت دادن ثبت کرده و در تخمین میزان تکوین بعدی شرکت داده شدند.

درصد تخمک‌های زنده مانده، درصد تشکیل جنین و تکامل آن تا مرحلهٔ دو سلولی پس از انجماد شیشه‌ای و درصد تکامل جنین‌های منجمد شده تا مرحلهٔ بلاستوسیست در گروه‌های مختلف در هر بار تکرار به دست آمد، سپس میانگین درصدهای فوق در هر آزمایش با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه[1] و ال‌اس‌دی[2] تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در مقایسه میزان بقاءی تخمک‌های گروه آزمون ۱ و۲ اختلاف معنی‌داری دیده نشد (p>۰/۰۵)، گرچه نتایج این گروه در مقایسه با دیگر گروه‌های آزمون بالاتر بود (p<۰/۰۰۱). مقایسه نتایج در گروه‌های آزمون ۳، ۴ و ۵ نشان داد که به تناسب کاهش غلظت ضدیخ‌ها میزان بقاءی تخمک‌ها کاهش معنی‌داری دارد(p<۰/۰۰۱). در مورد میزان باروری نتایج گروه‌های کنترل، آزمون ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری نداشتند(p<۰/۰۵)، اما میزان باروری گروه‌های آزمون ۱ و ۲ کمتر از نتایج گروه کنترل بود. این نتایج در مورد گروه آزمون ۳ به طرز چشمگیری کمتر از نتایج گروه‌های کنترل و آزمون ۱ و ۲ بود (p<۰/۰۰۱). هیچ کدام از تخمک‌های گروه ۴ بارور نشدند. مقایسه نتایج میزان تکامل تا دو سلولی نشان داد که بین گروه‌های کنترل، آزمون ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت(p>۰/۰۵)، اما نتایج گروه آزمون ۳ کمتر از گروه‌های کنترل و آزمون ۱ و۲ بود(p<۰/۰۰۱)(جدول ۱).

مقایسه نتایج میزان بقاءی جنین‌های چهار سلولی گروه آزمون ۱ نشان داد که بین نتایج این گروه و گروه‌های آزمون ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری وجود ندارد(p>۰/۰۵)، در حالی که نتایج این گروه از نتایج گروه‌های ۴ و ۵ بالاتر بود (p<۰/۰۰۱). جنین‌های گروه آزمون ۴ در مقایسه با گروه‌های ۱، ۲ و ۳ میزان بقاءی کمتری داشتند(p<۰/۰۰۱). اختلاف معنی‌داری میان میزان بقاءء گروه آزمون ۵ با دیگر گروه‌های آزمون وجود داشت(p<۰/۰۰۱). نتایج میزان تکامل جنین‌ها تا مرحله ۸ سلولی در گروه‌های آزمون ۱ و ۲ با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت(p>۰/۰۵)، اگر چه میزان تکامل در گروه‌های آزمون ۱ و ۲ پایین‌تر از میزان تکامل گروه کنترل بود. نتایج در گروه آزمون ۳ به صورت معنی‌داری کمتر از

1-One Way ANOVA
2- Least significance difference (LSD)

Archive of SID

www.SID.ir

گروه کنترل و آزمون ۱ و۲ بود($p<0/05$). همین موضوع در مورد نتایج گروه آزمون ۴ نیز صادق بود، اما هیچ‌کدام از جنین‌های گروه آزمایشی ۵ به مرحله ۸ سلولی تکامل نیافتند. مقایسه نتایج میزان تکامل جنین‌ها تا مرحله مورولا نشان داد که این نتایج در گروه‌های آزمون۱، ۲ و ۳ کمتر از گروه کنترل بود هر چند که اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). این نتایج در مورد گروه آزمون ۴ به صورت معنی‌داری کمتر از گروه کنترل و آزمون ۱ بود($p<0/05$)، ولی اختلاف معنی‌داری با نتایج گروه‌های آزمون ۲ و ۳ نداشت($p<0/05$). مقایسه نتایج میزان تکامل جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست جوان نشان داد که نتایج تمام گروه‌های آزمون کمتر از گروه کنترل بود، هر چند که این اختلاف بین گروه‌های کنترل و آزمون ۱ و ۲ معنی‌دار نبود($p<0/05$). همین نتایج در گروه‌های آزمون ۳ و ۴ به صورت معنی‌داری کمتر از گروه‌های کنترل، آزمون ۱ و ۲ بود($p<0/001$). نتایج میزان تکامل جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست هچ شده در همه گروه‌ها کمتر از گروه کنترل بود، اما اختلاف بین گروه‌های کنترل و آزمون ۱، ۲ و ۳ معنی‌دار نبود($p>0/05$). نتایج تکامل جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست هچ شده در گروه آزمون ۴ به صورت معنی‌داری کمتر از گروه کنترل و گروه‌های آزمون دیگر بود(جدول۲).

جدول ۱: مقایسه میزان بقاء، باروری و تکامل تخمک های متافاز II بعد از انجماد شیشه‌ای با غلظت‌های متفاوت ضدیخ‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر / گروه	تعداد کل تخمک‌های منجمد شده	تعداد کل تخمک‌های بازیافت شده	تعداد تخمک‌های زنده مانده	تعداد تخمک‌های در معرض اسپرم واقع شده	تعداد تخمک‌های بارور شده	تعداد جنین‌های تکامل یافته تا دو سلولی
کنترل	*—	—	—	۱۳۸	۱۲۲	۱۱۵
آزمون۱	۱۰۶	۱۰۳	۹۷	۹۷	۸۴	۷۶
آزمون۲	۱۴۵	۱۴۱	۱۲۷	۱۲۷	۱۱۰	۹۷
آزمون۳	۱۴۰	۱۳۷	۹۸	۹۸	۳۷	۲۱
آزمون۴	۱۵۷	۱۵۱	۳۳	۳۳	۰	۰
آزمون۵	۱۸۷	۱۸۶	۰	۰	۰	۰

*نمونه های گروه کنترل منجمد نشده اند.

جدول ۲: مقایسه میزان تکامل جنین چهار سلولی بعد از انجماد شیشه ای با غلظت‌های متفاوت ضدیخ‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر / گروه	تعداد کل جنین‌های منجمد شده	تعداد کل جنینهای بازیافت شده	تعداد جنین‌های زنده مانده	تعداد جنین‌های کشت شده	تعداد جنین‌های تکامل یافته تا ۸ سلولی	تعداد جنین‌های تکامل یافته تا مورولا	تعداد جنین‌های تکامل یافته تا بلاستوسیست جوان	تعداد جنین‌های تکامل یافته تا بلاستوسیست هچینگ/هچ شده
کنترل	*—	—	—	۱۴۱	۱۳۵	۱۲۸	۱۲۶	۱۱۳
آزمون۱	۱۴۲	۱۴۱	۱۳۴	۱۳۴	۱۲۵	۱۱۸	۱۱۵	۹۵
آزمون۲	۱۴۷	۱۴۵	۱۳۵	۱۳۵	۱۲۵	۱۱۶	۱۱۲	۹۱
آزمون۳	۱۵۰	۱۴۸	۱۳۶	۱۳۶	۱۱۷	۱۰۸	۹۱	۷۴
آزمون۴	۲۴۲	۲۳۹	۱۲۴	۱۲۴	۸۵	۷۴	۳۱	۱۰
آزمون۵	۳۳۸	۳۳۳	۵۰	۵۰	۰	۰	۰	۰

*نمونه‌های گروه کنترل منجمد نشده اند.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

مطالعه‌های بسیاری بر روی انجماد شیشه‌ای تخمک و جنین موش سوری انجام شد، اما اکثر آنها از محلول انجمادی با غلظت ۱۵ درصد ضدیخ در پروتکل خود استفاده کرده‌اند(۴ـ۱). هدف این مطالعه ارزیابی میزان بقاء، باروری و تکامل تخمک و جنین پس از انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ و غلظت‌های اندک ضدیخ درمحلول انجمادی بود.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر میزان بقاء و تکامل تا مورولا و بلاستوسیست‌های هچ شده بین گروه آزمون ۳ جنین‌ها و گروه‌های کنترل و آزمون ۱ و ۲ تفاوت معنی‌داری دیده نشد. برخلاف تکامل طبیعی جنین‌ها تا ۸ سلولی که شاخصی برای تکامل طبیعی بعد از گرم کردن است، نتایج تکامل تا مرحله بلاستوسیست که نمایانگر آمادگی جنین برای ایجاد توده سلول داخلی است ضعیف بود. علت این موضوع ممکن است به غلظت کم ضدیخ و قابلیت اندک نفوذ آن به درون اندامک‌های حیاتی سلول مثل میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی و دوک میتوزی و حفاظت از آنها مربوط باشد که در مراحل پیشرفته‌تر تکاملی آشکار شده است(۲۱ـ۱۹).

تشکیل یخ داخل سلولی تحت تأثیر غلظت ضدیخ محلول انجمادی و سرعت انجماد و گرم کردن قرار می‌گیرد(۲۲). با ذکر اهمیت سرعت کاهش دما، به غلظت ضدیخ هم می‌توان اشاره کرد. در این مقوله به این جمله بسنده می‌شود که وقتی سرعت سرد کردن از میزان اپتیموم کمتر باشد به دلیل در معرض بودن طولانی مدت با شرایط هایپرتونیک، سلول می‌میرد و بالعکس اگر سرعت سرد کردن از میزان اپتیموم بیشتر باشد به دلیل تشکیل یخ داخل سلولی که بی‌شک کشنده است، سلول از بین می‌رود. میزان سرعت اپتیموم به مواردی از جمله؛ حجم سلول و سطح ناحیه، نفوذپذیری به آب و انرژی فعالیت آرینوس بستگی دارد. انرژی وابسته به دما است که برای سرعت واکنش‌های شیمیایی لازم است. دستیابی به میزان اپتیموم سرعت کاهش دما برای تخمک به دلیل کم بودن نسبت سطح به حجم سلول و برای جنین به دلیل وسیع بودن ناحیهٔ سطح و نفوذپذیری کم به آب مشکل است و این موضوع در بسیاری از آزمایش‌ها و تحقیقات مورد بحث می‌باشد(۲۳). مورد آخر اشاره‌ای است به این که با این نوع ترکیب ضدیخ‌ها و غلظت به کار رفته در گروه‌های آزمون ۴ و ۵ ، باید به آینده علم کرایوبیولوژی چشم داشت تا شاید ظرف انجمادی ابداع شود و سرعت اپتیموم سرد کردن ـ گرم کردن را بتوان افزون بر آنچه مبدعان کرایوتاپ ذکر می‌کنند، بالا برد.

بدون در نظر گرفتن تفاوت غلظت محلول تعادلی در گروه‌های آزمون تخمک ۴ و ۵، ارزیابی میزان بقاء، باروری و تکامل آنها احتمال برگشت تخمک‌ها به شرایط فیزیولوژیک و عملکرد طبیعی آنها را تأیید نمی‌کنند. گرچه هنوز علت دقیق آسیب‌های ناشی از ذخیره‌سازی انجمادی مشخص نشده است (۱۴)، ولی یافته‌های حاصل از مطالعات گوناگون، خصوصیات منحصر به فرد غشاء سلول تخمک،

Archive of SID

www.SID.ir

وجود گرانول‌های قشری، تشکیلات دوک تخمک درمرحلهٔ متافاز و سخت شدن پردهٔ شفاف و بارور شدن تخمک با اسپرم در زمان معین را مانعی در دستیابی به موفقیت کامل ذخیره‌سازی انجمادی تخمک می‌دانند(۲۷-۲۴ و۱۴). در این پژوهش، در تحلیل یافته‌های ضعیف‌تر بخش مطالعه بر روی تخمک در مقایسه با نتایج مطالعه بر روی جنین می‌توان به این نظریات علمی‌که بر گرفته از تحقیقات بی شمار است استناد کرد. به عنوان مثال برای توضیح بیشتر می‌توان به این نکته اشاره کرد که بعد از بارور شدن تخمک، هر چه تکامل جنین پیشرفت می‌کند، حجم بلاستومرها کمتر می‌شود، ولی ناحیه سطح افزایش می‌یابد. در مقایسه با تخمک این موضوع سبب نفوذ بیشتر ضدیخ در جنین می‌شود که از شانس تشکیل یخ داخل سلولی کم می‌کند. افزایش میزان بقاء پس از انجماد و تکامل بهتر از پیامدهای آن به شمار می‌آید (۱۱).

در تحقیق حاضر مقایسهٔ میزان زنده ماندن تخمک‌ها و جنین‌هایی که با غلظت ۷/۵ درصد ضدیخ به تعادل رسیدند با آنهایی که با غلظت ۳/۷۵ درصد به تعادل رسیدند، تأکیدی بر نقش حیاتی مرحله به تعادل رساندن سلول است. در این مرحله غلظت ضدیخ، طول زمان و دمای در معرض بودن سلول با ضدیخ حائز اهمیت است. هر مداخله‌ای که در وضعیت متعادل فیزیولوژیک سلول تغییری حتی ناپایدار و گذرا ایجاد کند، بالقوه می‌تواند برای سلول سمی باشد. تکنیک تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم که به عنوان تنها تکنیک غلبه کننده بر عدم باروری ناشی از سخت شدن پردهٔ شفاف پس از انجماد، معرفی می‌شود نیز، یکی از انواع این مداخلات محسوب می‌شود(۱)، چرا که در روند انجام تکنیک علاوه بر استرس مکانیکی مقدار کمی از اسپرم‌ها وارد تخمک می‌شود (۱۴). این موضوع می‌تواند دلیلی بر این یافته باشد که در گروه آزمون ۴ هیچ‌کدام از تخمک‌های زنده مانده پس از انجماد بارور نشدند. یافته‌های مطالعه حاضر این موضوع را تصدیق می‌کنند که جنین‌هایی که با محلول‌های انجمادی ۷/۵ درصد منجمد شدند، افزون بر آسیب‌های زود تأثیر ناشی از انجماد که قبلاً شرح آن رفت، به استناد نتیجهٔ تحقیقات توکر و لیبرمن[1](۲۰۰۷) آسیب‌هایی با تأثیرات بلند مدت نیز خواهند دید. گرچه هسته سلول پس از انجماد توان بازسازی مورفولوژیک خود را دارد، اما کیفیت تکامل بعدی جنین‌های منجمد شده در حد ایده‌آل نیست(۱۲). به جز نتایجی که به وسیله شرودر و همکاران[2](۱۹۹۰) منتشر شد، مبنی بر این که با موفقیت تخمک موش با روش انجماد آهسته و استفاده از ۱۰ درصد غلظت دی‌متیل‌سولفوکساید منجمد شده است(۲۸)، به نظر می‌آید در این پژوهش برای اولین بار با استفاده از کرایوتاپ محلول ۷/۵ و ۱۰ درصد به اضافه نیم مول سوکرز برای انجماد شیشه‌ای تخمک‌های متافاز II اقدام شده است.

1-Tucker & Libermann
2-Schroeder et al

Archive of SID

www.SID.ir

یافته‌های حاصل از ارزیابی قدرت تکامل این تصور را ایجاد کرده است که توان زیستی تخمک‌هایی که با ۱۰ درصد و جنین‌هایی که با ۷/۵ درصد غلظت ضدیخ انجماد شیشه‌ای می‌شوند کاهش پیدا می‌کند، اما الزاماً به حدی نیست که توان بارور شدن در تخمک یا تکامل بیشتر در جنین را از بین ببرد. بر این اساس می‌توان پیشنهاد کرد که محلول حاضر با غلظت کمتر از معمول را با برخی ترکیبات مثل؛ ثابت کننده‌های استکلت سلولی، پلیمرهای حذف کننده یخ و غلظت زیاد قند مخلوط نموده و یا برخی ترکیبات مثل یون‌های سدیم و کلسیم را از محلول حذف کرد(۳۴-۲۹). بدین ترتیب و با توجه به تأثیرات زمان، دما و غلظت ضدیخ در مرحله تعادل، می‌توان محلول‌های ساخته شده را با مؤلفه‌های مختلف و در مراحل تکاملی مختلف تخمک و جنین آزمایش کرد(۲۱). با وجود تحقیقات مختلف دربارهٔ تأثیر سلول‌های کومولوس بر زنده ماندن تخمک‌ها پس از انجماد، ارزیابی کردن قابلیت پروتکل جدید در انجماد تخمک همراه با سلول‌های کومولوس مفید خواهد بود(۳۷-۳۵ و ۲۹). علاوه بر این به دلیل استرس‌های مکانیکی که طی تکنیک تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم به تخمک وارد می‌شود، پیشنهاد می‌شود که سنجیدن کیفیت تخمک های منجمد شده با فعالیت پارتنوژنز انجام شود، چرا که روشی کم استرس تر از روش تزریق اسپرم است. این موارد به نوبهٔ خود می‌تواند به پیشرفت‌هایی در ذخیره‌سازی انجمادی تخمک و جنین منجر شود.

نتیجه‌گیری

در مجموع این مطالعه نشان داد که انجماد شیشه‌ای با استفاده از ظرف انجمادی کرایوتاپ به دلیل حداقل بودن حجم نمونه، سرد کردن و گرم کردن سریع را امکان‌پذیر می‌کند، به نحوی که با این وسیله، کاهش غلظت ضدیخ (دی متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول) که بیانگر افزایش میزان اطمینان از ذخیره‌سازی انجمادی است، تا ۱۲/۵ درصد برای انجماد شیشه‌ای تخمک و تا ۱۰ درصد برای انجماد شیشه‌ای جنین به جای ۱۵ درصد، قابل دسترسی است و می‌تواند گامی‌در جهت بهینه کردن پروتکل متداول به شمار آید.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی مصوب به وسیله وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی بود.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES:

1.Elder K, Dale B. In vitro fertilization. Second edition. United Kingdom: Cambridge university press; 2003; 45.
2.Ozmen B, Schultze-Mosgau A, Schopper B, Griesinger G, Diedrich K, Al-Hasani S. Ongoing pregnancy after revitrification of cleavage stage embryo. MEFSJ 2006; 11: 222-6.
3.Mandelbaum J, Anastasiou O, Levy R, Guerin JF, Larouziere V, Antoine JM. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. Obstet Gynecol 2004; 113S: S17-S23.
4.Tucker M, Morton P, Liebermann J. Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation?. Obstet Gynecol 2004; 113S: S24-S27.
5.Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. Theriogenology 2007; 67:73-80.
6.Hredzak R, Ostro A, Maracek I, Kacmarik J, Zdilova V, Vesela J. Influence of Slow-rate Freezing and Vitrification on Mouse Embryos. Acta vet Brno 2005; 74:23-7.
7.Morato R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. Cryobiology 2008; 57:137-41.
8.Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Nandi S. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. The Veterinary Journal 2009; 179: 287-91.
9.Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. Hum Reprod 2009; 1:1-8.
10.Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. Hum Reprod 2009; 1:1-8.
11.Dhali A, Anchamparuthy VM, Butler SP, Pearson RE, Mullarky IK, Gwazdauskas FC. Effect of droplet vitrification on development competence, actin cytoskeletal integrity and gene expression in in vitro cultured mouse embryos. Theriogenology 2009; 71: 1408-16.
12.Tucker MJ, Liebermann J. Vitrification in assisted reproduction: A user's manual and trouble shooting guide. First edition. United kingdom: Informa healthcare; 2007; 240-6.
13.Eroglu A, Lawitts JA, Toner M, Toth TL. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. Cryobiology 2003; 46:121-34.
14.Eroglu A, Bailey SE, Toner M, Toth TL. Successful Cryopreservation of Mouse Oocytes by Using Low Concentrations of Trehalose and Dimethylsulfoxide. Biol Reprod 2009; 80:70-8.
15.Kyono K, Nakajo Y, Kumagai S, Nishinaka C. Vitrifying and warming of oocytes using cryotop. In: Tucker MJ, Liebermann J. Vitrification in assisted reproduction: A user's manual and trouble shooting guide. United kingdom: Informa healthcare; 2007;153-61.
16.Soleimani R, Van der Elst J, Heytens E, Van den Broecke R, Gerris J, Dhont M, et al. Back muscle as a promising site for ovarian tissue transplantation, an animal model. Hum Reprod 2008; 23: 619-26.
17.Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A. A comparison of four different techniques of assisted hatching. Hum Reprod 2002; 17: 1239-43.
18.Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocyte 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: 2350-6.
19.Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, et al. Correlation of abnormal mitochondria distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. Tohoku J Exp Med 2006; 210:137-44.
20.Katkov II, Isachenko V, Isachenko E. Vitrifying in small quenched volumes with a minimal amount of, or without vitrificants: basic biophysics and thermodynamics. In: Tucker MJ, Liebermann J(editors). Vitrification in assisted reproduction: A user's manual and trouble shooting guide. United kingdom: Informa healthcare; 2007: 21-32.
21.Chen SU, Lien YR, Chao KH, HO HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing. *MCE* 2003; 202: 101-7.
22.Arav A, Yavin S. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. Theriogenology 2007; 67: 81-9.
23.Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-jaffe M, Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. Theriogenology 2007; 67:64-72.

Archive of SID

www.SID.ir

24.Amir A, Zvi R. Do chilling injury and heat stress share the same mechanism of injury in oocytes?. MCE 2008; 282:150-2.
25.Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. Reprod Biomed Online 2004; 9:152-163.
26.Zenzes MT, Bielecki R, casper RF, Leibo SP. Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. Fertil Stril 2001; 75: 769-77.
27.Stachecki JJ, Cohen J, Schimmel T, Willadson SM. Fetal development of mouse oocytes and zygotes cryopreserved in a nonconventional freezing medium. Cryobiology 2002; 44: 5-13.
28.Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE, Eppig JJ. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in itro. J Reprod Fertil 1990; 89: 43–50.
29.Zhang J, Nedambale TL, Yang M, Li J. Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): Effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. Ani Reprod Sci 2009; 110: 46-55.
30.Wang HY, Lu SS, Lun ZR. Glass transition behavior of the vitrification solutions containing propanediol, dimethyl sulfoxide and polyvinyl alcohol. Cryobiology 2009; 58:115-7.
31.Eroglu A, Toner M, Toth TL. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. Fertil Stril 2002; 77:152-8.
32.Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. Reprod Biomed Online 2004; 9:152-63.
33.Stachecki JJ, Cohen J, Willadsoen SM. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: The effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. Cryobiology 1998; 37:346-54.
34.Larman MK, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. Reproduction 2006; 131: 53-61.
35.Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. J Reprod Dev 2004; 50: 685-96.
36.VandeVoort CA, Shirley CR, Hill DL, Leibo SP. Effects of cryoprotectants and cryopreservation on germinal vesicle-stage cumulus-oocyte complexes of rhesus monkeys. Ferti Stril 2008; 90: 805-16.
37.Rupert-Lingham CJ, Paynter SJ, Godfrey J, Fuller BJ, Shaw RW. Developmental potential of murine germinal vesicle stage cumulus-oocyte complexes following exposure to dimethylsulphoxide or cryopreservation: Loss of membrane integrity of cumulus cells after thawing. Hum Reprod 2003; 18: 392-8.

Archive of SID

www.SID.ir

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Survival, Fertilization and Developmental Rates of Cryotop-Vitrified Oocyte and Embryo Using Low Concentrated Cryoprotectants

**Roozbehi A[1], Shahrivar T[2],Heidarian A[3], Almasi-turk S[4]*

[1]Cellular & Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj , Iran, [2] Department of Phisiololgy, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj , Iran, [3] Student Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj , Iran, [4]Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Boushehr University of Medical Sciences, Boushehr, Iran

Received: 19 Nov 2011 Accepted: 05 Apr 2012

Abstract

Background & Aim: The preserving embryos, the risk of multiple pregnancies, the existence of factors in stimulated uterine cycle, are important forces in perfecting embryo cryopreservation. The aim of current study was to assess Survival, Fertilization and Developmental Rates (SRs, FRs, DRs) of the mouse oocytes and embryos using cryotop and low concentrated cryoprotectants solutions.

Methods: Mouse C57BL/6 oocytes and embryos were collected. Oocytes SRs, FRs, DRs were recorded after cryotop-vitrification/ warming. As well as comparing fresh oocytes and embryos, the data obtained from experimental groups (exp.) applying 1.25, 1.0, and 0.75 Molar (M) CPAs were analyzed in comparison to those of exp. adopting 1.5 M CPAs (largely-used concentration of EthylenGlycol (EG) and Dimethylsulphoxide (DMSO)).

Results: The data of oocytes exposed to 1.25 M CPAs were in consistency with those exposed to 1.5 M and control group in terms of SR, FR and DR. As fewer concentrations were applied, the more decreased SRs, FRs and DRs were obtained from other experimental groups. The results of embryos were exposed to 1.25 M and 1.0 M was close to those vitrified with 1.5 M and fresh embryos. The results of 0.75 M concentrated CPAs solutions were significantly lower than those of control, 1.5 M and 1.0 M treated groups.

Conclusion: CPAs limited reduction to 1.25 M and 1.0 M instead of using 1.5 M, for oocyte and embryo cryotop-vitrification procedure may be a slight adjustment.

Key words: Cryotop, Embryo, Freezing, Oocyte, Vitrification

***Corresponding Author: Almasi-turk S**, Department of Anatomy., Faculty of Medicine, Boushehr University of Medical Sciences, Boushehr, Iran
Email: s.alamsi@bpums.ac.ir

Archive of SID

D.ir