Archive of SID

تأثیر نوع و غلظت ضدیخ‌های نفوذپذیر در روند انجماد شیشه‌ای بر قابلیت بقای بلاستوسیست گوسفندی تولیدشده در شرایط آزمایشگاهی

حسن نظری[۳،۱]، ابوالفضل شیرازی[۴،۳،۲*]، ابراهیم احمدی[۳،۱]، آزیتا افضلی[۵،۳]

۱. دکتری تخصصی فناوری تولیدمثل در دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا، تهران- ایران.
۳. پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۴. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۵. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد – ایران.

دریافت: ۷ اردیبهشت ماه ۹۴ **پذیرش:** ۱۷ مردادماه ۹۴

چکیده

این مطالعه به‌منظور بهینه‌سازی روش انجماد شیشه‌ای جنین‌های گوسفندی به عنوان مدلی در حیوانات اهلی در مرحله بلاستوسیست مطرح شد و تأثیر غلظت‌های متفاوت ضدیخ‌های نفوذپذیری چون اتیلن‌گلیکول (۳/۶، ۴/۵ و ۵/۴ مول به ازای هر لیتر) و گلیسرول (۲/۸، ۳/۴ و ۴/۲ مول به ازای هر لیتر) در محیط اصلی انجماد و نیز نوع ضد یخ به‌کار رفته به‌عنوان ضد یخ اصلی در محیط‌های تعدیل‌کننده مورد بررسی قرار گرفت. بلاستوسیست‌های گوسفندی تولید شده در شرایط آزمایشگاهی در روز ششم با استفاده از روش متداول در نی‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری مخصوص انجماد در دو گروه محیط‌های تعدیل‌کننده حاوی اتیلن‌گلیکول و محیط‌های تعدیل‌کننده حاوی گلیسرول به‌عنوان ضد یخ غالب، آبگیری شده و نمونه‌های هر گروه نیز به سه محیط انجماد حاوی ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد اتیلن گلیکول و گلیسرول منتقل شدند. پس از ذوب جنین‌های گروه‌های مختلف، میزان بقای بلاستوسیست‌ها پس از ۲۴ ساعت و میزان تفریخ پس از ۷۲ ساعت مورد ارزیابی و ثبت قرار گرفت. نتایج این مطالعه پس از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد باوجود نفوذپذیری بالاتر و سمیت پایین‌تر اتیلن گلیکول نسبت به سایر ضدیخ‌های نفوذپذیر، جنین‌های گوسفندی در مرحله بلاستوسیست پس از آبگیری در محیط‌های تعدیل‌کننده حاوی گلیسرول به‌عنوان ضدیخ غالب میزان بقا و رشد بهتری از خود نشان می‌دهند ($p<0/05$)؛ همچنین در زمان استفاده از غلظت متعادل ۲۵ درصد اتیلن‌گلیکول و گلیسرول در مقایسه با دو غلظت ۲۰ و ۳۰ درصد، میزان بقا و رشد بالاتری به‌دست می‌آید.

واژه‌های کلیدی: انجماد شیشه‌ای، گوسفند، بلاستوسیست، اتیلن‌گلیکول، گلیسرول.

مقدمه

امروزه محققان به دنبال روش‌های مناسبی برای نگه‌داری طولانی‌مدت گامت (سلول‌های جنسی) و جنین حیوانات هستند. ازجمله این روش‌ها انجماد اسپرم، تخمک، جنین و تخمدان است. با توجه به رشد فزاینده تولید جنین‌های آزمایشگاهی و محدودیت در انتقال سریع آن‌ها به حیوانات گیرنده، ضرورت نگه‌داری طولانی‌مدت این جنین‌ها به‌منظور استفاده در موقعیت‌های زمانی و مکانی مختلف بیشتر احساس می‌شود. برای نگه‌داری جنین و سایر سلول‌های زنده بدون کاهش میزان بقای آن‌ها، باید از دمایی پایین‌تر از دمای لازم به‌منظور انجماد که در حدود ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر است، استفاده کرد که در عمل نیتروژن مایع برای این امر کاربرد دارد (۶). امروزه از روش‌های مختلفی برای نگه‌داری جنین در سرما استفاده می‌شود و جنین بیش از ۲۰ گونه از پستانداران با موفقیت منجمد شده است (۱۱). از مطرح‌ترین روش‌ها در انجماد

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: a.shirazi@avicenna.ac.ir; shiraziabbas@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

جنین روش انجماد شیشه‌ای (Vitrification) است که در آن محققان تلاش می‌کنند با کاهش میزان تشکیل یخ داخل و خارج سلولی در هنگام انجماد و ذوب، قدرت حیاتی تخمک و یا جنین را افزایش دهند. بدین منظور می‌باید قدرت نفوذ انواع ضد یخ به جنین، حساسیت نسبت به سمیت ضدیخ‌ها و میزان تحمل سلول‌های جنینی در برابر شوک‌های اسمزی را مشخص کرد. به‌طورکلی می‌توان گفت فرایند انجماد شیشه‌ای موفق بر دو اصل سرعت انجماد و ذوب و غلظت ضد یخ استوار است (۱۱ و ۱۸).

ضدیخ‌های استفاده شده برای انجماد جنین غالباً اتیلن گلیکول، گلیسرول، دی‌متیل‌سولفوکسید و یا پروپیلن‌گلیکول هستند (۱۸). مکانیسم محافظتی این ترکیبات نفوذپذیر تقریباً یکسان است؛ اما سمیت متفاوتی دارند. برای انجماد آهسته، غلظت ضد یخ به ۱ تا ۲ مول محدود می‌شود؛ اما در انجماد شیشه‌ای این مقدار تا ۵ مول نیز افزایش می‌یابد (۲۰)؛ بنابراین انتخاب یک ضد یخ با سمیت پایین اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. گفته می‌شود که اتیلن‌گلیکول و گلیسرول سمیت کمتری در مقایسه با پروپیلن‌گلیکول و استامید دارند (۹). درمجموع برای کاهش سمیت ضدیخ‌ها، به کار بردن ترکیبی از دو ضد یخ و یا در معرض گذاشتن چندمرحله‌ای نمونه در محلول‌های غلیظ شده قبل از انجماد (۲۷)، از روش‌های موفق بوده است. سمیت و تأثیرات اسمزی ضدیخ‌ها با کاهش غلظت مورد نیاز آن‌ها تا حدی که باعث تشکیل نشدن کریستال‌های یخ شود؛ کاهش می‌یابد. بیش از همه این موارد افزایش سرعت انجماد و ذوب امکان کاهش غلظت ضد یخ مورد نیاز و درنتیجه سمیت آن‌ها را میسر می‌سازد. به‌طورکلی می‌توان استفاده از پلیمرهای نفوذ ناپذیر، استفاده از ترکیبی از دو ضد یخ، در معرض قرار دادن چندمرحله‌ای نمونه و افزایش سرعت انجماد و ذوب را ازجمله روش‌های عملی در کاهش میزان سمیت ضدیخ‌ها دانست (۱۰ و ۲۷).

با توجه به کاربرد فراگیر روش انجماد شیشه‌ای و قابلیت بقای بالای جنین‌های گوسفند در مراحل مختلف جنینی، بررسی بیشتر این فن‌آوری نوین زیستی با توجه به‌تازگی و کاربرد فراوان آن اهمیت ویژه‌ای دارد که خود می‌تواند گامی مثبت در انجام تحقیقات مرتبط با افزایش کیفی شرایط محیط انجماد باشد.

مواد و روش کار

به‌منظور تولید آزمایشگاهی جنین گوسفند، تخمدان‌ها از کشتارگاه شهرستان نجف‌آباد، با استفاده از فلاسک‌های حاوی سرم فیزیولوژی ۳۷-۳۰ درجه سانتی‌گراد حاوی ۲۰۰ IU/ml پنی‌سیلین و ۰/۲ mg/ml استرپتومایسین به آزمایشگاه جنین‌شناسی پژوهشکده فناوری جنین دام دانشگاه شهرکرد ارسال شدند. در آزمایشگاه پس از حذف بافت‌های زائد و شستشوی تخمدان‌ها، فولیکول‌های ۵-۲ میلی‌متری آسپیره شدند؛ سپس تخمک‌های مناسب با حداقل سه لایه سلول کومولوس متراکم و سیتوپلاسم گرانولهٔ یک‌نواخت استحصال و به محیط بلوغ B-TCM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۰/۰۲ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر سیستئامین و ۰/۱ واحد به ازای هر میلی‌لیتر هورمون محرک فولیکولی (FSH)، ۱ واحد به ازای هر میلی‌لیتر گنادوتورپین جفتی انسانی (hCG) و یک میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر استرادیول منتقل شدند و در انکوباتور ۹ درصد CO۲، با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و رطوبت حداکثر برای مدت ۲۴-۲۲ ساعت به‌منظور انجام روند بلوغ قرار گرفتند. تخمک‌های بالغ شده به محیط لقاح IVF-SOF حاوی ۲۰ درصد سرم گوسفندی، به مدت ۲۴-۲۲ ساعت به‌منظور انجام روند لقاح، با اسپرم مجاور شدند. کشت جنین در این تحقیق به روش هم‌کشتی با سلول‌های اویداکتی در محیط کشت IVC-SOF حاوی اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری و ۸ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی عاری از اسیدهای چرب (BSA-FAF) و در انکوباتور ۹ درصد CO۲، با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و رطوبت حداکثر انجام شد.

به‌منظور انجماد جنین‌های گوسفندی، از روش انجماد

www.SID.ir

Archive of SID

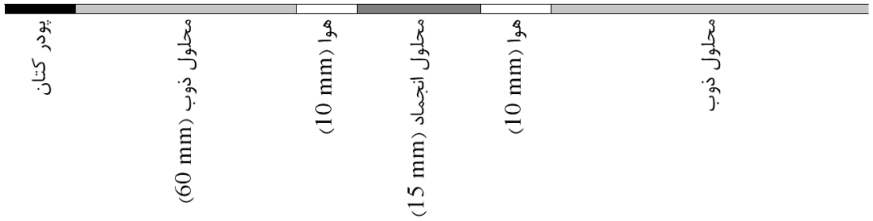
شیشه‌ای به‌کار رفته در مطالعات گذشته (۱۳) با استفاده از نی انجماد و بهره‌گیری از دو ضد یخ و دو محیط تعدیل‌کننده که به ترتیب غلظت ضد یخ در آن‌ها افزایش می‌یافت، استفاده شد و به‌منظور بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت ضدیخ‌های نفوذپذیر، اتیلن گلیکول و گلیسرول در چند غلظت مختلف به کار گرفته شد که جنین‌ها در گروه‌های مورد مطالعه (جدول ۱) در مجاورت محیط‌های حاوی ضدیخ‌ها قرار گرفتند.

یادآور می‌شود محیط پایه در تولید محیط‌های انجماد محیط PB۱ (PBS حاوی ۳/۳ میلی‌مول گلوکز، ۰/۳۳ میلی مول سدیم پیرووات، ۱۰۰ واحد بین‌المللی به ازای هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۲۰ درصد FCS) بود.

به‌منظور انجام روند انجماد شیشه‌ای، ابتدا نی‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری (IMV, Aigle, France) مطابق شکل ۱ با محیط‌های مورد نظر پر و تا زمان استفاده به‌صورت افقی، لبه میز کار قرار داده شد؛ سپس در کف یک پتری‌دیش استریل از محیط‌های PB۱، محیط تعدیل‌کننده اول (حاوی ۱/۴ مول گلیسرول) و تعدیل‌کننده دوم (حاوی

جدول ۱- گروه‌های مورد مطالعه بر اساس میزان ضد یخ نفوذپذیر به‌کاررفته در محیط‌های انجماد

گروه‌ها	محیط تعدیل‌کننده اول		محیط تعدیل‌کننده دوم		محیط اصلی انجماد	
	غلظت اتیلن گلیکول Mol/L(درصد)	غلظت گلیسرول Mol/L(درصد)	غلظت اتیلن گلیکول Mol/L(درصد)	غلظت گلیسرول Mol/L(درصد)	غلظت اتیلن گلیکول Mol/L(درصد)	غلظت گلیسرول Mol/L(درصد)
گروه اول	۱/۸(۱۰)	-	۳/۶ (۲۰)	۱/۴ (۱۰)	۳/۶(۲۰)	۲/۸ (۲۰)
گروه دوم	۱/۸ (۱۰)	-	۳/۶ (۲۰)	۱/۴ (۱۰)	۴/۵ (۲۵)	۳/۴ (۲۵)
گروه سوم	۱/۸ (۱۰)	-	۳/۶ (۲۰)	۱/۴ (۱۰)	۵/۴ (۳۰)	۴/۲ (۳۰)
گروه چهارم	-	۱/۴ (۱۰)	۱/۸ (۱۰)	۲/۸ (۲۰)	۳/۶ (۲۰)	۲/۸ (۲۰)
گروه پنجم	-	۱/۴ (۱۰)	۱/۸ (۱۰)	۲/۸ (۲۰)	۴/۵ (۲۵)	۳/۴ (۲۵)
گروه ششم	-	۱/۴ (۱۰)	۱/۸ (۱۰)	۲/۸ (۲۰)	۵/۴ (۳۰)	۴/۲ (۳۰)



شکل ۱- نحوه پر کردن نی مخصوص انجماد جنین

۱/۴ مول گلیسرول و ۳/۶ مول اتیلن گلیکول) قطرات ۲۰۰ میکرولیتری قرار داده شد. جنین‌های گوسفندی ۶ روزه در مرحله بلاستوسیست متسع، پس از آبگیری در محیط تعدیل‌کننده اول، برای مدت زمان ۵ دقیقه و محیط تعدیل‌کننده دوم برای همین مدت زمان (۵ دقیقه)، به ستون ۱۵ میلی‌متری محیط انجماد درون نی که از پیش به‌صورت نشان داده شده در شکل ۱ پر شده بود، منتقل شدند و در پایان و پس از مسدود کردن انتهای نی با خمیر هماتوکریت، نی انجماد حاوی جنین‌ها مستقیماً وارد نیتروژن مایع شد.

به‌منظور انجام روند ذوب جنین‌ها، نی از نیتروژن مایع خارج و برای مدت ۱۰ ثانیه در هوا و سپس برای مدت ۸

www.SID.ir

Archive of SID

ثانیه در آب ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. پس از خروج محتویات نی، جنین‌ها به ترتیب در محیط‌های ذوب حاوی ۱، ۰/۵ و ۰ مول سوکروز هرکدام به مدت ۵ دقیقه آبدهی و نهایتاً به‌منظور ادامه حیات، به قطره کشت انتقال و در انکوباتور قرار داده شدند.

متداول‌ترین روش ارزیابی توان زیستی جنین پس از ذوب در آزمایشگاه، یک دوره کشت مجدد است. در این مطالعه جنین‌ها پس از ذوب به‌منظور سنجش قابلیت بقای خود برای مدت زمان ۷۲-۴۸ ساعت در انکوباتور ۹ درصد CO_2، با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و رطوبت حداکثر در محیط کشت قرار گرفتند. تعداد جنین‌هایی که مجدداً متسع شده و برای مدت زمان حداقل ۲۴ ساعت این وضعیت را حفظ کرده یا به مرحله تفریخ رسیدند، به‌عنوان داده‌های این مطالعه ثبت شدند و در پایان اختلافات مشاهده شده بین گروه‌های تحت بررسی، با نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ مورد آزمون One Way ANOVA قرار گرفتند. در صورت $p<0/05$، اختلاف بین گروه‌های تحت بررسی از نظر آماری معنی‌دار محسوب می‌شد.

نتایج

آنچه در این مطالعه حائز اهمیت بود تأثیر نوع و غلظت دو ضد یخ نفوذپذیر پرکاربرد یعنی؛ اتیلن‌گلیکول و گلیسرول در فرایند انجماد جنین‌های مراحل قبل از لانه‌گزینی حیوانات مزرعه‌ای بود که به شکل تأثیر نوع ضد یخ به‌کار رفته در محیط‌های تعدیل‌کننده به‌منظور آبگیری از بلاستوسیست‌های متسع گوسفندی و غلظت‌های ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصدی این دو ضد یخ در محیط اصلی انجماد مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۲ آمده است.

نتایج نشان می‌دهد که نوع و غلظت ضد یخ به‌کاررفته در فرایند انجماد بلاستوسیست‌های گوسفندی، میزان بقای بعد از ذوب آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ به‌ویژه نوع ضد یخ که به‌صورت ضد یخ غالب در مرحله آبگیری جنین‌ها در محیط‌های تعدیل‌کننده به کار گرفته‌شده است؛ به‌طوری‌که در زمان استفاده از گلیسرول به میزان ۱۰ درصد در محیط تعدیل‌کننده اول و ۲۰ درصد در محیط تعدیل‌کننده دوم میزان بقای بالاتری به‌دست می‌آید. این اختلاف زمانی هم که ضدیخ‌های محیط انجماد در غلظت‌های متفاوت به‌کار رفته‌اند دیده می‌شود؛ تا جایی که میزان بقا و رشد در زمان استفاده از غلظت متعادل ۲۵ درصد اتیلن گلیکول و گلیسرول در مقایسه با دو غلظت ۲۰ و ۳۰ درصد، بالاتر است. شکل ۲ وضعیت بلاستوسیست گوسفند را بعد از فرایند ذوب از مرحله آبدهی تا تفریخ در گروه پنجم به‌عنوان بهترین گروه، نشان می‌دهد.

بحث

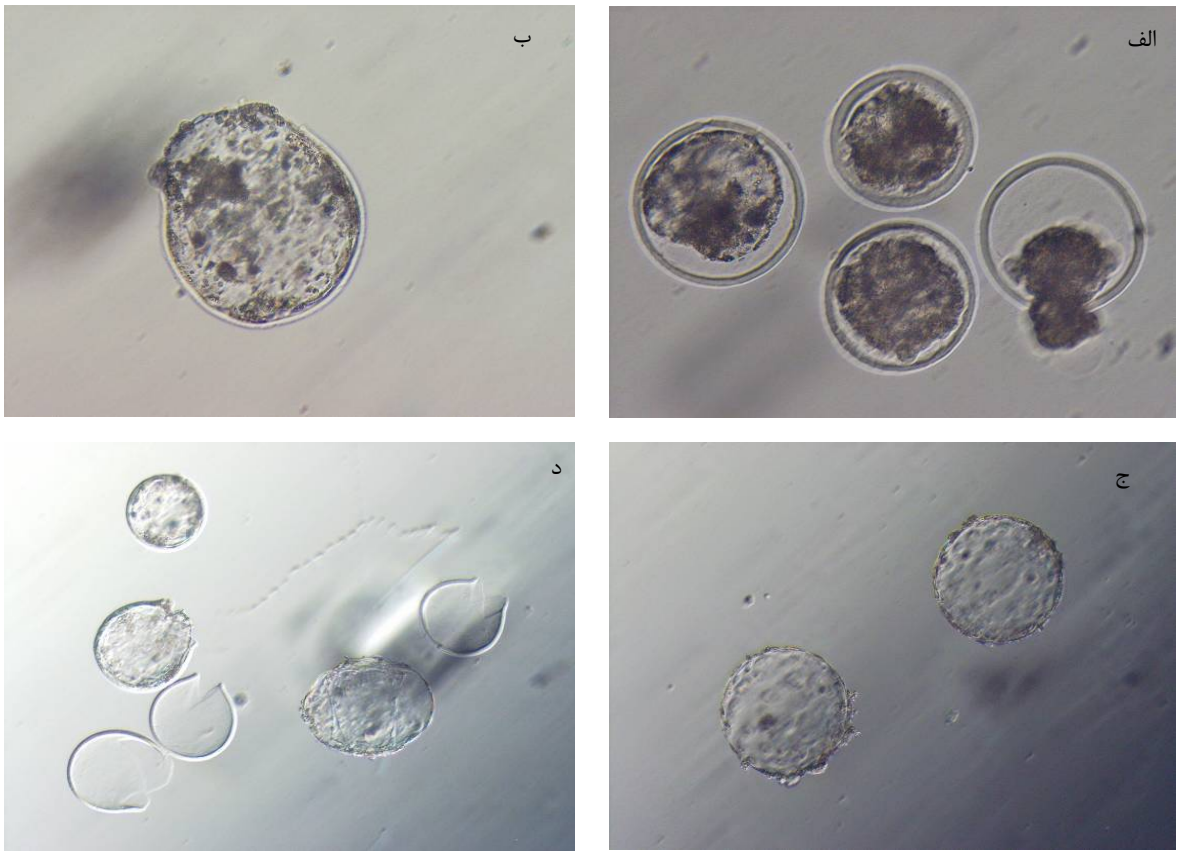
جدول ۲- میزان بقا و تفریخ بلاستوسیست‌های متسع گوسفندی بعد از فرایند انجماد شیشه‌ای و ذوب

گروه ها		تعداد	میزان بقا	میزان تفریخ
محیط تعدیل‌کننده	محیط انجماد	بلاستوسیست	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
اتیلن‌گلیکول	۲۰ درصد اتیلن‌گلیکول +۲۰ درصد گلیسرول	۲۷	۱۴ (۵۱/۸۵)^{a}	۷ (۲۵/۹۳)
	۲۵ درصد اتیلن‌گلیکول +۲۵ درصد گلیسرول	۳۳	۲۲ (۶۶/۶۷)^{a}	۹ (۲۷/۲۷)
	۳۰ درصد اتیلن‌گلیکول +۳۰ درصد گلیسرول	۳۱	۱۹ (۶۱/۲۹)^{ab}	۷ (۲۲/۵۸)
گلیسرول	۲۰ درصد اتیلن‌گلیکول +۲۰ درصد گلیسرول	۲۶	۱۸ (۶۹/۲۳)^{ab}	۱۰(۳۸/۴۳)
	۲۵ درصد اتیلن‌گلیکول +۲۵ درصد گلیسرول	۳۶	۲۹ (۸۰/۵۶)^{b}	۲۰ (۵۵/۵۶)
	۳۰ درصد اتیلن‌گلیکول +۳۰ درصد گلیسرول	۲۸	۲۰ (۷۱/۴۳)^{ab}	۱۴ (۵۰/۰۰)

^{a,b,c}حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست ($p<0/05$).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- بلاستوسیست گوسفندی بعد از فرایند ذوب از مرحله آبدهی تا تفریخ در گروه پنجم. الف) ۱۰-۵ دقیقه بعد از ذوب؛ ب) ۲۴ ساعت بعد از ذوب؛ ج) ۴۸ ساعت بعد از ذوب؛ د) ۷۲ ساعت بعد از ذوب.

تاکنون غلظت‌های متفاوت ضدیخ‌هایی نظیر دی‌متیل‌سولفوکسید، اتیلن‌گلیکول، پروپیلن‌گلیکول و گلیسرول در ترکیبات متفاوت برای انجماد تخمک و جنین پستانداران مورد استفاده قرار گرفته است (۱۸). ضدیخ‌ها با حضور در محلول‌های انجمادی تأثیرات خود را با پایین آوردن جزئی نقطه انجماد، کاهش اثر سمی سایر ترکیبات محلول بااتصال به مولکول‌های آب (ویژگی انعقادی؛ Colligative properties)، عدم تشکیل کریستال یخ داخل و خارج سلولی و محافظت از نمونه با افزایش سطح نمک (این ویژگی را با عنوان Salt buffering می‌شناسند) اعمال می‌کنند (۳).

در برزیل Visintin و همکاران در سال ۲۰۰۲ مطالعاتی فراساختاری را بر روی جنین‌های تولیدشده در شرایط In vivo (مورولای متراکم - بلاستوسیست اولیه) تشریح کردند. در این مطالعه نشان دادند که اتیلن‌گلیکول یک ماده غیر سمی برای انجماد سریع چنین جنین‌هایی است (۲۵). در گوسفند، محققان متوجه شدند که اتیلن‌گلیکول از غشا و ساختارهای سیتوپلاسمی سلول‌های جنینی در برابر آسیب‌های حاصل از انجماد بهتر از گلیسرول محافظت می‌کند. آن‌ها توضیح دادند که نبود موفقیت در مورد جنین‌های منجمد - ذوب‌شده گوسفند را می‌توان به نبود محافظت از توده سلولی داخلی نسبت داد (۲). زمانی که سلول‌ها برای اولین بار در معرض محلول‌های مولتی‌مولار نظیر ضدیخ‌ها قرار می‌گیرند به خاطر از دست دادن آب خود منقبض و فشرده می‌شوند. در زمان نفوذ ضد یخ به داخل سلول، آب سلولی خارج می‌شود تا سلول به حجم ایزوتونیک اولیه خود باز گردد. ضدیخ‌ها میزان انتشار متفاوتی به داخل سلول دارند. به‌عنوان مثال میزان انتشار پروپیلن‌گلیکول (۷-۵ دقیقه) به درون تخمک در مقایسه با میزان انتشار دی‌متیل‌سولفوکسید (۳۰-۲۰ دقیقه) و یا

www.SID.ir

Archive of SID

گلیسرول (بیش از ۶۰ دقیقه)، نسبتاً سریع‌تر است (۸ و ۱۹).

اختلاف گونه‌ای در مورد خصوصیت نفوذپذیری ضدیخ‌های نفوذپذیر وجود دارد. به‌عنوان مثال جنین گاو نفوذپذیری بیشتری را نسبت به گلیسرول در مقایسه با دی‌متیل‌سولفوکسید ضدیخی که در اوایل دهه ۱۹۷۰ در جریان تولید فروستی ۲ به کار رفت، نشان می‌دهد (۲۶). در اواخر همین دهه گلیسرول به‌عنوان ضد یخ متداول برای انجماد جنین در مراحل مورولای متراکم و بلاستوسیست کاربرد پیدا کرد و در دهه‌های اخیر اتیلن‌گلیکول به‌عنوان مطلوب‌ترین ضد یخ به علت بالاترین میزان نفوذپذیری (۱) و کمترین سمیت (۱، ۴ و ۱۵) جایگزین ضدیخ‌های قبلی شد.

مطابق با مطالعات Isachenko و همکاران در سال ۱۹۹۷ یک ضد یخ با نفوذپذیری پایین‌تر نظیر گلیسرول یک عمل‌کرد حمایتی بر روی غشای سیتوپلاسمی‌دارد (۷) و در مقابل یک ضد یخ با نفوذپذیری بالاتر نظیر اتیلن‌گلیکول از تمامی غشاهای ساختارهای داخل سلولی مثل لیزوزوم‌ها حفاظت می‌کند. زمانی که آسیبی در لیزوزوم در طول روند انجماد رخ می‌دهد آنزیم‌های لایتیک آزاد می‌شود که سبب تأثیرات منفی بر روی ساختارهای سلولی و صدمه بلاستومرها می‌گردد.

Valdez و همکاران کاهش شدیدی در میزان بقای بلاستوسیست های موشی در زمان مواجهه آن‌ها برای مدت زمان ۱۰ دقیقه با ۴۰ درصد (۷/۲ مول به ازای هر لیتر) اتیلن گلیکول گزارش کردند (۲۴). این محققان فهمیدند که هرچند اتیلن گلیکول می‌تواند کمترین اثر سمّی در مقایسه با پروپیلن گلیکول در غلظت ۲۰ تا ۴۰ درصد داشته باشد لیکن افزایش غلظت ضد یخ و میزان مواجهه نمونه با آن می‌تواند بر میزان بقای بعد از ذوب جنین، تأثیر سوء داشته باشد (۲۴).

در مطالعه‌ای که Mahmoud و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی تخمک بوفالو انجام دادند؛ بیشترین میزان بلوغ، بعد از قرار دادن تخمک در محیط انجماد حاوی اتیلن‌گلیکول و ترکیب اتیلن‌گلیکول و دی متیل سولفوکسید به دست آورده و معتقد است غلظت بالای ضد یخ باعث آسیب سلولی به دلیل آسیب‌های اسمزی و سمیت سلولی می‌گردد و نیز بیان می‌دارد گلیسرول احتمالاً به دلیل نفوذپذیری پایین و زمان بالای مجاورت آن با نمونه می‌تواند مضر باشد (۱۴).

ضدیخ‌ها علی‌رغم خاصیت محافظتی در طول فرایند انجماد ممکن است به علت سمیّت ناشی از غلظت، طول مدت زمان و دما -گفته می‌شود سمیت ضدیخ‌هایی نظیر اتیلن گلیکول و گلیسرول با دمای اتاق ارتباط مستقیمی دارد- تأثیر مضری بر جنین داشته باشند (۵)؛ هرچند فاکتورهای درون‌سلولی نظیر حضور محتویات بالای چربی داخل سلولی نیز یکی از فاکتورهای پاسخگو در قبال میزان بقای پایین به علت آسیب‌های حاصل از برودت است (۱۲).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ بر روی جنین‌های گاوی تولیدشده در شرایط آزمایشگاهی و نیز شبیه‌سازی‌شده انجام شد؛ نشان داده شده است که محیط حاوی ۴۰ درصد گلیسرول در مقایسه با محیط‌های حاوی ۱۰ درصد اتیلن گلیکول، ۳۰ درصد گلیسرول و نیز ۲۰ درصد اتیلن گلیکول، ۲۰ درصد گلیسرول، محیط بهتری برای انجماد جنین بوده است و نیز عنوان شده است که گلیسرول ضد یخ مناسب‌تری برای انجماد جنین در مراحل پیشرفته‌تر جنینی است (۲۳) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

استفاده از دو ضد یخ نفوذپذیر به‌جای تنها یک ضد یخ به علت کاهش غلظت هر یک از ضدیخ‌ها در محیط انجماد اقبال بیشتری داشته است؛ از این رو در خصوص جنین حیواناتی نظیر گوسفند و گاو که نفوذپذیری بیشتری در مقایسه با گلیسرول داشته‌اند؛ این امر خود باعث تأثیر خاصیت سمی آن بر جنین می‌شود (۲۱ و ۲۲)؛ ترکیب گلیسرول با اتیلن‌گلیکول نه تنها سبب کاهش اثرات سمی ضد یخ می‌شود که حتی آسیب‌های اسمزی بعد از ذوب را به دلیل خاصیت انتشار و خروج سریع اتیلن‌گلیکول

www.SID.ir

Archive of SID

کاهش می‌دهد (۲۳). می‌توان گفت اتیلن‌گلیکول به دلیل نفوذپذیری سریع، جنین را خصوصاً در مرحله بلاستوسیست متسع، که حجم مایع جنینی بسیار بالاست، با اعمال سمیت سلولی و آسیب‌های اسمزی بعد از ذوب تحت تأثیر قرار می‌دهد.

Nowshari در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۸ بر روی بلاستوسیست‌های موش به انجام رسانید، گزارش داد که جنین‌ها قابلیت بقای خود را پس از مواجهه کوتاه با غلظت بالای ضدیخ‌هایی نظیر اتیلن گلیکول و پروپیلن گلیکول (۷ مول به ازای هر لیتر) حفظ می‌کنند (۱۷) که این نتیجه قبلاً در مورد جنین‌های پرنوکلئار موشی به دست آمده بود (۱۶). مطالعه آن‌ها نشان می‌دهد که اتیلن‌گلیکول در مورد بلاستوسیست‌های متسع و در غلظت ۷ مول به ازای هر لیتر برای مدت زمان کوتاه ۴۵ ثانیه‌ای غیر سمی است؛ هرچند تأثیرات سمی اتیلن‌گلیکول در غلظت ۷/۲ مول به ازای هر لیتر در ترکیب با ۳۰ درصد فایکول و نیم مول سوکروز برای مدت زمان دو دقیقه تماس با محیط انجماد، در انجماد بلاستوسیست‌های موش گزارش شده است (۲۷).

به هرحال آنچه همانند یک تیغه دو لبه انجماد نمونه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، تشکیل کریستال‌های یخ داخل و خارج سلولی به دلیل نبود غلظت کافی ضد یخ و آبگیری ناقص نمونه از یک سو و سمیت ضدیخ‌ها به دلیل غلظت بیش از حدّ آن‌ها از یک سو و آسیب‌های اسمزی به علت انتشار سریع ضدیخ‌ها از سوی دیگر است که خود مبنای بهینه‌سازی روش انجماد برای رسیدن به نوع و غلظت مناسب ضد یخ در محیط‌های انجماد شده است.

از نتایج مطالعه حاضر چنین استنباط می‌شود که باوجود نفوذپذیری بالاتر و سمیت پایین‌تر اتیلن گلیکول نسبت به سایر ضدیخ‌های نفوذپذیر، جنین‌های گوسفندی در مرحله بلاستوسیست پس از آبگیری در محیط‌های تعدیل‌کننده حاوی گلیسرول به‌عنوان ضدیخ غالب، میزان بقا و رشد بهتری از خود نشان می‌دهند؛ همچنین در زمان استفاده از غلظت متعادل ۲۵ درصد اتیلن‌گلیکول و گلیسرول در مقایسه با دو غلظت ۲۰ و ۳۰ درصد، میزان بقا و رشد بالاتری به‌دست می‌آید.

منابع

1- Cha, K.Y.; Chung, H.M.; Lim, J.M.; Ko, J.J.; Han, S.Y.; Choi, D.H. and Yoon, T.K.; Freezing immature oocytes. Mol Cell Endocrinol; 2000; 169(1-2): 43-47.

2- Cocero, M.J.; Diaz de la Espina, S.M. and Aguilar, B.; Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants. Biol Reprod; 2002; 66(5): 1244-1258.

3- de Mola, J.R.L.; Principles and practice of assisted reproductive technology. Fertility and Sterility; 102(2): 610.

4- Dinnyes, A.; Dai, Y.; Jiang, S. and Yang, X.; High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. Biol Reprod; 2000; 63(2): 513-518.

5- Fahy, G.M.; Lilley, T.H.; Linsdell, H.; Douglas, M.S. and Meryman, H.T.; Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. Cryobiology; 1990; 27(3): 247-268.

6- Gardner, D.K.; Lane, M. and Watson, A.J.; A laboratory guide to the mammalian embryo. Oxford university press;

www.SID.ir

Archive of SID

Cryobiology; 2002; 45(3): 204-212.

14- Mahmoud, K.G.; Scholkamy, T.H.; Ahmed, Y.F.; Seidel, G.E., Jr. and Nawito, M.F.; Effect of different combinations of cryoprotectants on in vitro maturation of immature buffalo (Bubalus bubalis) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods. Reprod Domest Anim; 2010; 45(4): 565-571.

15- Martino, A.; Songsasen, N. and Leibo, S.P.; Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. Biol Reprod; 1996; 54(5): 1059-1069.

16- Nowshari, M.A.; Nayudu, P.L. and Hodges, J.K.; Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed pronuclear stage mouse embryos. Hum Reprod; 1995; 10(12): 3237-3242.

17- Nowshari, M.A. and Brem, G.; Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of expanded mouse blastocysts frozen by a simple rapid-freezing procedure. Theriogenology; 1998; 50(7): 1001-1013.

18- Palasz, A.T. and Mapletoft, R.J.; Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. Biotechnol Adv; 1996; 14(2): 127-149.

19- Renard, J.P. and Babinet, C.; High

2004.

7- Isachenko, V.V.; Isachenko, E.F.; Ostashko, F.I. and Grishchenko, V.I.; Ultrarapid freezing of rat embryos with rapid dilution of permeable cryoprotectants. Cryobiology; 1997; 34(2): 157-164.

8- Jackowski, S.; Leibo, S.P. and Mazur, P.; Glycerol permeabilities of fertilized and infertilized mouse ova. J Exp Zool; 1980; 212(3): 329-341.

9- Kasai, M.; Niwa, K. and Iritani, A.; Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. J Reprod Fertil; 1981; 63(1): 175-180.

10- Kasai, M.; Cryopreservation of mammalian embryos. Mol Biotechnol; 1997; 7(2): 173-179.

11- Kasai, M. and Mukaida, T.; Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. Reprod Biomed Online; 2004; 9(2): 164-170.

12- Ledda, S.; Leoni, G.; Bogliolo, L. and Naitana, S.; Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. Theriogenology; 2001; 55(6): 1359-1371.

13- Leoni, G.; Bogliolo, L.; Berlinguer, F.; Rosati, I.; Pintus, P.P.; Ledda, S. and Naitana, S.; Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos.

www.SID.ir

Archive of SID

1990; 33(3): 627-636.

25- Visintin, J.A.; Martins, J.F.; Bevilacqua, E.M.; Mello, M.R.; Nicacio, A.C. and Assumpcao, M.E.; Cryopreservation of Bos taurus vs Bos indicus embryos: are they really different? Theriogenology; 2002; 57(1): 345-359.

26- Wilmut, I. and Rowson, L.E.; The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos. J Reprod Fertil; 1973; 33(2): 352-353.

27- Zhu, S.E.; Kasai, M.; Otoge, H.; Sakurai, T. and Machida, T.; Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. J Reprod Fertil; 1993; 98(1): 139-145.

survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. J Exp Zool; 1984; 230(3): 443-448.

20- Saragusty, J. and Arav, A.; Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. Reproduction; 2011; 141(1): 1-19.

21- Szell, A.; Shelton, J.N. and Szell, K.; Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. Cryobiology; 1989; 26(3): 297-301.

22- Tachikawa, S.; Otoi, T.; Kondo, S.; Machida, T. and Kasai, M.; Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. Mol Reprod Dev; 1993; 34(3): 266-271.

23- Taniguchi, M.; Ikeda, A.; Arikawa, E.; Wongsrikeao, P.; Agung, B.; Naoi, H.; Nagai, T. and Otoi, T.; Effect of cryoprotectant composition on in vitro viability of in vitro fertilized and cloned bovine embryos following vitrification and in-straw dilution. J Reprod Dev; 2007; 53(4): 963-969.

24- Valdez, C.A.; Abas Mazni, O.; Takahashi, Y.; Hishinuma, M. and Kanagawa, H.; Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Theriogenology;

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of type and concentration of the permeable cryoprotectants on the viability of vitrified-warmed ovine blastocysts produced *in vitro*

Nazari, H.[1,3]; Shirazi, A.[2,3,4*]; Ahmadi, E.[1,3]; Afzali, A.[3,5]

1. PhD., Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.
2. Professor, Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran-Iran.
3. Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.
4. Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.
5. MsC. graduated of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.

Recieved: 26 April 2015 ***Accepted:*** 7 August 2015

Summary

This study was designed to optimize the vitrification of ovine embryos and achieve the highest survival rates after freezing-thawing pre-implantation embryos, in this species. Therefore the effect of different concentrations of permeable cryoprotectants such as ethylene glycol (3.6, 4.5 and 5.4 mmol per liter) and glycerol (2.8, 3.4 and 4.2 mmol per liter) in the vitrification medium and the type of cryoprotectant used in equilibration media were studied. In conventional vitrification method in 0.25 ml straws, ovine in vitro produced blastocysts on day 6 were equilibrated in equilibration media containing ethylene glycol or glycerol and then the embryos of each group were transferred to the vitrification solution containing 20, 25 or 30% ethylene glycol and glycerol. Blastocysts survival and hatching rate were recorded after 24 and 72 hours, respectively, after thawing of embryos in each group. In spite of higher permeability and lower toxicity of ethylene glycol compared with other cryoprotectants, a trend of higher survival and developmental rate was obtained in vitrified/warmed blastocysts that equilibrated in medium containing glycerol ($p<0.05$). Moreover, higher survival and developmental rate can be achieved when vitrification medium containing 25% ethylene glycol and glycerol were used compared with 20 and 30% concentrations of these cryoprotectants ($p<0.05$).

Keywords: Cryopreservation, Ovine, Blastocyst, Ethylene glycol, Glycerol.

* Corresponding Author email: a.shirazi@avicenna.ac.ir; shiraziabbas@yahoo.com

www.SID.ir