انجماد شیشه‌ای تخمک متافاز II موش با استفاده از ضد یخ اتیلن گلیکول

مژده صالح‌نیا M.Sc.☆، مجتبی رضازاده ولوجردی Ph.D.☆♦، تقی الطریحی Ph.D.☆

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

چکیده

* **هدف:** بررسی آثار روش انجمادی شیشه‌ای با استفاده از ضد یخ اتیلن گلیکول بر میزان زنده ماندن، لقاح، تکامل و فراساختمان تخمک بالغ Metaphase II (MII).

* **مواد و روشها:** موشهای ماده نژاد NMRI با سن شش تا ده هفته با استفاده از تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد human Menoposal Gonadotrophin (hMG) و پس از ۴۸ ساعت، ۱۰ واحد human Chorionic Gonadotrophin (hCG)، تحریک تخمک‌گذاری شدند. ۱۲ تا ۱۵ ساعت پس از تزریق hCG تخمکها از لولهٔ فالوپ خارج شده و با استفاده از هیالورونیداز ۰/۱ درصد توده سلولی کومولوس اطراف تخمک برداشته شد. تخمکهای MII با استفاده از محلول Phosphate Buffer (PBI) حاوی ۳۰ درصد فیکول ۷۰ (W/V)، ۰/۵ مول ساکارز، ۱۰/۷ درصد (W/V) استامید و ۱۰ درصد اتیلن گلیکول (V/V) به روش شیشه‌ای منجمد و در ازت مایع نگهداری شدند. تعدادی تخمک نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بعد از ذوب، نمونه‌ها با محلولهای نیم مول ساکارز و PBI، ۵ دقیقه شسته شدند و پس از اطمینان از زنده ماندن تخمک، تخمکهای سالم با اسپرمهای دم اپیدیدیم موشهای نر تلقیح شدند و تکوین جنینهای حاصل تا ۱۲۰ ساعت بررسی شد. تعدادی از تخمکها نیز قبل و بعد از تلقیح با استفاده از گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد و تتراکسید اسمیوم ۱ درصد تثبیت شده و پس از آبگیری، قالبگیری در رزین آرالدیت، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی با میکروسکوپ الکترونی انتقالی بررسی شدند.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل از این تحقیق مشخص کرد که میزان زنده ماندن تخمکها پس از انجماد شیشه‌ای، ۸۰ درصد بوده و از نظر میزان لقاح و تکوین بعدی جنینها تا مرحلهٔ خروج از قشر شفاف با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. تغییرات فراساختمانی دیده شده در تخمکهای منجمد شده قبل از تلقیح در مقایسه با گروه کنترل عبارت بودند از: کاهش فضای زیر قشر شفاف، بر هم خوردن آرایش اسکلت سلولی و تورم مختصری در بعضی از میتوکندریها که پس از تلقیح و چند ساعت انکوباسیون، کاملاً برگشت‌پذیر بودند.

* **نتیجه‌گیری:** با وجود تغییرات شدید فراساختمانی که پس از ذوب در اسکلت سلول تخمکهای منجمد شده مشاهده شد اما به‌دلیل برگشت‌پذیر بودن آنها، میزان بالای زنده ماندن تخمکها و عدم تفاوت معنی‌دار در تکوین جنینها نسبت به گروه کنترل، در مجموع می‌توان روش انجماد شیشه‌ای با استفاده از اتیلن گلیکول را روش مؤثری در انجماد تخمک معرفی نمود.

گل واژگان: انجماد شیشه‌ای، اتیلن گلیکول، فراساختمان، تخمک MII

مقدمه

انجماد شیشه‌ای روشی فیزیکی است که طی آن محلول غلیظ ضدیخ پس از قرارگرفتن در سرمای زیاد بدون تشکیل کریستال یخ یکباره تبدیل به حالت جامد می‌شود. این حالت به‌عنوان شیشه‌ای شدن[1] شناخته شده و پدیدهٔ جدیدی در علم کرایوبیولوژی است (۱). اولین بار این روش در سال ۱۹۳۷ توسط Luyet (۲) مطرح شد و امروزه جهت نگهداری جنین و تخمک گونه‌های مختلف جانوری به‌کار گرفته می‌شود. در انجماد شیشه‌ای چندین نکته حائز اهمیت است که از آن جمله می‌توان انتخاب ضدیخ و غلظت مناسب آن را نام برد. این دو فاکتور باید به‌گونه‌ای باشد که اولاً کریستال یخ در داخل و خارج سلول شکل نگیرد ثانیاً غلظت به‌کار گرفته شده برای سلول کشنده نباشد. محلولهای انجماد شیشه‌ای معمولاً حاوی ضدیخهای نفوذپذیر (گلیسرول، اتیلن گلیکول، ۱ و ۲ پروپاندیول)، دی ساکاریدهای کوچک (ساکارز، تری‌هالوز، گلوکز) و ماکرومولکولها (پروپیلن گلیکول، فیکول ۷۰، آلبومین سرم گاوی) هستند (۳). Vs1[2] که حاوی دی‌متیل سولفوکسید، استامید، پروپیلن گلیکول و پلی اتیلن گلیکول است، اولین محلول انجماد شیشه‌ای بود که در سال ۱۹۸۵ توسط Fahy و Rall (۴) جهت انجماد شیشه‌ای جنین موش به‌کار گرفته شد و نتیجهٔ خوبی در بر داشت. Russle و همکارانش (۵) در سال ۱۹۸۶ تخمک موش را با همین روش منجمد کردند اما گزارش آنها دقیقاً مشخص نکرده که چه تعداد از تخمکها ارزیابی شده‌اند. به‌کارگیری این محلول نتایج متناقضی را از نظر میزان زنده ماندن و تکامل بعدی جنینهای حاصله داشته است (۴، ۶، ۷، ۸، ۹). استفاده از ضدیخهای دیگر مثل دی متیل سولفوکساید (DMSO)[3] نیز نتایج متفاوتی را در انجماد شیشه‌ای تخمک نشان داده است (۱۰). اما آخرین گزارشهای منتشر شده در مورد انجماد شیشه‌ای تخمک با استفاده از اتیلن‌گلیکول نشان می‌دهد که این ماده در مقایسه با ضدیخهای دیگر، به‌علت نفوذپذیری زیاد و سمیت کم، آثار منفی کمتری را بر پتانسیل لقاح و تکامل جنینهای حاصل از تخمکهای منجمد شده داشته است. این مطلب هم در مورد کاربرد منفرد این ماده و هم استفاده آن همراه موادی مانند استامید فیکول و ساکارز صادق است (۹، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴).

نتایج محققین نشان می‌دهد که تخمک در مراحل انجماد متحمل فشارهای مکانیکی، حرارتی، بروتی و شیمیایی مختلف می‌شود که هر یک باعث بروز صدمات کشنده‌ای در آن می‌شوند. بخشهایی مثل اسکلت سلول، قشر شفاف (ZP)[4] و میتوکندریها از مهمترین ساختارهای متأثر از انجماد هستند.

تحمل و مقاومت میکروتوبولها و میکروفیلامنتها نسبت به سرما بستگی به نوع سلول، پروتئینهای همراه میکروتوبولها و میکروفیلامنتها و نوع ضدیخ به‌کار گرفته شده دارد (۱۵).

سخت شدن قشر شفاف[5] اغلب در ارتباط با آزاد شدن محتویات گرانولهای قشری است که به‌طور طبیعی پس از لقاح و نفوذ اسپرم به تخمک روی می‌دهد (۱۶)؛ اما در بسیاری از موارد پس از انجماد و ذوب تخمک نیز مشاهده شده که تلقیح تخمک را دچار مشکل می‌نماید. شاید اصلی‌ترین علت این امر مربوط به مهار نقاط اتصال اسپرم و تغییر در گلیکوپروتئینهای قشر شفاف باشد (۱۷). همچنین عناصر اسکلت سلول مستقیماً در آزاد شدن واگزوسیتوز گرانولهای قشری دخالت داشته و نقش مهمی را در جابه‌جایی گرانولهای قشری و دیگر ارگانلهای تخمک بر عهده دارند. بنابراین عواملی که به‌طور غیرمستقیم باعث برهم خوردن اسکلت سلول می‌شوند، می‌توانند مستقیماً بر آزاد شدن زودهنگام گرانولهای قشری و به‌دنبال آن سخت شدن قشر شفاف تأثیر بگذارند (۱۵).

گزارشهای اندکی دربارهٔ تغییر در میتوکندریهای تخمک بالغ پس از انجماد شیشه‌ای در گونه‌های مختلف پستانداران وجود دارد؛ اما با این‌حال نتایج حاصل از برخی تحقیقات نشان می‌دهد که فراساختمان میتوکندریها پس از انجماد شیشه‌ای تخمک نابالغ و بالغ گاو تغییر کرده و تعداد زیادی از آنها دچار آماس و تورم شده و به‌مرور تحلیل رفته‌اند (۱۸). همچنین Hochi (۱۹) و همکارانش در سال ۱۹۹۶ طی گزارش خود اعلام نمودند پس از انجماد شیشه‌ای تخمک نابالغ اسب با استفاده از اتیلن گلیکول ۲۰ درصد، تعداد زیادی از میتوکندریها دچار آماس شده و از تراکم آنها نیز کاسته شده است.

با توجه به ضرورت حفظ و انجماد تخمک و اهمیت روش انجماد شیشه‌ای در تحقیقات روزمره به‌دلیل سهولت کار و نتایج نسبتاً خوب به‌دست آمده؛ در این تحقیق سعی شده است که تخمک بالغ موش را با استفاده از ضدیخ اتیلن‌گلیکول، انجماد شیشه‌ای کرده و آثار آن بر میزان زنده ماندن، لقاح، تکامل جنینهای حاصله تا مرحله خروج از قشر شفاف و در نهایت فراساختمان تخمکهای فوق بررسی و ارزیابی شود.

مواد و روشها

* تهیه تخمک موش

موشهای سوری مادهٔ نژاد NMRI به سن ۱۰-۶ هفته با تزریق داخل صفاقی ۱۰IU hMG و ۴۸ ساعت بعد ۱۰ واحد hCG، تحریک تخمک‌گذاری شدند. ۱۴-۱۲ ساعت پس از تزریق hCG، موشها به روش قطع نخاع گردنی کشته شدند، لوله‌های رحمی آنها جدا و به قطره‌ای از محیط کشت T6 که از قبل آماده شده بود انتقال یافتند. در زیر استریومیکروسکوپ با فلاش کردن مقدار اندکی محیط کشت به داخل لولهٔ رحمی، تخمکها از لوله خارج و به قطره‌ای از محیط T6 که حاوی ۵ میلی گرم سرم آلبومین گاوی (BSA) بود منتقل شدند. سپس با استفاده از هیالورونیداز ۰/۱ درصد توده‌های سلولی گرانولوزا از اطراف تخمکها جدا شدند. در انتها تخمکهایی که در مرحلهٔ متافاز دوم بودند توسط میکروسکوپ معکوس شناسایی شده و تا قبل از انجماد در محیط کشت مذکور نگهداری شدند.

1. Vitrification
2. Vitrification Solution 1
3. Dimethyl Sulfoxide
4. Zona Pellusida
5. Zona hardening
6. Bovine Serum Albumin

* انجماد شیشه‌ای و ذوب تخمکها

برای انجماد شیشه‌ای تخمکها، محلولی از PBI حاوی ۳۰ درصد فیکول ۷۰ (W/V)، نیم مول ساکارز، ۱۰/۷ درصد (W/V) استامید و ۱۰ درصد (V/V) اتیلن گلیکول تهیه شد.

۲۰-۱۵ تخمک در هر بار آزمایش به مدت دو دقیقه در محیط انجماد شیشه‌ای آبگیری شده (زمان تعادل) و سپس به نی انجماد (IMV L' Aigle, France) منتقل شده و در انتها، دهانهٔ نی‌های انجماد با خمیر هماتوکریت مسدود شده و در ازت مایع غوطه‌ور شدند.

به منظور ذوب تخمکها، ابتدا نی‌های حاوی تخمک به مدت ۲۰ ثانیه در هوای آزمایشگاه و ۲۵ ثانیه در آب ۲۵° سانتی‌گراد ذوب شدند سپس محتویات آنها درون محلول ساکارز نیم مول تخلیه و پس از ۵ دقیقه در PBI شستشو شدند و در پایان به محیط T6 حاوی ۵ میلی گرم سرم آلبومین گاوی انتقال یافتند. درصد زنده ماندن تخمکها با میکروسکوپ معکوس بررسی شد (۱۴).

* تلقیح تخمکها

برای تلقیح تخمکها، اسپرمها را از دم اپیدیدیم موشهای نر همان نژاد تهیه و به‌مدت یک ساعت و نیم قبل از عمل تلقیح، در محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی گرم سرم آلبومین گاوی جهت انجام واکنش ظرفیت‌پذیری کشت داده شدند. سپس تخمک و اسپرم در محیط کشت T6 حاوی ۱۵ میلی گرم سرم آلبومین گاوی در کنار هم قرار داده شدند.

پس از ۶-۴ ساعت، محیط کشت تعویض شد. به ترتیب ۸، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح، تشکیل پیش هسته‌ها، جنین دو سلولی، چهار سلولی، مورولا، بلاستوسیست و خروج از قشر شفاف ارزیابی شد (۱۰).

* مطالعهٔ میکروسکپ الکترونی

تخمکهای منجمد شده و کنترل در دو مرحله برای مطالعات میکروسکوپ الکترونی انتخاب شدند؛ یک گروه دقایقی پس از ذوب و گروه دیگر پس از تشکیل پیش هسته‌ها. نمونه‌ها ابتدا در محلول ۲/۵ درصد گلوتارآلدئید به‌مدت یک ساعت تثبیت اولیه و سپس در محلول ۱ درصد تتراکسید اسمیوم (نیم‌ساعت) تثبیت ثانویه شدند و پس از آبگیری در الکل اتیلیک به‌مدت دو ساعت در پروپیلن اکسید قرارداده شدند و عمل آغشتگی در مخلوط ۵۰ درصد رزین آرالدیت و پروپیلن اکسید به‌مدت یک شب انجام شد.

برشهای ظریف به ضخامت ۵۰ نانومتر پس از تهیه توسط دستگاه اولترامیکروتوم، با اورانیل استات و سیترات سرب رنگ شده و در زیر میکروسکوپ الکترونی انتقالی مشاهده شدند.

* بررسی آماری

اطلاعات به‌دست آمده با استفاده از آزمون مجذور χ^2 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

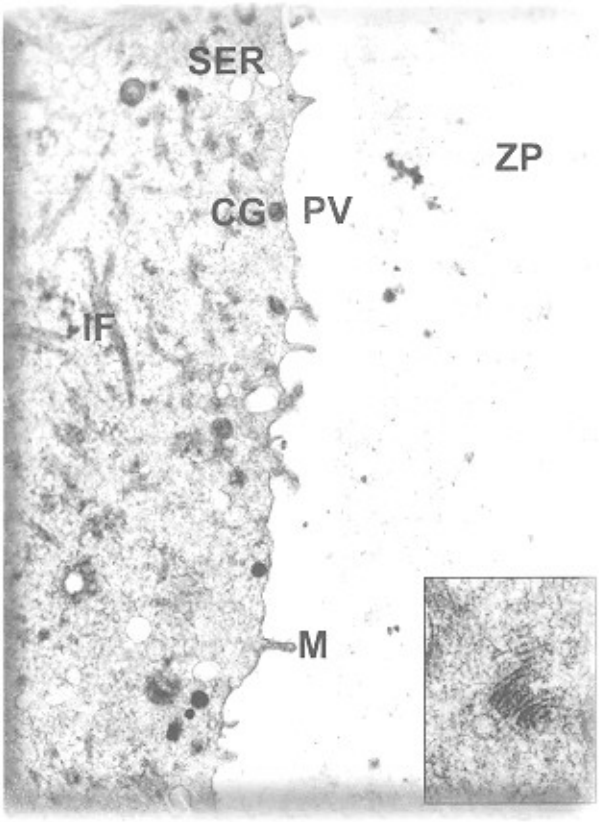
یافته‌ها

* میزان زنده ماندن و تکامل تخمک

پس از ذوب تخمکهای منجمد شده به روش شیشه‌ای، ۸۰ درصد آنها سالم بودند که ۹۱/۴ درصد آنها تلقیح شدند و این در حالی بود که ۹۲/۶ درصد از تخمکهای گروه کنترل لقاح یافتند. درصد جنینهای تک سلولی که به مرحلهٔ دو سلولی، مورولا، بلاستوسیست و خروج از قشر شفاف رسیدند در گروه منجمد شده به ترتیب ۹۳/۲ درصد، ۵۰ درصد، ۳۵/۱ درصد و ۲۹/۷ درصد و در گروه کنترل ۹۴/۶ درصد، ۵۲/۷ درصد، ۳۵/۷ درصد و ۲۸/۶ درصد بود که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین گروههای فوق در هیچ‌یک از مراحل تکامل پیدا نشد.

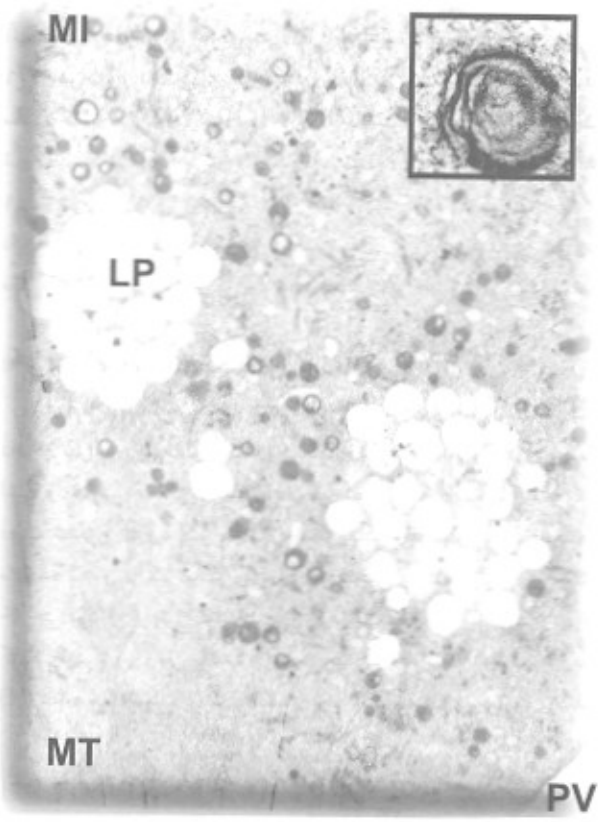
* فراساختمان تخمک قبل از لقاح

مشاهدات میکروسکوپ الکترونی در تخمکهای قبل از لقاح، نشان داد که بسیاری از خصوصیات تخمکهای منجمد شده و کنترل یکسان است و تنها در چند مورد تفاوتهایی مشاهده شد. در تخمکهای منجمد و ذوب شده و کنترل، قشر شفاف به‌شکل یکنواختی در اطراف تخمک مشاهده شد و تراکم الکترونی آن در بخش داخلی بیش از بخش خارجی بود و آرایش نسبتاً فیبریلاری داشت. فضای زیر قشر شفاف کاملاً مشهود و روشن بود. در سطح تخمک تعداد زیادی میکرووپلی (M) دیده شد (شکل ۱) که به فضای زیر قشر شفاف وارد شده بودند.



شکل ۱: میکروگراف الکترونی تخمکهای متافاز II منجمد نشده موش (بزرگنمایی ۱۰۵۰۰)
M: میکرووپلی، PV: فضای دور زرده‌ای، CG: گرانول قشری، SER: شبکه اندوپلاسمیک صاف، IF: فیلامنتهای حدواسط. بخش داخل کادر: مقاطع طولی و عرضی فیلامنتهای حد واسط

فقط در یک ناحیه از غشای سلول تعداد میکرویلی‌ها کاسته شده و غشا صاف بود که نشانگر ناحیهٔ خروج جسم قطبی است (شکل ۲).



شکل ۲: میکروگراف الکترونی تخمک منجمد نشده موش (بزرگنمایی ۲۵۰۰۰). PV: فضای دور زرده‌ای، LP: قطرات چربی، MI: میتوکندری، MT: میکروتوبول. بخش داخل کادر مقطعی از جسم تیغه‌ای را نشان می‌دهد.

در تخمکهای منجمد شده فضای زیر قشر شفاف کمی کاهش یافته بود به‌گونه‌ای که میکرووبلی‌های سطح سلول به قشر شفاف وارد شده و با آن اتصال داشتند (شکل ۳).

در سیتوپلاسم قشری تخمک گروه کنترل، گرانولهای قشری، اسکلت سلول، میتوکندری و بخشهایی از SER مشاهده شدند. گرانولهای قشری به تعداد زیاد و به شکل اجسام مدور، دنس و متراکم بوده و بیشتر در زیر غشای سلول تجمع داشتند و درصدی از آنها کمی داخلتر و در لابلای ارگانلهای دیگر سلول مشاهده شدند. گرانولهای قشری تخمکهای منجمد شده از نظر تعداد کاهش داشته ولی از نظر تراکم و شکل مشابه گروه شاهد بودند و پدیده اگزوسیتوز زود هنگام در آنها مشاهده شد (شکل ۳).

میتوکندریهای تخمک گروه کنترل اغلب گرد یا بیضی بودند. یک حباب روشن در مرکز یا در کناره آنها مشاهده می‌شد (شکل ۲ و ۴). تراکم میتوکندریها در قشر سلول بویژه در اطراف قطرات چربی بیشتر از مرکز آن بود (شکل ۲). برخی میتوکندریها در گروه منجمد شده، علائمی از آماس سلولی را نشان دادند.

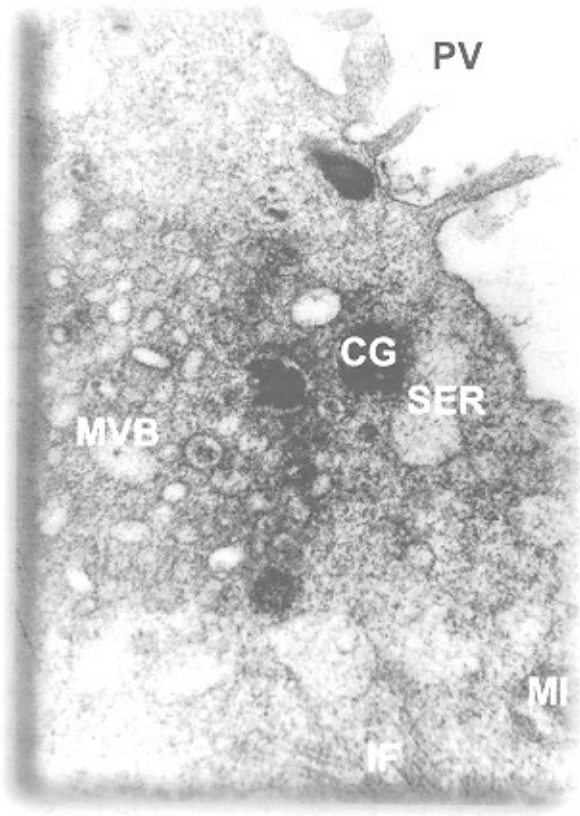
شکل ۳: میکروگراف الکترونی تخمک متافاز II منجمد شده به روش شیشه‌ای (بزرگنمایی ۳۲۰۰۰). ZP: قشر شفاف، PV: فضای دور زرده‌ای، M: میکروویلی، CG: گرانول قشری، MI: میتوکندری. بخش داخل کادر مقاطعی از میتوکندریها را نشان می‌دهد.

به‌نظر می‌رسد که اسکلت سلول در گروه کنترل بیشتر از نوع فیلامنتهای حدواسط (سیتوکراتین) باشد که به میزان بسیار زیاد و به شکل اجسام فیبریلار در لابلای میتوکندریها، گرانولهای قشری و قطرات چربی مشاهده شدند (شکل ۱). این بخش از اسکلت سلول کاملاً حالت رشته‌ای یا فیبریلار داشته و خطوط عرضی متناوب در آنها دیده شد که به‌عبارتی دارای ویژگی مخطط[1] بودند.

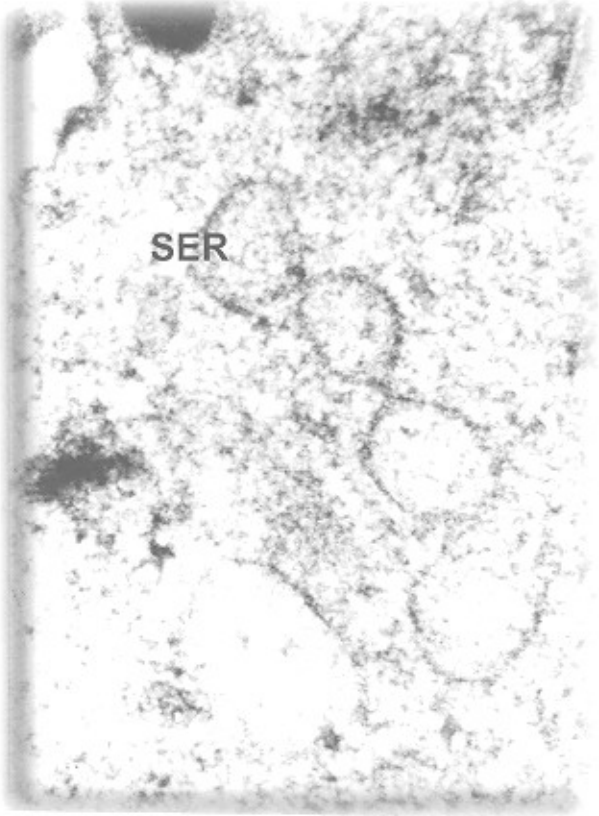
در تخمکهای منجمد شده آرایش فیلامنتهای حدواسط بر هم خورده بود و این عناصر در سلول ناپدید شده بودند.

در گروه تخمکهای ذوب شده همچنین بخشهایی از شبکهٔ اندوپلاسمیک صاف (SER) به شکل وزیکول یا سیسترناهای وسیع درآمده بودند که اغلب حالت مدور یا بیضی داشتند و در قشر سلول توزیع شده بودند. مجرای مرکزی این ارگانل روشن بود و گاهی اوقات تعدادی از آنها به‌دنبال هم ردیف می‌شدند (شکل ۵).

1. Striation



شکل ۳: میکروگراف الکترونی تخمک تلقیح شده موش پس از انجماد شیشه‌ای (بزرگنمایی ۲۸۶۰۰×). PV: فضای دور زرده‌ای، CG: گرانول قشری، MI: میتوکندری، IF: فیلامنت حدواسط، MVB: اجسام مولتی وزیکولار و SER: شبکه اندوپلاسمیک صاف.



شکل ۵: میکروگراف الکترونی تخمک متافاز II منجمد شده موش (بزرگنمایی ۷۴۸۰۰×). بخشهایی از شبکه SER به شکل ردیفی به‌دنبال هم قرار گرفته‌اند.

قطرات چربی به شکل خوشه‌هایی در کنار هم مجتمع و در سیتوپلاسم تخمک پراکنده بودند و غشاء مشخصی در آنها دیده نشد (شکل ۲).

در قشر تخمک ذوب شده، تعدادی کریستال نیز به شکل اجسام تیغه‌ای[1] و به حالت دوایر متحدالمرکز و با ظاهری از خطوط تاریک و روشن قابل مشاهده بود (شکل ۲).

اجسام مولتی وزیکولار به تعداد زیاد و با اندازه‌های متفاوت (بزرگ و کوچک) در سیتوپلاسم قشری دیده شدند که تعدادی از وزیکولهای آنها روشن و تعدادی حالت گرانولر یا متراکم داشتند (شکل ۴، ۶).

* فراساختمان تخمک پس از لقاح

تخمکهای گروه کنترل، بسیاری از اندامکهای سلول از نظر خصوصیات کلی ارگانلهای سلول ویژگی قبل از لقاح خود را حفظ کردند ولی تفاوتهایی در بعضی از بخشهای سلول مشاهده شد. قشر شفاف به شکل یکنواخت بر سطح تمام سلول دیده شد. فضای زیر قشر شفاف بسیار وسیع شده و افزایش حجم داشت. این امر مربوط به تخلیهٔ مقادیر زیادی از محتویات گرانولهای قشری پس از ورود اسپرم به تخمک بود.

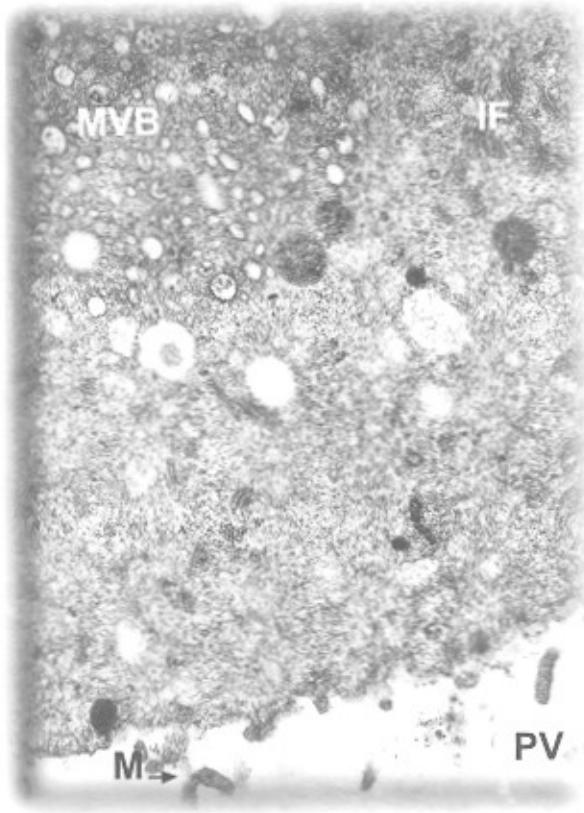
میکروویلی‌های سطح سلول نظم و ترتیب و ساختمان خود را حفظ کرده و به تعداد زیادی در سطح تخمک مشاهده شدند (شکل ۶).

در سیتوزول ارگانلهایی مثل میتوکندری، اجسام مولتی وزیکولار و سیسترناهای SER و عناصر اسکلت سلول با آرایش و نظم قبل از لقاح، دیده شدند ولی تعداد گرانولهای قشری به طور چشمگیری کاهش یافته و درصد بسیار کمی از آنها در زیر غشای سلول درحال واکنش قشری قابل مشاهده بودند. فراساختمان تخمکهای منجمد شدهٔ لقاح یافته مشابه با شاهد بود.

نکتهٔ قابل تأکید و اهمیت در این گروه مربوط به برگشت به حالت طبیعی ساختمان، آرایش و پراکندگی میکروفیلامنتهای حدواسط بود (شکل ۵).

همان‌طورکه در بخش قبلی ذکر شد در تخمکهای منجمد شده پس از ذوب، میکروفیلامنتهای حد واسط محو شده بودند و آثاری از آنها مشاهده نشد. اما پس از گذشت ۱۲-۱۰ ساعت انکوباسیون، تغییرات فوق به حالت طبیعی برگشتند و مقاطع عرضی و طولی اسکلت سلول به‌وضوح مشاهده شد.

1. Lamellar bodies



شکل ۶. میکروگراف الکترونی تخمک تلقیح شده موش (بزرگنمایی ۲۱۰۰۰×).
PV: فضای دور زرده‌ای، M: میکروویلی، IF: فیلامنت حدواسط، MVB: اجسام مولتی وزیکولار.

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که انجماد شیشه‌ای با استفاده از محلول حاوی ۱۰ درصد ضدیخ اتیلن گلیکول روش مناسبی جهت انجماد تخمک موش است، چراکه درصد زیادی از تخمکها پس از انجماد و ذوب سالم مانده (۸۰ درصد) و از این تعداد ۹۱/۴ درصد لقاح یافته و تکامل جنینهای حاصله تا مرحله خروج از قشر شفاف مشابه گروه کنترل ادامه می‌یابد. این نتایج با نتایج به‌دست آمده از سایر محققین که از روش انجماد شیشه‌ای استفاده کرده‌اند قابل مقایسه است (۷، ۱۰، ۱۱ و ۱۲).

Hotamisligil و همکارانش (۲۰) گزارش دادند که با استفاده از ضدیخ اتیلن گلیکول در انجماد شیشه‌ای درصد بالایی از تخمکها زنده مانده و تلقیح می‌شوند و اتیلن‌گلیکول اثر منفی را بر پتانسیل تکامل آنها ندارد. Pedro و همکارانش (۲۱) طی گزارش خود اعلام نمودند که می‌توان تخمک موش را با استفاده از محیطی که حاوی ۱۰ درصد اتیلن گلیکول است با موفقیت انجماد شیشه‌ای کرد؛ گرچه این افراد تکامل جنینها را تا مرحله خروج از قشر شفاف بررسی نکردند. Rayes و همکارانش (۱۳) نیز در گزارش خود نتایج مشابهی را اعلام نمودند. حتی اخیراً Bautista و همکارانش (۲۲) با استفاده از محلول غلیظ، ۷ مول اتیلن گلیکول نتایج خوبی را از انجماد شیشه‌ای تخمک و جنین موش به‌دست آوردند. برخلاف یافته‌های فوق، Myake (۲۳) در گزارش خود اعلام نمود که انجماد تخمک موش در محلول اتیلن گلیکول ۴۰ درصد، موفقیت خوبی را به‌دنبال نداشته و درصد بسیار پایینی از تخمکهای MII (۴-۲ درصد) پس از ذوب از نظر مورفولوژی سالم به‌دست می‌آیند.

گزارشهایی مبنی بر سخت شدن قشر شفاف طی انجماد وجود دارد که از نفوذ اسپرم به درون تخمک ممانعت به‌عمل آورده و باعث کاهش لقاح آنها می‌شود (۱۵، ۱۷). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که درصد لقاح تخمکهای انجماد شیشه‌ای شده با اتیلن گلیکول مشابه گروه کنترل است. بنابراین روش انجمادی فوق بر ساختمان ZP تأثیر منفی نداشته و باعث سختی آن نخواهد شد. در مطالعات میکروسکوپ الکترونی نیز مشخص شد که ساختمان ZP در تخمکهای منجمد شده و نشده یکسان است. دقایقی پس از ذوب، فراساختمان تخمکهای منجمد شده به روش شیشه‌ای از نظر مورفولوژی مشابه با گروه کنترل است و تفاوت اساسی مشاهده شده تنها مربوط به برهم خوردن آرایش و نظم فیلامنتهای حدواسط و مختصر تورمی در بعضی از میتوکندریها می‌باشد.

بسیاری از محققین در نتایج خود اعلام کرده بودند (۲۴، ۲۵) که به علت حساسیت فیلامنتهای اکتین به تغییرات دمایی، در طی انجماد و ذوب، این بخش از اسکلت سلول آسیب دیده و نظم و آرایش طبیعی آن بر هم می‌خورد. با توجه به اینکه فیلامنتهای اکتین محور اصلی پرزها یا میکروویلی‌ها را می‌سازند و استحکام میکروویلی‌ها به ساختار طبیعی دسته‌های اکتینی بستگی دارد، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در تخمکهای منجمد شده مشابه گروه کنترل، تعداد زیادی میکروویلی بلند و کشیده بر سطح تخمک دیده می‌شود که این امر نمایانگر عدم اثر انجماد شیشه‌ای بر میکروفیلامنتها است.

همانگونه که در یافته‌ها ذکر شد به‌علت تخریب مورفولوژی و استحکام فیلامنتهای حدواسط در تخمکهای منجمد شده پس از ذوب، نحوهٔ قرارگیری بعضی از ارگانلهای سلول برهم می‌خورد؛ به‌عنوان مثال در گروههای کنترل تلقیح نشده، قطرات چربی به‌حالت خوشه‌ای در کنار هم قرار داشتند (حدود ۲۰ تا ۳۰ قطره) و میتوکندریها نیز به یک نسبت در تمام سیتوپلاسم پراکنده بودند، اما در گروه انجماد شیشه‌ای قطرات چربی پراکنده شده و حداکثر در گروههای دو تا سه‌تایی مشاهده شدند. حتی به‌نظر می‌رسید که میتوکندریها و وزیکولهای SER در بعضی مناطق، تجمع بیشتری داشته و توزیع طبیعی خود را از دست داده‌اند. گرچه در تحقیق حاضر تغییرات اندکی در بعضی از میتوکندریهای تخمکهای منجمد شده مشاهده شد ولی این تغییرات به حدی نبود که بر تکامل بعدی تخمک تأثیر بگذارد و پس از چند ساعت انکوباسیون کاملاً مرتفع شدند اما گزارشهایی وجود دارد که در آنها محققین اعلام کرده‌اند که میتوکندری طی انجماد شیشه‌ای دچار تورم و آماس شده و پس از چند ساعت تخمک دژنره می‌شود (۱۸، ۱۹).

در پژوهش حاضر؛ در قشر تخمکهای کنترل و منجمد شده تعداد زیادی اجسام مولتی وزیکولار با ابعاد متفاوت مشاهده شد؛ در تخمک لقاح نیافته این اجسام کوچکتر از تخمکهای لقاح یافته بودند. گزارشهای

قبلی (۱۸، ۲۶، ۲۷) نشان می‌دهد که این اجسام از تعداد زیادی انکلوزیون بادامی شکل با قطرهای متفاوت تشکیل شده که گاهی اوقات دارای بخشهای تیره و متراکمی هستند و تعداد آنها در تخمک نابالغ (ژرمینال وزیکول) بیش از تخمک بالغ است که در بعضی از مناطق تخمک، این اجسام همبستگی خاصی را با وزیکولهای SER به‌وجود می‌آورند. Hopkins (۲۸) اعتقاد دارد که این اجسام در ارتباط با سیستم لیزوزومها و اندوسیتوز هستند و به‌عبارتی در هضم داخل سلول نقش دارند. Sundstrom و همکارانش (۲۶) در گزارش خود اعلام نمودند که هرچه تخمک بالغ‌تر می‌شود تعداد این اجسام کاهش می‌یابد. برخلاف گزارشهای فوق در میکروگرافهای حاصل از این تحقیق مشاهده شد که جنینهای تک‌سلولی اجسام مولتی وزیکولار بزرگتری در مقایسه با تخمکهای متافاز II دارند. Nogues و همکارانش (۲۷) نیز وجود این اجسام را در جنین تک سلولی گاو مشاهده کرده و اعلام نمودند که می‌توان این اجسام را در سه گروه کوچک، متوسط و بزرگ طبقه‌بندی کرد.

در تحقیق حاضر؛ گرچه در تخمکهای منجمد شده از فضای زیر قشر شفاف به میزان مختصری کاسته شده بود و انتهای میکروویلی‌ها در تماس نزدیک با عناصر ZP بودند و حتی در مواردی تخلیه زودهنگام گرانولهای قشری نیز دیده شد، اما هیچ‌یک از این حوادث بر تکامل بعدی جنینها تأثیر منفی نداشتند. از آنجایی که میتوکندریهای تخمک منجمد شده دچار تغییر اساسی نشده بودند، پس از گذشت چند ساعت انرژی لازم (ATP) برای پلی‌مریزاسیون پروتئینهای اسکلت سلول تأمین شده و آرایش فیبریلار فیلامنتهای حدواسط (سیتوکراتین) به حالت طبیعی خود برگشت کردند.

بنابراین در مجموع با توجه به درصد بالای تخمکهای زنده مانده و لقاح یافته و نیز تکامل خوب جنینهای حاصله و صدمات کم وارد شده به فراساختمان تخمک طی انجماد شیشه‌ای، روش مذکور می‌تواند برای انجماد تخمک سودمند واقع شود.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی این طرح برمبنای قرارداد شماره ۲۶۳۴/۲۰/۱۹پ مورخ ۷۷/۱۰/۱۳ از بودجه تحقیقاتی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی ایران تأمین شده است و بدینوسیله از آقایان حسین بهاروند و سعید آبرون که در انجام مراحل مختلف این پژوهش همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Fahy GM, Macfarlane DR, Angell CA, Meryman HT: Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiol 1984; 21: 407-426

2. Luyet BJ: The vitrification of organic colloids and of protoplasme. Biodynamica 1937; 1(29): 1-14

3. Kasai M: Principles of the cropreservation of mammalian embryos by vitrification. H Miyamoto, N Manabe (eds). Shoukadou Bookseller Company, Kyoto, Japan, Reprod Biol update, 1998, pp 436-440

4. Rall WF, Fahy GM: Ice-free cryopreservation of mouse cmbryos at -196°C by vitrification. Nature 1985; 314: 573-575

5. Russell JB, Kaltenbacher L, Pelicer A, De Le Fuente A, De Cherney AH: Successful survival and fertilization of mouse oocytes after rapid freezing to -196°C and thaw. Presented at the forty- second annual metting of the American fertility society, 1986; (Abstract) 368

6. Kola I, Kirby C, Shaw J, Darey A, Trounson A: Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. Teratology 1988; 38: 467-473

7. Nakagata N: Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes from inbred strains by ultrarapid freezing. Exp Anim 1990; 39(2): 303-305

8. Shaw PW, Fuller BJ, Bernard A, Shaw RW: Vitrification of mouse oocytes: improved rates of survival, fertilization and development to blastocysts. Mol Reprod and Dev 1991; 29: 373-378

9. Shaw PW, Bernard A, Fuller BJ, Hunter JE, Shaw RW: Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effects of varying exposure time on survival. Mol Reprod Dev 1992; 33:210-214

10. Wood MJ, Barros C, Candy CJ, Carroll J, Melendoz J, Whithingham DG: High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethyl sulphoxide. Biol Reprod 1993; 49: 489-495

11. Kono T, Kwon OY and Nakahara T: Development of vitrified mouse oocytes after in vitro Fertilization. Cryobiology 1991; 28: 50-54

12. Nakagata N: High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. J Reprod Fert 1989; 87: 479-483

13. Rayos AA, Takahashi0 Y, Hishinuma M, Kanagawa H: Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose and trehalose. J Reprod Fertil 1994; 100: 123-129

14. Kasai M: Simple and efficeint methods for vitrification of mammalian embryos. Anim Reprod Sci 1996; 42: 67-76

15. Bernard A, Fuller BJ: Cryo preservation of human oocytes: a review of current problems & prespective.

Hum Reprod Updae 1996; 2(3): 193-207
16. Wassarman PM: Profile of a mammalian sperm receptor. Development 1990; 108: 1-17
17. Johnson MH, Pickering SJ, George MA: The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocyte. Hum Reprod 1988; 3: 383-387
18. Fuku E, Xia L, Downey BR: Ultrastructural changes in bovine oocytes cropreserved by vitrification. Cryobiology 1995; 32: 139-156
19. Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T, Hondo E, Yamada J, Oguri N: In vitro maturation and transmission electron microscopic observation of hourse oocytesafter vitrification. Cryobiology 1996; 33: 300-310
20. Hotamisligil S, Toner M & Power D: Change in membrane integrity, cytoskeletal structure and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. Biol of Reprod 1996; 55: 161-168
21. Pedro PB, Sakurai T, Edashige K, kasai M: Effects of osmotic shirinkage on the survival of mouse oocytes and embryos at various developmental stages. J Mamm Ova Res 1997; 14: 66-71
22. Bautista JAN, Takahashi Y, Kanagawa H: In vitro viability of mouse zygotes vitrified in ethylen glycol. Jpn J Vet Res 1998; 45(4): 193-198
23. Miyaka T, Kasai M, Zhu SE, Sakuvai T, Machiad T: Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in a ethylene glycol-baed solution by a simple method. Theriogenology 1993; 40: 121-134
24. Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L, Bardy T: The effects of cooling human oocytes. Hum Reprod 1988; 3: 968-977
25. Vincent C, Carnier V, Heyman Y and Renard JP: Solvent effects on cytoskeletal organization and in vivo survival after feerzing of rabbit oocytes. J Reprod Fertil 1989; 87: 809-820
26. Sundstrom P, Ove Nilsson B, Liedholm P, Larsson E: Ultrastructural charachteristics of human oocytes fixed at follicular puncture or after culture. J In Vitro Fertil Embryo Transfer 1985; 2(4): 195-206
27. Nogues C, Ponsa M, Egozcue J, Vidal F: Ultrastructural studies of early mouse embryos obtained by oocyte fusion. Zygot 1994; 2: 15-28
28. Hopkins CR: Structure and function of cells. London, Saunders, 1978, pp 323-348