Original Article

Optimized Method for Bovine Blastocyst Vitrification Using a Simple Hand-Made Cryotip

Vajiheh Asgari, B.Sc.[1], Mohsen Forouzanfar, Ph.D.[2], Sayed Morteza Hosseini, D.V.M.[3], Mehdi Hajian, M.Sc.[3], Fariba Moulavi, B.Sc.[3], Parvaneh Abedi, B.Sc.[3], Laleh Hosseini, M.Sc.[3], Hossein Sadeghi, Ph.D.[1], Hamid Bahramian, Ph.D.[1], Mohammad Hossein Nasr Esfahani, Ph.D.[3]*

1. Anatomy Department, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Marvdasht Branch, Marvdasht, Iran
3. Reproduction and Development Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 19395-4644, Reproduction and Development Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran***
Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

Received: 29/Jun/2008, Accepted: 7/Oct/2008

Abstract

Objective: This study introduced a simple method for bovine blastocyst vitrification.
Materials and Methods: Bovine blastocysts were produced in vitro by means of a whole co-culture system with vero cells. The blastocysts were randomly divided 1:3 into either vitrification (100 blastocysts) or control (43 blastocysts) groups. For vitrification,expanded - blastocysts were incubated first in equilibration medium for 8 minutes and then in the vitrification solution for 1 minute. The blastocysts were then loaded in the tip of a handmade cryotip for immediate - deep freezing in liquid nitrogen. Frozen embryos were then warmed by directly immersing the tips in sequential warming solutions . warmed embryos were cultured for a further period of 48 hours when the ratios of re-expansion, hatching and degeneration were compared with the control group.
Results: After warming, in the vitrified and control groups the ratios of re-expansion were 78.5% ± 0.067 and 81.6% ± 0.072, the ratios of hatching were 43.7% ± 0.083 and 49.8% ± 0.089 and the ratios of degeneration were 36% ± 0.082 and 22.3% ± 0.087, respectively, which were not significantly different between the two groups.
Conclusion: Post - warming survival of the vitrified and non - vitrified embryos were not significantly different, handmade cryotips can be used as an efficient and feasible device for bovine blastocysts vitrification.

Keywords: Blastocyst, Warming, Survival.

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 220-227

روش بهینه انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌های گاوی با استفاده از کرایوتیپ دست‌ساز

وجیهه عسگری .B.Sc[1]، محسن فروزانفر .Ph.D[2]، سید مرتضی حسینی .D.V.M[3]، مهدی حاجیان .M.Sc[3]، فریبا مولوی .B.Sc[3]، پروانه عابدی .B.Sc[3]، لاله حسینی .M.Sc[3]، حسین صادقی.Ph.D[1]، حمید بهرامیان.Ph.D[1]، محمد حسین نصر اصفهانی.Ph.D[3*]

۱. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، گروه علوم تشریح، اصفهان، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، گروه علوم پایه، مرودشت، ایران
۳. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه تولید مثل و تکوین، اصفهان، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: اصفهان، ایران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه تولید مثل و تکوین
پست الکترونیک: Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۷/۴/۹، پذیرش مقاله: ۸۷/۷/۱۶

چکیده

* **هدف:** معرفی یک روش ساده جهت انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌های گاوی

* **مواد و روش‌ها:** بلاستوسیست‌های تولید شده آزمایشگاهی گاوی، به طور تصادفی به نسبت یک به سه برای انجماد شیشه‌ای (۱۰۰ بلاستوسیست) و یا کنترل (۴۳ بلاستوسیست) استفاده شدند. برای انجماد شیشه‌ای، بلاستوسیست‌های متسع، ابتدا در محیط تعادل (۸ دقیقه) و سپس در محلول انجماد شیشه‌ای (۱ دقیقه) انکوبه شدند و پس از انتقال به نوک کرایوتیپ‌های دست ساخت درون ازت مایع قرار گرفتند. رویان‌های منجمد شده با غوطه‌ورسازی نوک کرایوتیپ‌ها در محلول‌های ذوب متوالی شست‌وشو و برای یک دوره ۴۸ ساعت کشت داده شدند. میزان اتساع مجدد (Re-Expansion)، شکوفایی (Hatching) و دژنره شدن (Degeneration) بلاستوسیست‌های گروه انجمادی با گروه کنترل مقایسه شدند.

* **یافته‌ها:** ۴۸ ساعت پس از ذوب جنین‌ها در گروه‌های انجمادی و کنترل، میزان اتساع مجدد به ترتیب ۰/۰۶۷ ± ۷۸/۵ درصد و ۰/۰۷۲ ± ۸۱/۶ درصد، میزان شکوفایی به ترتیب ۰/۰۸۳ ± ۴۳/۷ درصد و ۰/۰۸۹ ± ۴۹/۸ درصد و میزان دژنره شدن به ترتیب ۰/۰۸۲ ± ۳۶ درصد و ۰/۰۸۷ ± ۲۲/۳ درصد بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

* **نتیجه‌گیری:** از آنجا که توانایی زنده‌مانی رویان‌های انجمادی تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشته است، می‌توان مطالعه حاضر را به عنوان یک روش کارآمد برای انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌های گاوی معرفی نمود.

* **کلیدواژگان:** بلاستوسیست، گرم کردن، زنده مانی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۲۲۷-۲۲۰

مقدمه

حفظ انجمادی (Cryopreservation) به معنای ذخیره و نگهداری سلول‌ها و بافت‌ها از جمله اسپرم، اووسیت و جنین در دمای زیر نقطه انجماد آب است (۱). به طور کلی امروزه برای انجماد جنین‌ها از دو روش اصلی استفاده می‌شود: ۱. انجماد آهسته (Slow Cooling) و ۲. انجماد شیشه‌ای (Vitrification). در طی روش انجماد آهسته، پس از جابه‌جایی آب سلول با ماده محافظ انجمادی، سلول‌ها یا بافت‌ها را به تدریج سرد و در نهایت درون ازت مایع نگهداری می‌کنند در حالی که در روش انجماد شیشه‌ای سلول یا بافت مورد نظر جهت انجماد، به سرعت (در حد یک یا کمتر از یک ثانیه) به دمای ۱۹۶-درجه سانتی‌گراد می‌رسد (۲). از مزایای انجماد شیشه‌ای نسبت به انجماد آهسته می‌توان به سریع و ارزان قیمت‌تر بودن و عدم تشکیل کریستال‌های یخ درون و برون سلولی که موجب آسیب به جنین می‌شود، اشاره نمود (۳). به علاوه گزارش شده که میزان اتساع مجدد (Reexpansion) و هم‌چنین میزان شکوفایی (Hatching) جنین‌های آزمایشگاهی گاو که با روش انجماد شیشه‌ای منجمد شده‌اند به طور قابل توجهی بالاتر از جنین‌های منجمد شده با روش انجماد آهسته بوده است (۴). امروزه انجماد و سپس انتقال جنین‌های انجمادی به گاوهای گیرنده به عنوان یک روش معمول و با صرفه اقتصادی بالا انجام می‌شود؛ به این جهت تحقیقات در زمینه انجماد جنین بیشتر بر روی گونه گاو متمرکز شده است (۵). این فرایند می‌تواند جهت نگهداری بلاستوسیست‌های گاوی برای استفاده در زمان‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرد؛ زیرا در زمان‌هایی که تعداد گیرنده مناسب برای انتقال بلاستوسیست‌ها وجود ندارد، می‌توان به وسیله انجماد شیشه‌ای، بلاستوسیست‌ها را تا زمان دلخواه نگهداری کرد. هم‌چنین حمل و نقل

بلاستوسیست‌های منجمد شده آسان بوده و به راحتی می‌توان آنها را تا دوردست‌ترین مزارع به منظور انتقال به گاوهای گیرنده، حمل نمود. از طرف دیگر با توجه به اینکه تعداد محدودی بلاستوسیست برای حفظ انجمادی در دسترس می‌باشد، استفاده از یک روش ساده، سریع و قابل اعتماد به منظور حفظ انجمادی بلاستوسیست‌ها مورد نیاز می‌باشد (۶). انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌ها با وسایل مختلفی از قبیل استرو، گرید میکروسکوپ الکترونی، کرایولوپ، کرایوتیپ و ... قابل انجام است. در سال ۱۹۸۰ استروهای پلاستیکی جهت انجماد شیشه‌ای و ذخیره جنین‌ها، به‌کار برده می‌شد (۷). در روش انجمادی (Open Pulled Straw; OPS) جنین‌ها، در اثر خاصیت مویینگی انتهایی یک نی که توسط گرما باریک شده است، وارد نی می‌شوند (۸). هر چند در این روش تماس نزدیک بین جنین و ازت مایع سرعت انجماد را افزایش می‌دهد، با این حال شناور کردن نی در ازت مایع نیاز به درپوش دارد و از طرفی امکان شکست زوناپلاسیدا نیز وجود دارد (۹). در روش Electron Microscope Grids (EMG)، انجماد شیشه‌ای با استفاده از گرید میکروسکوپ الکترونی انجام می‌شود (۳). این روش انتقال دما را به جنین تسریع کرده، در نتیجه میزان بقا بعد از ذوب را افزایش می‌دهد. اما در اثر چسبیدن جنین به گرید میکروسکوپ الکترونی امکان آسیب مکانیکی وجود دارد که به علت نیاز به سلامت مورفولوژیک جنین‌ها پس از انجماد، قابل چشم‌پوشی نیست (۱۰). روش کرایولوپ (Cryoloop)، عبارت است از حفظ انجمادی با استفاده از یک حلقه نایلونی باریک جهت حفظ یک لایه ماده محافظ انجمادی حاوی جنین که مستقیما وارد ازت مایع می‌شود (۱۱). حجم کم مواد محافظ انجمادی همراه جنین بر روی کرایولوپ و نیز تماس مستقیم ازت مایع منجر به افزایش میزان سرما می‌شود. هم‌چنین به لحاظ داشتن، درپوش امکان آلودگی جنین‌ها کاهش می‌یابد (۱۲). در روش انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایولوپ از یک نوار باریک با عرض ۰/۴ میلی‌متر، طول ۲۰ میلی‌متر و ضخامت ۰/۱ میلی‌متر، استفاده می شود که به یک دسته پلاستیکی محکم متصل شده است. به لحاظ محافظت از این نوار باریک در ازت مایع، از یک درپوش برای پوشاندن آن استفاده می‌شود (۱۳). این روش با مقادیر بسیار کم مواد محافظ انجمادی و در زمان‌های بسیار کوتاه قابل انجام است و تماس مستقیم ازت با جنین موجب افزایش سرعت انجماد و عدم تشکیل کریستال یخ می‌شود (۱۴). با این حال استفاده از کرایوتیپ‌های تجاری به منظور انجماد شیشه‌ای جنین‌های گاو مستلزم صرف هزینه نسبتا زیادی می‌باشد. لذا در این تحقیق به منظور ساده‌سازی روش انجماد شیشه‌ای جنین‌های گاو، انجماد شیشه‌ای با استفاده از نی‌های ساده دست‌ساز انجام شد. کیفیت جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی گاو در مرحله بلاستوسیست از نظر میزان بقا بلاستومرها، درصد اتساع مجدد، درصد شکوفایی و درصد دژنره شدن پس از انجماد شیشه‌ای ارزیابی و با جنین‌های گروه غیرانجمادی که در شرایط مشابه کشت داده شدند، مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

مواد

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده مطالعه حاضر (مصوب شورای اخلاق پژوهشکده رویان) به جز مواردی که مشخص می‌گردد از شرکت Sigma (St. Louis , Mo, USA) تهیه شد.

روش‌ها

تهیه اووسیت و بلوغ آزمایشگاهی

با مراجعه به کشتارگاه محلی، تخمدان‌های گاوهای کشتارگاهی جمع‌آوری و در فلاسک‌های حاوی نرمال سالین (۰/۹ گرم کلریدسدیم در یک لیتر آب) قرار داده شده و در کمتر از دو ساعت در دمای ۳۵-۳۰درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه به کمک سرنگ ۱۰ میلی‌لیتر و نیدل گوژ ۱۸ حاوی حدود ۱ میلی‌لیتر محلول H-TCM + ۱۰درصد Fetal Calf Serum (FCS)، غنی سازی شده با ۵۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر هپارین، فولیکول‌های با قطر ۸-۲ میلی‌متر موجود در ناحیه قشری تخمدان‌ها، به آرامی آسپیره شدند. سپس در زیر استریومیکروسکوپ (OLYMPUS با مدل SZX16) کمپلکس‌های کومولوس-اووسیت (COCs Cumulus Oocyte Complexes; COCs) که از نظر سیتوپلاسمی یکنواخت و حد اقل دارای سه لایه از سلول‌های کومولوس بودند، جدا شده و در دیش‌های حاوی قطرات ۲۰۰ میکرولیتر از محیط H-TCM+ ۱۰درصد FCS پوشیده شده با روغن معدنی شستشو شدند. سپس COCهای شست‌وشو داده شده جهت انجام مراحل بلوغ آزمایشگاهی در دیش‌های حاوی قطرات ۱۰۰ میکرولیتر از محیط بلوغ (TCM199 + FCS 10% حاوی ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر FSH، ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر LH، ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر 17-β-estradiol) به مدت ۲۴-۲۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و رطوبت حداکثر کشت داده شدند.

آماده‌سازی اسپرم و انجام لقاح آزمایشگاهی

در سراسر این مطالعه از ویال‌های سیمن منجمد یک گاو هلشتاین با باروری بالا که به صورت تجاری موجود بود، استفاده گردید. پس از ذوب سیمن در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اسپرم‌های متحرک با استفاده از تکنیک شناور سازی (Swim up) جداسازی شدند. جهت انجام لقاح آزمایشگاهی، پس از دو بار شست‌وشو، COCهای بالغ در گروه‌های ۲۵ تا ۳۰ تایی به قطره‌های ۲۰۰ میکرولیتری محیط لقاح (Fert- TALP غنی‌سازی شده با
Penicillamine (20µM), Hypotaurine (10µM), Epinephrine (1µM), Heparin (0.56µg/ml)
و پوشیده شده با روغن معدنی منتقل شدند و اسپرم با غلظت نهایی ۱×۱۰^۶ در هر میلی‌لیتر به قطره‌های لقاح افزوده شد. مجموعه اسپرم و اووسیت‌ها به مدت ۲۰ ساعت در شرایط ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسید کربن، ۵ درصد اکسیژن و با رطوبت حداکثر انکوبه شدند.

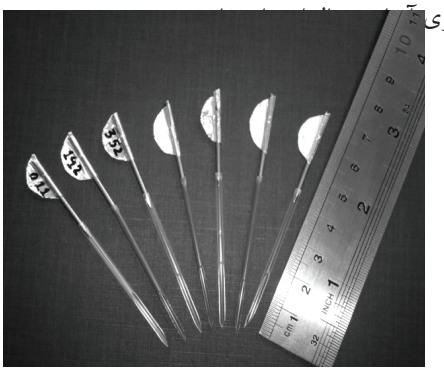
ارزیابی جنین‌ها

تمامی زیگوت‌های فرضی برای یک دوره ۹- ۸ روزه (روز لقاح =روز صفر) در حضور سلول‌های ورو (سلول‌های vero سلول‌های اپی‌تلیال کلیه میمون سبز آفریقایی هستند) به منظور هم‌کشتی استفاده می‌شوند. طبق گزارش هم کشتی جنین‌های گاو با این سلول‌ها منجر به بقا بهتر جنین‌ها در مقایسه با جنین‌های بدون هم‌کشتی با این سلول‌ها شده است (۱۵)) و در شرایط ۳۸/۶ درجه سانتی‌گراد، دی‌اکسیدکربن ۵ درصد، اکسیژن ۵ درصد و رطوبت ۹۰ درصد کشت داده شدند. در روز هفتم جنینی، در هر تکرار (در مجموع ۱۰ تکرار) جنین‌هایی

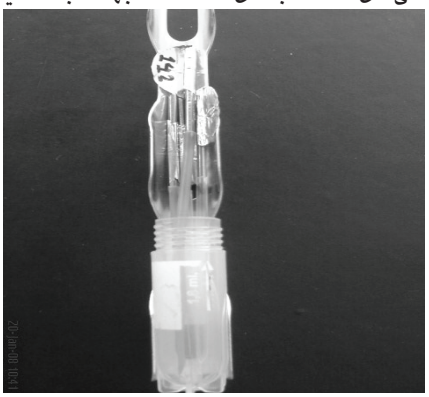
که به مرحله بلاستوسیست رسیدند، به طور تصادفی به دو گروه انجمادی و غیرانجمادی (کنترل) تقسیم شدند. در گروه انجمادی پس از انجماد- ذوب بلاستوسیست‌ها (به منظور حفظ شرایط یکسان در دو گروه انجمادی و کنترل، گروه انجمادی فقط به مدت ۱ ساعت در نیتروژن مایع، نگهداری شدند) حداکثر تا ۴۸ ساعت پس از ذوب مورد ارزیابی قرار گرفتند. گروه غیر انجمادی نیز در طول مدتی که گروه انجمادی در نیتروژن مایع قرار داشتند در شرایط ۳۸/۶ درجه سانتی‌گراد، دی‌اکسیدکربن ۵ درصد، اکسیژن ۵ درصد و رطوبت ۹۰ درصد نگهداری شدند و سپس هم‌زمان با گروه انجمادی، مورد ارزیابی قرار گرفتند (زمان انجماد برای دو گروه انجمادی و کنترل زمان صفر در نظر گرفته شد).

روش آماده‌سازی نی ساده انجمادی

با استفاده از تیغ بیستوری، نوک یک نی انجمادی ۰/۲۵ میلی‌لیتر به صورت مورب بریده شد، به طوری که به راحتی بتوان جنین منجمد شده را در زیر استریومیکروسکوپ با حداقل محیط در نوک آن قرار داد. جهت سنگین کردن نی آماده شده و فرو رفتن آن در ازت مایع، در انتهای دیگر، میله فولادی به طول ۳ سانتی‌متر و با قطر نی در داخل آن قرار داده شد. شکل ۱ و ۲ نی‌های انجمادی دست‌ساز را به همراه قرار گیری



شکل ۱: نی‌های ساده انجمادی آماده شده جهت انجماد شیشه‌ای



شکل۲: طرز قرار دادن نی‌ها درون ریل فریز جهت انتقال به تانک ازت

انجماد بلاستوسیست‌ها (۱۶)

جهت انجماد، بلاستوسیست‌ها ابتدا به مدت ۸ دقیقه در دمای اتاق به محلول تعادل (DMEM+۲۰ درصد FCS غنی شده با ۷/۵ درصد اتیلن‌گلیکول (EG) و ۷/۵ درصد دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)) منتقل شدند و سپس در محلول انجماد (DMEM+۲۰ درصد FCS غنی شده با ۱۵ درصد EG و ۱۵ درصد DMSO و سوکروز ۰/۵ مولار) به مدت یک دقیقه (در دمای اتاق) انکوبه شدند و بلافاصله هر بلاستوسیست با کمترین حجم محلول انجمادی به یک نی ساده انجمادی دست‌ساز منتقل گردید و به مدت ۱ ساعت در نیتروژن مایع قرار داده شد.

گرم (ذوب) کردن بلاستوسیست‌ها

به منظور گرم کردن بلاستوسیست‌ها، پس از خارج کردن نی ساده انجمادی محتوی بلاستوسیست از نیتروژن مایع در محلول اول ذوب (DMEM +۲۰ درصد FCS غنی شده با سوکروز ۱ مولار) به مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس به محلول دوم ذوب (DMEM +۲۰ درصد FCS غنی شده با سوکروز ۰/۵ مولار) به مدت ۳ دقیقه (دمای اتاق) منتقل شد. پس از شست‌وشو تا زمان ارزیابی، در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های ورو در محیط کشت B2 + ۱۰ درصد FCS پوشیده شده با روغن معدنی در انکوباتور ۳۸ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و رطوبت ماکزیمم قرار داده شدند.

رنگ‌آمیزی بلاستوسیست‌ها

جهت تمایز سلول‌های زنده از مرده در رویان‌های شکوفا شده گروه‌های تیماری پس از انجماد (۱۸ بلاستوسیست) و گروه کنترل (۱۰ بلاستوسیست) از روش رنگ‌آمیزی دو گانه پروپدیوم یداید - هوخست -Propidium Iodide)-Hoechst 33342) شرح داده شده به وسیله حسینی و همکاران (۱۷) استفاده شد که به طور خلاصه به شرح زیر است:

ابتدا بلاستوسیست‌های شکوفا شده در محلول فسفات‌بافر گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) (PBS^-) سالین بدون کلسیم و منیزیم شست‌وشو داده شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول رنگ [(300µg/ml) Propidium Iodide & (5µg/ml) Hoechst: 33342)] انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون در رنگ، جهت حذف رنگ باقی‌مانده بلاستوسیست‌ها، سه مرتبه در PBS^- شست‌وشو داده و به سرعت در گلوترآلدئید ۲/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. سپس یک قطره کوچک گلیسیرین را بر روی لام قرار داده و رویان رنگ‌آمیزی شده در آن قرار داده شد و به کمک پارافین جامد، مکعب کوچکی (به قطر رویان و ابعاد لامل) تهیه کرده و روی آن با لامل پوشانده شد. بلاستوسیست‌ها به وسیله میکروسکوپ اپی‌فلورسنت (OLYMPUS با مدل BX 51) مورد ارزیابی قرار گرفتند. سلول‌های مرده (سلول‌هایی که در مرحله اولیه و ثانویه نکروز و مرحله تأخیری آپوپتوز بودند) به رنگ قرمز و سلول‌های زنده به رنگ آبی مشاهده شدند. جهت ارزیابی کیفیت روش انجماد تعداد کل سلول‌ها، تعداد سلول‌های زنده و مرده در گروه انجمادی و غیرانجمادی شمارش و با یکدیگر مقایسه شدند.

تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی

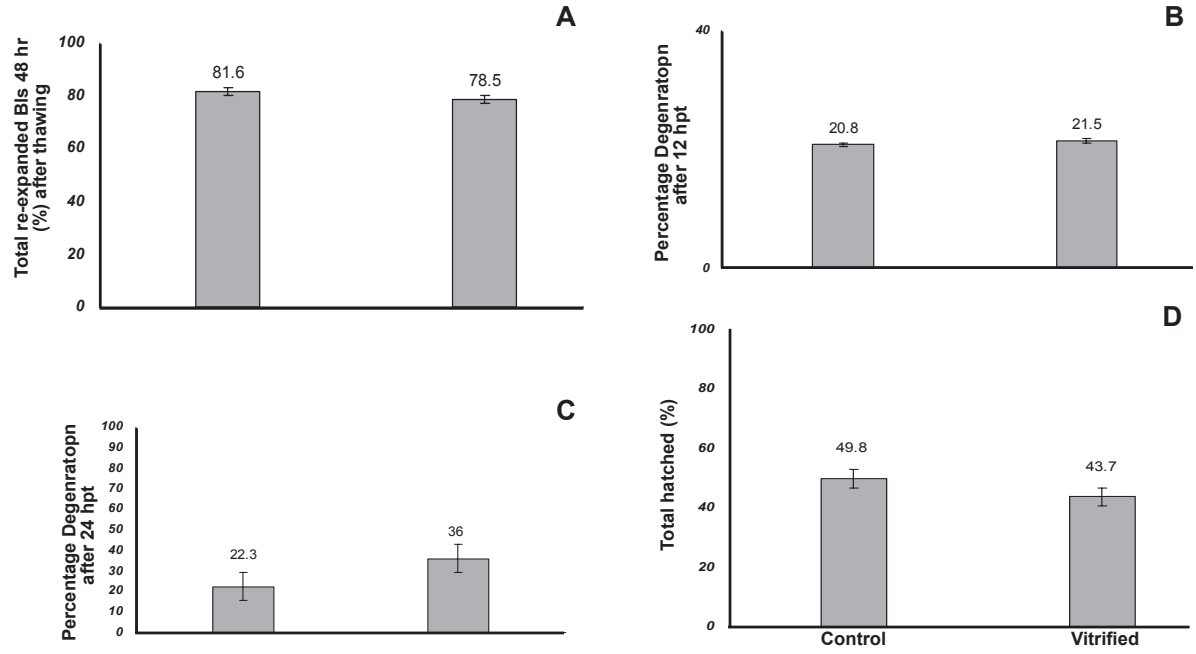
تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی با استفاده از طرح آزمایشی کاملا تصادفی و آنالیز واریانس صورت گرفت و مقایسه بین میانگین گروه‌ها

(تیمارها) با استفاده از نرم‌افزار SAS، آزمون چند دامنه‌ای دانکن Duncan's Multiple Range Test انجام شد.

یافته‌ها

به منظور ارزیابی کیفیت روش انجماد استفاده شده در این تحقیق، جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در هر تکرار (در مجموع ۱۰ تکرار) تا مرحله بلاستوسیست (روز هفتم جنینی) در شرایط آزمایشگاه کشت داده و به صورت تصادفی به دو گروه انجمادی (۱۰۰ بلاستوسیست) و غیرانجمادی (۴۳ بلاستوسیست) تقسیم شدند. در گروه انجمادی، بلاستوسیست‌ها با روش شرح داده شده منجمد و سپس ذوب شدند (با احتساب زمان انجماد به عنوان زمان صفر برای بلاستوسیست‌های گروه انجمادی و کنترل). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان اتساع مجدد بلاستوسیست‌های گروه انجمادی، ۴۸ ساعت پس از ذوب مجدد و بلاستوسیست‌های زنده گروه کنترل در همان زمان، به ترتیب ۰/۰۶۷ ± ۷۸/۵ و ۰/۰۷۲ ± ۸۱/۶ درصد بود که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری (p>۰/۰۵) را نشان نمی‌دهد (نمودار A ۱). هم‌چنین درصد دژنراسیون بلاستوسیست‌ها در گروه انجمادی و گروه کنترل، ۱۲ ساعت پس از ذوب مجدد به ترتیب ۰/۰۶۷ ± ۲۱/۵ و ۰/۰۷۲ ± ۲۰/۸ درصد و ۴۸ ساعت پس از ذوب مجدد به ترتیب ۰/۰۸۲ ± ۳۶ و ۰/۰۸۷ ± ۲۲/۳ درصد بود که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری (p>۰/۰۵) مشاهده نشد (نمودارB، C۱). درصد شکوفایی بلاستوسیست‌های گروه انجمادی (۰/۰۸۳ ± ۴۳/۷ درصد) در مقایسه با گروه کنترل (۰/۰۸۹ ± ۴۹/۸ درصد) کاهش غیرمعنی‌داری (p>۰/۰۵) را از نظر آماری نشان داد (نمودارD۱).

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی بلاستوسیست‌های شکوفا شده گروه انجمادی و کنترل و مقایسه میانگین درصد سلول‌های زنده و مرده جنین‌ها نشان داد که در گروه کنترل از نظر میانگین تعداد کل ۱۶۸/۴ سلول در هر جنین، ۰/۰۲ ± ۹۰/۷۷ درصد سلول‌ها زنده (آبی) و ۰/۰۲ ± ۹/۲۳ درصد سلول‌ها مرده (قرمز) بودند. در حالی که در گروه انجمادی از میانگین ۱۵۷/۷ سلول جنین، ۰/۱۵ ± ۸۸/۸۴ درصد سلول‌ها زنده و ۰/۱۵ ± ۱۱/۱۶ درصد سلول‌ها مرده بودند



نمودار ۱: میزان اتساع مجدد بلاستوسیست‌های گروه انجمادی، ۴۸ ساعت پس از ذوب مجدد و بلاستوسیست‌های زنده گروه کنترل در همان زمان (A). درصد دژنراسیون بلاستوسیست‌ها در گروه انجمادی و گروه کنترل، ۱۲ و ۴۸ ساعت پس از ذوب مجدد (B و C). درصد شکوفایی بلاستوسیست‌های گروه انجمادی و گروه کنترل (D). در تمامی پارامترهای ارزیابی شده این تحقیق اختلاف معنی‌داری (p>۰/۰۵) مشاهده نشد.

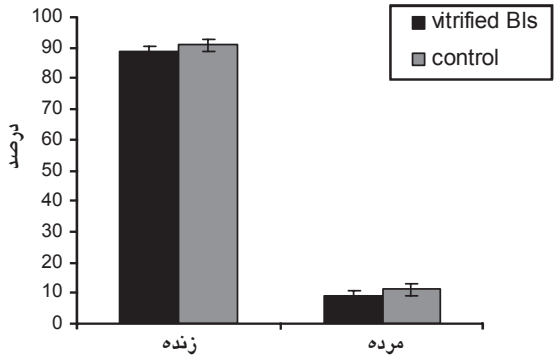
جدول ۱: میانگین تعداد کل سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده و مرده در بلاستوسیست‌های گاوی گروه‌های انجمادی (۱۸ بلاستوسیست) و غیرانجمادی (۱۰ بلاستوسیست) پس از رنگ‌آمیزی

انجمادی	غیر انجمادی	میانگین
۱۵۷/۷	۱۶۸/۴	میانگین تعداد کل سلول‌ها
۱۳۹/۷ (۸۸/۸۴ ±۰/۱۵)	۱۵۴/۲ (۹۰/۷۷ ±۰/۰۲)	میانگین تعداد سلول‌های زنده (درصد)
۱۸ (۱۱/۱۶ ± ۰/۱۵)	۱۴/۲ (۹/۲۳ ± ۰/۰۲)	میانگین تعداد سلول‌های مرده (درصد)

تعداد سلول‌های زنده در جنین‌های انجمادی در مقایسه با گروه غیرانجمادی دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد (p>۰/۰۵).

(جدول ۱، نمودار ۲).

بررسی آماری این داده‌ها بیانگر این است که میانگین تعداد سلول‌های زنده در جنین‌های انجمادی در مقایسه با گروه غیرانجمادی دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشد (p>۰/۰۵).



نمودار۲. میانگین درصد سلول‌های زنده و مرده در بلاستوسیست‌های گاوی گروه‌های انجمادی (۱۸ بلاستوسیست) و غیرانجمادی (۱۰ بلاستوسیست) پس از رنگ‌آمیزی. میانگین درصد سلول‌های زنده و مرده در گروه انجمادی در مقایسه با گروه غیرانجمادی (کنترل) دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشد (p>۰/۰۵).

بحث

امروزه به دلایل علمی و اقتصادی، تولید رویان گاو در شرایط آزمایشگاهی به طور معمول انجام می‌شود. برای استفاده بهینه از این جنین‌ها در هر زمان و مکان، ایجاد روش‌های انجماد موفق جنین‌ها، ضروری است. تلاش‌های زیادی با استفاده از پروتوکول‌های مختلف به منظور انجماد رویان پستانداران به ویژه گاو انجام شده است (۱۸، ۱۹). آنچه که موفقیت پروتوکل را تعیین می‌کند، کیفیت جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی گاو در مرحله بلاستوسیست از نظر میزان بقا بلاستومرها، درصد اتساع مجدد، درصد شکوفایی و درصد دژنره شدن پس از انجماد شیشه‌ای و مقایسه با جنین‌های گروه غیرانجمادی که در شرایط مشابه کشت داده شدند، مهم می‌باشد.

به طور کلی انجماد موفق جنین‌ها در شش مرحله زیر انجام می‌شود: قرار دادن در معرض مواد محافظ انجماد، سرد کردن تا دمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد، ذخیره، ذوب مجدد یا گرم کردن، حذف مواد انجمادی و برگشت به حالت فیزیولوژیکی جنین (۲۰). ثابت شده است که فرایند انجماد جنین‌ها در طی هر یک از مراحل فوق می‌تواند منجر به آسیب انجمادی جنین‌ها شود. آسیب انجمادی می‌تواند در اثر تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی یا برون سلولی، سمیت شیمیایی و آسیب اسموتیک صورت گیرد. این آسیب‌ها وابسته به اندازه و شکل سلول‌ها، نفوذپذیری غشا سلولی، کیفیت و مرحله انجماد جنین، نوع گونه و منشا جنین (جنین تولید شده آزمایشگاهی و یا جنین تولید شده در بدن) می‌باشد (۲۱). انجماد جنین‌ها به کمک مواد محافظ انجمادی صورت می‌گیرد. مواد محافظ انجمادی نفوذپذیر برای آب‌زدایی آب درون سلولی ضروری هستند. به علاوه این مواد، نقطه انجماد را پایین می‌آورند. مواد محافظ انجمادی که به طور معمول برای انجماد جنین استفاده می‌شوند عبارتند از: اتیلن‌گلیکول (۲۲)، گلیسرول (۲۳)، دی‌متیل سولفوکساید (۷). این مواد در غلظت‌های بالا سمی هستند اما در دماهای پایین و یا زمان کم سم بودن این مواد کاهش می‌یابد (۲۴). انتخاب مواد محافظ انجمادی باید بر اساس سمیت، نفوذپذیری، نوع گونه و مرحله انجماد جنین باشد. از طرف دیگر از ترکیب این مواد در غلظت‌های بهینه نیز می‌توان به منظور انجماد جنین استفاده نمود.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان اتساع مجدد و هم‌چنین میزان شکوفایی بلاستوسیست‌های گاوی منجمد شده در گروه انجمادی به ترتیب ۰/۰۶۷ ± ۷۸/۵ درصد و ۰/۰۸۳ ± ۴۳/۷ درصد بود که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری (p>۰/۰۵) با گروه کنترل (۰/۰۷۲ ± ۸۱/۶ درصد و ۰/۰۸۹ ± ۴۹/۸ درصد) مشاهده نشد. این نتایج از دو جهت قابل تامل است: در روش به کار گرفته شده در این تحقیق، بعد از قرار دادن بلاستوسیست‌ها در نوک نی‌های ساده انجمادی، به سرعت به درون ازت مایع منتقل شدند. با توجه به اینکه سرعت انجماد یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده بقا جنین‌ها در یک روش انجمادی می‌باشد، بنابراین روش انجماد سریع بلاستوسیست‌های گاو به کار برده شده در این تحقیق، می‌تواند روش مناسبی باشد. از طرف دیگر نی‌های دست‌ساز به کار گرفته شده در این تحقیق به علت آن که بلاستوسیست‌ها را می‌توان با کمترین حجم مواد انجمادی بر روی آن قرار داد، با کارایی بالایی می‌توانند جهت انجماد بلاستوسیست‌های گاوی مورد استفاده قرار گیرند. لوسین و همکاران با استفاده از انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌ها با استفاده از کرایوتاپ‌های تجاری، میزان حاملگی حاصل از انتقال ۹۷ جنین به بیماران را ۵۷ درصد گزارش کردند. هم‌چنین محققین با استفاده ار انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌های انسانی و به‌کارگیری از کرایوتاپ‌های تجاری، ۵۳ درصد میزان حاملگی و ۴۵ درصد تولد زنده را گزارش کردند. مطالعه مشابهی با تکنیک کرایوتاپ در کولومبیا منجر به ۵۷ درصد حاملگی شده است (۱۲). نتایج حاصل از انتقال جنین‌های منجمد – ذوب شده شواهد محکمی بر ارزشمند بودن روش کرایوتاپ جهت انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌ها می‌باشد (۲۵). این روش، علاوه بر انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌ها می‌تواند جهت انجماد شیشه‌ای اووسیت‌ها نیز مورد استفاده قرار گیرد؛ به طوری که اولین تولد زنده از انتقال بلاستوسیست‌های حاصل از اووسیت‌های منجمد – ذوب شده در آمریکا به وسیله روش کرایوتاپ گزارش شده است (۲۶).

در انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌های گاوی با استفاده از نی‌های ساده انجمادی دست‌ساز در این تحقیق، میزان بالاتری از اتساع مجدد بلاستوسیست‌ها پس از انجماد – ذوب نسبت به تحقیقات ذکر شده در بالا حاصل شد که می‌توان عامل اختلاف این نتایج را تفاوت در محیط‌های کشت استفاده شده جهت کشت جنین ها، سرعت سرد کردن و محلول‌های انجمادی دانست. نتایج انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌های گاو توسط مارتینز و همکاران نشان داد که میزان شکوفایی جنین‌ها پس از انجماد–ذوب ۴۵/۸ درصد بود (۲۷). هم‌چنین در تجربیات انجماد شیشه‌ای جنین‌های گاو توسط ندامبال و همکاران میزان اتساع مجدد بلاستوسیست‌ها، ۲۴ ساعت پس از ذوب و میزان شکوفایی به ترتیب، ۷۱ درصد و ۵۴ درصد گزارش شد (۲۸). این نتایج، مشابه نتایج حاصل از انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌های گاو با استفاده از نی‌های دست‌ساز در این تحقیق می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی پارامترهای ارزیابی شده دراین تحقیق از جمله میزان اتساع مجدد، شکوفایی و درصد دژنراسیون جنین‌های انجمادی و غیرانجمادی این تحقیق، تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان ندادند، لذا به نظر می‌رسد که روش به کار گرفته شده این تحقیق با غلظت استفاده شده مواد محافظ انجمادی فوق، می‌تواند روش مناسبی جهت انجماد جنین‌های آزمایشگاهی گاو در مرحله بلاستوسیست باشد. هم‌چنین نشان دهنده کارامد بودن نی‌های ساخته شده دستی جهت انجماد شیشه‌ای بلاستوسیست‌های گاو و عدم نیاز به خریداری کرایوتاپ‌های تجاری گران قیمت می‌باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از مدیریت محترم پژوهشکده رویان که امکانات تجهیزاتی و هم‌چنین هزینه‌های مادی انجام این طرح را فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. Theriogenology. 2006; 8: 1551-1562.
2. Campos-Chillon LF, Walker DJ, de la Torre-Sanchez JF, Seidel GF, Jr. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. Theriogenology. 2006; 65: 1200-1214.
3. Park SP, Kim EY, Imkim D, Park NH, Won YS, Yoon SH, et al. Simple efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. Hum Reprod. 1999; l 14 (11):2838-2843.
4. Nedambale TL, Dinnyes A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC , Yang X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreservation by slow freezing or vitrification.Theriogenology. 2004; 62:437-449.
5. Rizos D, Ward F, boland MP, lanergand P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. 2001; 56: 1-16.
6. Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C. Perinatal out come of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: A 4-year follow-up study. Fertil Steril; 2005. 84 (1): 88-92.
7. Dattena M, Accardo C, Pilich S, Isachenko V, Mara L, Chessa B, et al. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of bovine blastocysts in vitro produced and *in vivo* derived. Theriogenolog. 2004; 62: 481-493.
8. Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H: Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Cryo-letters. 1997; 17: 191-195.
9. Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Edashige K. Fracture damage of embryos and its preventation during vitrification and warming. Cryobiology. 1996; 33: 459-464.
10. Chung HM, Seung WH, Hong MS. In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. Fertil Steril. 2000; 73: 545-555.
11. Mavrides A, Morroll D. Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete? Reprod Nutr Dev. 2001; 42(1): 73-80.
12. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Morna A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. Fertil Steril. 2006; 85: 108-111.
13. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. Theriogenology. 2007; 67: 73-80.
14. Mavrides A, Morroll D. Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete? Reprod Nutr Dev. 2002; 42: 73-80.
15. Moulavi F, Hosseini SM, Ashtiani SK, Shahverdi A, Nasr-Esfahani MHCan. Vero cell co-culture improve in-vitro maturation of bovine oocytes. Reprod Biomed Online. 2006; 13(3): 404-411.
16. Kelly JM, Kleemann DO, Kuwayama M and Walker SK. 102 vitrification of in vitro-produced bovine and ovine embryos using the minimum volum cooling cryotip method. Reprod, Fertil Dev. 2007; 16(2): 172-173.
17. Hosseini SM, Hajian M, Asgari V, Forozanfar M, Abedi P, Nasr-Esfahani MH. Novel approach for differential viable staining of the blastocyst. IJFS. 2007; 1(3): 103-106.
18. Khurana Nk, Niemanna H. Effect of oocyte quality, oxygen tension embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. Theriogenology. 2000; 45: 741-756.
19. Nguyen BX, Sotomaru Y, Tani T, Katoy Tsunoda Y. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts drived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. Theriogenology. 2000; 53: 1439-1448.
20. Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocytes, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? Reprod Biomed Online. 2003; 7: 623-33.
21.Vagta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems.Theriogenology. 2006; 65: 236-244.
22. Vajta, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve, Tand Callesen H. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. Theriogenology. 1999; 52 (5): 939-948.
23. Men H, Agca Y, Elizabeth S, Critser , John K, Crester. Beneficial effect of serum supplementation during in vitro production of procine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification. Theriogenology. 2005; 64: 1340-1349.
24. Agca Y, Monson RL, Northey DL, Mazni OA, Schaefer DM, Rutledge JJ. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryo: Normal calving, birth weight and gestation lengths. Theriogenology. 1998; 50: 147-162.
25. Stehlik E, Stehlik J, Katajama P, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human Blastocysts. Reprod Biomed. 2005; 11: 53-57.
26. Katayama P, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. Fertil Steril. 2003; 80:

223-224.
27. Martinez AD, Valcarcel A, Heras MA de las, Matos DG de. Furnus G, Brogliatti G. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluation. Animal Reprod Sci. 2002; 73: 11-21.

28. Nedambale TL, Dinnyes A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC , Yang X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreservation by slow freezing or vitrification. Theriogenology. 2004; 62:437-449.