تکوین مورولاها، بلاستوسیست‌های اولیه و ثانویه موش پس از انجماد شیشه‌ای در محیطهای کشت R_2 و R_2+Vero

مسعود عزت‌آبادی‌پور Ph.D.☆♦، احمد حسینی Ph.D.★، حسین بهاروند P.M.S.★
سید نورالدین نعمت‌الهی ماهانی Ph.D.☆، محمدحسین حیدری Ph.D.★
☆ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
★ پژوهشکده رویان، گروه پژوهشی، بالینی جنین‌شناسی
♦آدرس مکاتبه: کرمان، صندوق پستی ۴۴۴، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، گروه آناتومی

چکیده

* **هدف:** هدف از این مطالعه ارزیابی تکوین جنینهای موش در مرحله مورولا، بلاستوسیست اولیه و ثانویه پس از انجماد شیشه‌ای در محیطهای R_2 و R_2+Vero بود.

* **مواد و روشها:** مورولاها، بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه از موشهای ماده نژاد NMRI، پس از تحریک تخمک گذاری به دست آورده شدند. گروهی از آنها را به مدت ۲ دقیقه در معرض EFS ۴۰ درصد مخلوطی از اتیلن گلیکول) و فایکول ۷۰ و سوکروز بود، قرار داده شده و پس از جای دادن در تی ۰/۲۵ میلی‌لیتر به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در معرض بخار نیتروژن و سپس در نیتروژن مایع غوطه ور شدند. پس از ذوب، جنینها به مدت ۵ دقیقه در معرض محلول ۰/۵ مول سوکروز قرار داده شدند. پس از آن دو گروه کنترل و انجمادی به مدت ۵ روز (۱۲۰ ساعت) در محیطهای R_2 یا R_2+Vero کشت داده شدند.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصله، حاکی از زنده بودن درصد بالایی از مورولاها، بلاستوسیست اولیه و ثانویه انجمادی (به ترتیب ۹۵، ۸۵ و ۷۶ درصد) بود. پس از ۴۸ ساعت به ترتیب ۶۳، ۷۰ و ۷۵ درصد در محیط از R_2 و ۶۷، ۷۳ و ۸۰ درصد در محیط R_2+Vero از مورولاها، بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه گروه کنترل به مرحله «در حال خروج از زونا» و «خارج شده از زونا» رسیدند، در حالی که در گروه انجمادی به ترتیب ۲۴، ۱۹ و ۱۲ درصد در محیط R_2 و ۲۸، ۲۲ و ۱۶ درصد در محیط R_2+Vero از مورولاها، بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه به مرحله «در حال خروج از زونا» و «خارج شده از زونا» رسیدند. در روز چهارم کشت و پس از یک تاخیر ۴۸ ساعته نسبت به گروه کنترل ۶۵، ۵۸ و ۴۹ درصد در محیط R_2 و ۷۰، ۶۳ و ۵۶ درصد در محیط R_2+Vero از مورولاها، بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه انجمادی به مرحله «در حال خروج از زونا» و «خارج شده از زونا» رسیدند.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصله از تحقیق حاضر حاکی از این است که محیطهای کشت R_2 و R_2+Vero در کمک به تکوین جنینهای گروه انجمادی قابلیتهای تقریباً یکسانی دارند و از این رو می‌توان به جای استفاده از محیطهای هم کشتی از محیط کشت R_2 که کم هزینه‌تر و راحت‌تر استفاده کرد. تاخیر ۴۸ ساعته تکوین جنینهای انجمادی نسبت به گروه کنترل حاکی از آسیب جنینها در طی انجماد و ذوب می‌باشد و آسیبهای وارده به جنین متعاقب انجماد شیشه‌ای برگشت‌پذیر است و نیاز به زمان دارد.

گل واژگان: مورولا، بلاستوسیست، موش، انجماد شیشه‌ای، هم‌کشتی

مقدمه

انجماد جنین که امروزه به طور وسیعی در بسیاری از گونه‌های پستانداران مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱)، برای اولین بار توسط وتینگهام در سال ۱۹۷۲ گزارش شد (۲) و با اینکه روش ابداعی آنها مفید و موثر بود و به عنوان یکی از مطمئن‌ترین روشهای نگهداری جنین به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفت (۳)، به دلیل نیاز به زمان طولانی و تجهیزات بسیار برای منجمد کردن، تلاشهای بسیاری را برای یافتن روشی که ساده‌تر و در مدت زمان کوتاه‌تری قابل انجام باشد، برانگیخت (۴، ۵). از میان این تلاشها انجماد شیشه‌ای[1] توسط Rall و Fahy در سال ۱۹۸۵ گزارش شد (۶) و اکنون به عنوان روشی با قابلیتهای بسیار در مقابل انجماد آهسته مورد توجه قرار گرفته است (۷). انجماد شیشه‌ای به معنای سفت شدن یک محلول[2] در طی فرآیند انجماد (به علت افزایش فوق‌العاده غلظت محلول و نه به دلیل تشکیل بلورهای یخ) می‌باشد (۸). برای انجام انجماد شیشه‌ای موفق در نیتروژن مایع می‌بایست ضدیخ پس از عبور از غشا[3] در داخل سلول با غلظت بالا متمرکز شود تا از تشکیل بلورهای یخ در داخل سلول، که نابود کننده سلول است جلوگیری کند (۹).

اما جنین در طی مراحل آماده کردن برای انجماد و همچنین به هنگام منجمد و ذوب شدن، در معرض خطرات متعددی می‌باشد، از جمله این خطرات می‌توان به سمیت ضدیخ (۱۰)، تشکیل بلورهای یخ در داخل و خارج سلول (۱۱)، صدمه ناشی از سرد کردن[4] به علت وجود قطرات لیپید در داخل سیتوپلاسم (۱۲)، صدمه ناشی از شکستگی[5] به علت تغییرات ناهمسان حجمی در فازهای مایع و جامد (۱، ۱۳)، تورم اسمزی (Osmotic Swelling) (۱۴) و چروکیدگی اسمزی (Osmotic Shrikage) (۱۵) اشاره نمود.

با وجود اینکه انجماد شیشه‌ای خطر بالقوه آسیب سلولی به واسطه تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی را از بین می‌برد، اما صدمه شیمیایی و اسموتیک که به واسطه غلظت بالای ضدیخ ایجاد می‌شود هنوز به قوه خود باقی است (۱۶). یکی از آسیبهای سلولی جنین در طی انجماد، آسیبی است که به پروتئینهای سلول وارد می‌شود، از جمله این آسیبها می‌توان به تغییر ماهوی (Denaturation) آنزیمهای اختصاصی، تخریب پمپهای یونی غشایی و دیگر اختلالاتی که در ساختمان و عمل سلول رخ می‌دهد اشاره کرد (۱۰). به عنوان مثال بعضی از پروتئینهای مسئول انعطاف پذیری غشا در طی انجماد آسیب می‌بینند (یک فرضیه)، که سنتز آنها در طی کشت، پس از انجماد و ذوب، از سر گرفته می‌شود (۱۷). گزارش Lane و همکارانش در سال ۲۰۰۰ حاکی از کاهش فعالیت دو پروتئین تنظیم کننده pH داخل سلولی در جنینهای دو سلولی هامستر پس از انجماد شیشه‌ای بود (۱۸). Leclerc و همکارانش در سال ۱۹۹۴ و Zhao و همکارانش در سال ۱۹۹۵ و Lane و همکارانش در سال ۱۹۹۸ و ۱۹۹۹ گزارش کردند که توانایی جنینهای در حال انجام تقسیمات کلیواژی در حفظ ظرفیت تکاملی (Development Competence) در محیط کشت به توانایی آنها در تنظیم pH داخل سلولی بستگی دارد (۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲). هر چند که اثرات انجماد بر مکانیسمهای هومئوستاتیک جنین شناخته نشده است (۱۸). Damien و همکارانش در سال ۱۹۹۰ کاهش pH داخل سلولی را در زیگوتهای موش که به مدت ۲-۷ دقیقه در معرض پروپاندیول قرار گرفته بودند، گزارش کردند (۲۳). این احتمال وجود دارد که از دست رفتن ظرفیت تکاملی در پی انجماد ممکن است به دلیل اختلال در مکانیسمهای تنظیم کننده ثبات داخلی یونها به خصوص pH داخل سلولی باشد (۱۸). نتایج Kasai و همکارانش در سال ۱۹۹۰ حاکی از تکوین ۹۷ تا ۹۸ درصد مورولاهای منجمد شده تا مرحله بلاستوسیست گسترش یافته (Expanded Blastocyst) بود (۲۴). البته باید توجه داشت که از سرگیری مجدد تکوین طبیعی جنین پس از ذوب (Thawing)، به علت بازیابی تدریجی و آرام فعالیت متابولیک و سنتیک طبیعی جنین، نیازمند زمان می‌باشد و بستگی به شرایط کشت دارد (۲۵).

به منظور تدارک محیط کشتی مناسب برای تکامل جنین در شرایط آزمایشگاهی (*In-Vitro*) تلاشهای بسیاری صورت گرفته است. استفاده از سیستمهای هم‌کشتی (Co-Culture) و محیطهای کشت متوالی (Sequential Culture Media) از جمله این تلاشهاست. از طرفی اگرجنین موش را در محیطی که فاقد سرم و یا پروتئین باشد کشت دهیم، دچار یک توقف رشد (Blastocyst Block) خواهد شد، که می‌توان از طریق سیستم هم‌کشتی با تک لایه سلولهای Vero و یا یک محیط کشت مناسب (Conditioned Medium, CM) و یا پپتیدهای استخراج شده از CM بر آن فائق آمد (۲۶). وزیکلهای تروفوبلاستیک، تک لایه‌های سوماتیک و جنین جوجه سه روش هم‌کشتی می‌باشند (۲۷). سلولهای رحمی (۲۸)، سلولهای لوله رحمی (۲۹) و سلولهای Vero (۳۰) از جمله سلولهای سوماتیکی هستند که با موفقیت به کار گرفته شده‌اند. تهیه سلولهای Vero، که از کلیه میمون سبز آفریقایی تهیه می‌شوند و منشاء مشترک جنینی یا سیستم تناسلی دارند و از نظر آلودگی ویروسی و دیگر آلودگیها قابل کنترل هستند، ارزانتر و کار با آنها آسانتر است (۳۰). سلولهای Vero به عنوان یک بافر بین جنین و محیط اطراف، جنین را از استرسهای محیطی حفاظت می‌کنند (۳۱). Weimer و همکارانش در سال ۱۹۸۹ نیز نشان دادند که سلولهای سوماتیک در سیستم هم‌کشتی، جنین را در خارج شدن از زونا یاری می‌کنند (۳۲).

از طرف دیگر، نیازهای جنین در مراحل مختلف تکوین متفاوت می‌باشد، به طوری که غلظت گلوکز از اویداکت به طرف رحم افزایش یافته، در حالی که غلظت پیروات و لاکتات کاهش پیدا می‌کند (۳۳، ۳۴). جنین تا مرحله هشت سلولی - مورولا برای تامین انرژی از چرخه کربس استفاده می‌کند و از آن زمان به بعد از گلیکولیز هم استفاده خواهد کرد (۳۵). استفاده از همه اسیدهای آمینه از

1. Vitrification
2. Solidification
3. Cell membrane
4. Chilling Injury
5. Fracture Demage

مرحله هشت سلولی - مورولا به بعد باعث افزایش توان زیستی یا افزایش توان لانه گزینی جنینها پس از انتقال به رحم می‌شود (۳۶)، از این رو است که استفاده از محیطهای کشت متوالی متداول شده است (۳۷، ۳۸) و با توجه به این مهم، بهاروند و رضازاده محیطهای R_1 و R_2 را بر اساس محیطهای G_1 و G_2 طراحی کردند (۳۹). محیط R_1 که برای ۴۸ ساعت اولیه کشت جنین و تا مرحله ۸ سلولی - مورولا به کار می‌رود، حاوی گلوکز کم، پیروات و لاکتات زیاد، اتیلن دی آمین تتراستیک‌اسید (EDTA)، اسیدهای آمینه غیر ضروری ایگل و گلوتامین بوده و محیط R_2، که برای کشت جنین بعد از مرحله مورولا مناسب می‌باشد، حاوی گلوکز زیاد پیروات و لاکتات کم و همه اسیدهای آمینه و ویتامینهای ایگل است (۴۰). لذا هدف از این تحقیق، مطالعه اثر محیط کشت R_2 و هم‌کشتی (با سلولهای Vero) در محیط R_2 بر مورولاها، بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه منجمد و ذوب شده موش و ارزیابی محیطهای کشت فوق در ترمیم آسیبهای ناشی از انجماد است.

مواد و روشها

* تحریک تخمک گذاری

موشهای ماده غیر هم خون (Outbred) نژاد NMRI، از انستیتوپاستور ایران با سن ۴ هفته تهیه و دو هفته در حیوانخانه با ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در روز، دمای ۲۰° سانتیگراد و تغذیه با غذای موش نگهداری شدند. سپس به منظور تحریک تخمک گذاری، ابتدا در ساعت ۱۳ روز اول، ۱۰ واحد بین‌المللی از HMG (Organon) یا هورمون منوپوز انسانی به صورت IP Intraperitioneal و پس از ۴۸ ساعت ۱۰ واحد بین‌المللی HCG (Organon) به صورت IP تزریق گردید و در قفس هر موش نر از همان نژاد دو موش ماده رها کرده تا جفت‌گیری انجام شود. صبح روز بعد به منظور اطمینان از انجام جفت‌گیری، وازن موشهای ماده را برای یافتن پلاک جفت‌گیری (VP) مورد معاینه قرار داده و موارد پلاک مثبت جدا شدند.

* تهیه جنینهای مورولا بلاستوسیست اولیه و ثانویه

۹۱ تا ۹۴ ساعت (صبح روز چهارم) پس از تزریق hCG، موشها را بروش Cervical Dislocation (نخاعی کردن) کشته و پس از باز کردن حفره شکم، شاخهای رحم[1] را در قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری از محیط R_2 حاوی سرم آلبومین انسانی قرار داده و پس از فلاشینگ Flushing، تزریق مایع با فشار از انتهای دیستال شاخ رحم با استفاده از یک سرنگ انسولین و سر سوزن شماره ۲۶ استریل تا جنینها از انتهای دیگر شاخ رحم خارج شوند، جنینها (مورولا، بلاستوسیست اولیه و ثانویه) را به دست آورده و پس از چند بار شستشو در قطره‌های تمیز و جداکردن جنینهای مراحل مختلف، آنها را به گروههای مساوی کنترل و آزمون تقسیم کرده و سپس گروههای کنترل برای کشت در محیطهای R_2 حاوی سرم آلبومینی انسانی و R_2+Vero آماده شدند.

گروههای آزمون نیز پس از انجماد و ذوب در محیطهای فوق کشت داده شدند.

* گروههای آزمون و کنترل

در مجموع دوازده گروه، شش گروه آزمون و شش گروه کنترل وجود داشت:

گروههای آزمون: مورولاها، بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه منجمد و ذوب شده که در محیطهای کشت R_2 یا R_2+Vero کشت داده شدند.

گروههای کنترل: مورولاها، بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه منجمد نشده که در محیطهای R_2 و R_2+Vero کشت داده شدند.

* محیطهای کشت

محیطهای کشت مورد استفاده در این تحقیق عبارت بود از:

- محیط کشت R_2، مطابق با روش بهاروند و رضازاده (۳۹).
- هم‌کشتی سلولهای Vero در محیط R_2.
- محیط کشت MEMα (Sigma, MO644).

و سرم مورد استفاده در این مطالعه سرم آلبومین انسانی بود.

* تهیه و پاساژ سلولهای Vero

پس از تهیه سلولهای Vero به صورت منجمد از انستیتوپاستور ایران، ابتدا ویال حاوی سلولها را در آب ۳۷° سانتیگراد ذوب کرده و پس از دوبار شستشو با محیط کشت MEMα حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) (Gibco)، در یک فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری استریل به مدت ۳-۴ روز کشت داده شد. پس از حذف محیط کشت، آنزیم تریپسین EDTA را اضافه کرده تا سلولها از کف فلاسک کنده شوند. سپس محیط MEMα+20% FCS را اضافه کرده و پس از دوبار سانتریفوژ محیط روی آنرا دور ریخته و دوباره محیط حاوی سرم را به آن اضافه و بعد به صورت 2000cell/50μ1 اقدام به قطره‌گذاری شد.

* هم‌کشتی سلولهای Vero در محیط کشت R_2

ابتدا از سلولهای Vero که در محیط MEMα قرار داشتند، در زیر هود و با حفظ شرایط استریل در یک دیش ۳۵ میلی‌متری اقدام به قطره گذاری شد. پس از حدود سه روز که سلولهای Vero بیش از ۶۰ درصد کف قطره محیط کشت را پوشاندند، محیط روی سلولهای Vero با محیط کشت جدید R_2 دارای سرم آلبومین انسانی عوض شد و در انکوباتور CO_2 دار ۵ درصد و دمای ۳۷° سانتیگراد و دارای رطوبت به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند تا شرایط برای هم‌کشتی فراهم گردد. سپس جنینهای گروه کنترل و آزمون را در قطره‌های جداگانه قرار داده تا به رشد خود ادامه دهند و نتایج رشد و تکامل آنها به طور ۲۴ ساعته

1. Uterin Horn

و با کمک میکروسکوپ معکوس ثبت شد.

* روش انجماد و ذوب

روش انجماد مورد استفاده در این تحقیق، انجماد شیشه‌ای بود و جنینها با استفاده از روش Kasai (۹) منجمد و ذوب شدند که به طور خلاصه به صورت ذیل بود:

* محلولهای انجماد و ذوب

۱) محلول مورد استفاده در این تحقیق EFS40 بود که ترکیبی از ۴۰ درصد اتیلن گلیکول (Aldrich, 29, 323-7)، ۱۸ درصد فایکول ۷۰ (Sigma, MW 70000, F-2878) و ۰/۳ مولار سوکروز (Merck, 7653) است. برای تهیه آن ابتدا محلول PBI با ترکیبی از PBS[1] و ۰/۱ گرم در لیتر استرپتومایسین و ۰/۰۶ گرم در لیتر پنی‌سیلین G و ۰/۳۳ میلی‌گرم پیروات، تهیه و از یک فیلتر عبور داده شد. سپس ۱۵ گرم فایکول ۷۰ به ازای هر ۳۵/۱ میلی‌لیتر محلول PBI یک فلاسک ۵۰ میلی‌لیتری حل گردید (فایکول ۷۰ به سختی در PBI حل می‌شود و به مدت یک شب برای حل آن زمان لازم است). پس از آن ۸/۵۶ گرم سوکروز به ازای هر ۳۵/۱ میلی‌لیتر محلول PBI و بعد ۱۰۵ میلی‌گرم BSA به ازای هر ۳۵/۱ میلی‌لیتر از PBI اضافه شد. برای تهیه ۱۰ میلی‌لیتر از محلول انجمادی (EFS40) برابر روش کاسایی (۹) ۴ میلی‌لیتر اتیلن گلیکول و ۶ میلی‌لیتر محلول تهیه شده فوق در یک لوله ۱۰ میلی‌لیتری مخلوط گردید.

۲) محلول ذوب، برای تهیه ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ مولار سوکروز، ۰/۸۵۵ گرم سوکروز در ۵ میلی‌لیتر PBI حل و پس از عبور دادن از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری، در دمای ۴° سانتیگراد نگهداری شد.

روش انجماد: ابتدا درجه حرارت اطاق را اندازه‌گیری کرده، که باید حدود ۲۰° سانتیگراد باشد و البته دمای تمام وسایل و محلولهای مورد استفاده نیز باید در این درجه حرارت تنظیم شده باشد. سپس از هر یک از محلولهای ذوب و انجماد (EFS40) قطره‌ای، در داخل دو دیش ۳۵ میلی‌متری گذاشته (به طوری که در هر دیش یک قطره وجود داشته باشد) و به ترتیب زیر به داخل یک نی ۰/۲۵ میلی‌لیتری (IMV, The genuine cassou straw, France) که از قبل علامت گذاری شده بود، کشیده شد: ۶۰ میلی‌متر محلول ذوب، ۱۵ میلی‌متر هوا، ۳ میلی‌متر محلول انجماد، ۴ میلی‌متر هوا و ۱۳ میلی‌متر محلول انجماد. پس از آن جنینها با استفاده از یک پیپت دارای کنترل کننده دهانی، به قطره‌ای از محلول انجماد در داخل یک دیش ۳۵ میلی‌لیتری منتقل شدند، در حالی که انتقال آنها با استفاده از یک میکروسکوپ استرئو (hund watzlar SM23) کنترل می‌شد، جنینها را به مدت ۲ دقیقه در آن نگهداشته (Equilibration time) سپس با پیپت پاستور دیگری جنینها جمع شده و به ستون ۱۳ میلی‌متری از محلول انجماد موجود در نی منتقل شدند، به دنبال آن به ترتیب یک ستون ۴ میلی‌متری هوا، یک ستون ۳ میلی‌متری محلول انجماد و یک ستون ۵ میلی‌متری هوا در نهایت یک ستون از محلول ذوب را کشیده و انتهای نی پلاک شد. پس از آن نی‌ها به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در بخار نیتروژن نگهداشته و سپس به داخل نیتروژن مایع غوطه ور شدند.

روش ذوب: برای ذوب نی‌ها، پس از خروج نی از تانک نیتروژن مایع، ابتدا ۱۵ ثانیه در هوا نگهداشته و بعد وارد آب ۲۰° سانتیگراد شدند، تا محتویات داخل نی ذوب شود. پس از قطع پلاکهای دو انتهای نی، محتویات نی به داخل قطره‌ای از محلول ذوب منتقل گردد. در مرحله بعد جنینها وارد قطره دیگری از محلول شده و پس از چند بار شستشو در محیط کشت R_2، گروهی وارد قطره‌ای از محیط کشت R_2 و گروهی دیگر وارد قطره‌ای از سلولهای Vero حاوی محیط کشت منتقل شدند.

* ارزیابی جنینها

جنینها با استفاده از میکروسکوپ اینورت (Hund Wilovert, Wetzlar) و بزرگنمایی ×۱۰۰ و ×۲۰۰ و در پنج روز متوالی مورد ارزیابی قرار گرفتند و بر اساس معیارهای زیر، ابتدا در یکی از سه دسته مورولا، بلاستوسیست اولیه و ثانویه و سپس در طی تکوین در یکی از گروههای بلاستوسیست گسترش یافته (Expanded Blastocyst)، بلاستوسیست در حال خروج از زونا (Hatching Blastocyst) و بلاستوسیست خارج شده از زونا (Hatched Blastocyst) قرار داده شدند:

- مورولا، به جنینهای متراکم شده‌ای که فاقد بلاستوسل بودند.
- بلاستوسیست اولیه، به جنینهایی که حفره بلاستوسل آنها کمتر از نصف حجم جنین بود.
- بلاستوسیست ثانویه به جنینهایی که حفره بلاستوسل آنها بزرگتر از نصف حجم جنین بود.
- بلاستوسیست گسترش یافته، به جنینهایی که علاوه بر داشتن حفره بلاستوسل بزرگ، حجم جنین نسبت به حجم اولیه نیز افزایش یافته و زونا پلوسیدا[2] نازک بود.
- بلاستوسیست در حال خروج از زونا (Hg, Hatching)، که تروفواکتودرم شروع به خروج از zona کرده بود (Herniation).
- بلاستوسیست خارج شده از زونا (Hd, Hatched)، به بلاستوسیستهایی که کاملاً از زونا خارج شده بودند.

* تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه میزان زنده ماندن جنینهای انجمادی و کنترل با هم و در طی روزهای متوالی کشت با استفاده از آزمون مربع کای[3] (Chi-Square Test) انجام شد.

یافته‌ها

* میزان زنده بودن جنینها پس از انجماد شیشه‌ای

نتایج حاصله در جدول ۱ آمده است. معیارهای ما برای نبودن

1. Dulbecco's Phosphate-buffer Salin
2. Zona Pellucida
3. Chi-Square Test

جنینها پس از انجماد عبارت بود از:

۱) Fragmentation و واکوئله بودن بلاستومرهای جنین

۲) جنینهای با مشخصه فوق در قطره‌ای جداگانه به مدت ۳-۵ روز نگهداری شده و عدم پیشرفت تکوینی

تعداد مورولاهای زنده پس از انجماد شیشه‌ای با تفاوت کاملاً معنی‌داری از بلاستوسیستهای اولیه (P=0.0007) و ثانویه (P=0.0001) بیشتر بود. تعداد بلاستوسیستهای اولیه زنده پس از انجماد شیشه‌ای نیز با تفاوت معنی‌داری بیشتر از بلاستوسیستهای ثانویه بود (P=0.0175).

جدول ۱: درصد زنده بودن جنینها پس از انجماد شیشه‌ای

	تعداد جنین پس از ذوب	تعداد جنین زنده (درصد)
مورولا	۲۰۸	۱۹۸(۹۵)
بلاستوسیست اولیه	۲۴۷	۲۱۰(۸۵)
بلاستوسیست ثانویه	۲۸۹	۲۲۱(۷۶)

* مقایسه تکوین مورولاها، بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه در گروههای کنترل و انجمادی

این نتایج نشان داد که با وجود اینکه درصد بالاتری از مورولاهای گروه کنترل در محیط R_2 در طی ۱۲۰ ساعت به مرحله Hg و Hd رسیدند (۸۵ درصد) اما نسبت به گروه انجمادی در محیط R_2 (۷۱ درصد) تفاوت معنی‌داری نداشتند (P>0.05). البته بین تعداد بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه گروه کنترل در محیط R_2 که به مرحله Hg و Hd رسیدند (به ترتیب ۸۸ و ۹۲ درصد) نسبت به گروه انجمادی مربوط به خود (به ترتیب ۶۳ و ۵۳ درصد) تفاوت معنی‌داری وجود دارد، (به ترتیب عبارت بود از P=0.01 برای بلاستوسیستهای اولیه و P<0.00001 برای بلاستوسیستهای ثانویه). بالاترین درصد Hg و Hd در گروه کنترل و در محیط R_2، متعلق به گروه بلاستوسیستهای ثانویه (۹۲ درصد) و بالاترین درصد Hg و Hd در گروه انجمادی متعلق به مورولاها (۷۱ درصد) بود.

مقایسه تکوین مورولاهای گروه کنترل در محیط R_2+Vero پس از ۱۲۰ ساعت که به مرحله Hg و Hd رسیدند (۸۸ درصد) در برابر گروه انجمادی مربوطه (۷۷ درصد) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>0.05). اما بین تعداد بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه گروه کنترل در محیط R_2+Vero پس از ۱۲۰ ساعت که به مرحله Hg و Hd رسیدند (به ترتیب ۹۰ درصد و ۹۵ درصد) و گروه انجمادی مربوطه (به ترتیب ۶۸ درصد و ۶۰ درصد) تفاوت معنی‌دار وجود دارد (به ترتیب عبارت بود از P=0.009 و P<0.0001). در اینجا هم با اینکه بالاترین درصد Hg و Hd مربوط به بلاستوسیستهای ثانویه گروه کنترل در محیط R_2+Vero بود (۹۵ درصد)، بالاترین درصد Hg و Hd گروه انجمادی و در محیط R_2+Vero مربوط به مورولاها بود (۷۷ درصد).

مقایسه تکوین مورولاها و بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه گروه کنترل در محیط R_2 (به ترتیب ۸۵ و ۸۸ و ۹۲ درصد) و محیط R_2+Vero (به ترتیب ۸۸ و ۹۰ و ۹۵ درصد) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

مقایسه تعداد مورولاها، بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه گروه انجمادی در محیط R_2 نسبت به محیط R_2+Vero که به مرحله Hg و Hd رسیدند (به ترتیب ۷۱ و ۶۳ و ۵۳ درصد در محیط R_2 و ۷۷ و ۶۸ و ۶۰ درصد در محیط R_2+Vero) نیز تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

* مقایسه تکوین جنینهای کنترل و انجمادی در طی ۱۲۰ ساعت

مقایسه تکوین جنینهای انجمادی و کنترل در طی ۱۲۰ ساعت و در محیطهای R_2 و R_2+Vero، نشان داد که حداکثر تکوین جنینهای گروه کنترل (مورولا، بلاستوسیست اولیه و ثانویه) در طی ۲۴ ساعت اول و دوم صورت می‌گیرد، به عبارت دیگر در طی ۴۸ ساعت اول کشت اکثریت جنینهای گروه کنترل (بین ۶۳ تا ۸۰ درصد) به مرحله Hg و Hd رسیدند و پس از آن یعنی در طی ۷۲ ساعت بعدی، منحنی تعداد جنینهایی که به مرحله Hg و Hd رسیدند، تقریباً حالت پلاتو پیدا کرد، در حالی که منحنی تعداد جنینهای انجمادی که در طی ۱۲ ساعت کشت به مرحله Hg و Hd رسیدند، نشان داد که جنینهای انجمادی (مورولا، بلاستوسیست اولیه و ثانویه) پس از یک تاخیر ۲۴ و ۴۸ ساعته نسبت به گروه کنترل به میزان حداکثر رسیدند.

مورولاها و بلاستوسیستهای اولیه انجمادی با ۲۴ ساعت تاخیر و در طی ۲۴ ساعت سوم کشت در محیطهای R_2 و R_2+Vero با تفاوت معنی‌داری نسبت به ۲۴ ساعت دوم به مرحله Hg و Hd رسیدند (در محیط R_2 به ترتیب P<0.05 و P<0.05 و در محیط R_2+Vero به ترتیب P<0.005 و P=0.005). در حالی که پس از آن دیگر تفاوت معنی‌داری در تعداد جنینهای انجمادی که به مرحله Hg و Hd رسیدند مشاهده نشد. بیشترین تعداد جنینهای انجمادی که به مرحله Hg و Hd رسیدند متعلق به گروه مورولاهایی بود که در محیط R_2+Vero کشت داده شده بودند (FMrv). از طرف دیگر اکثریت بلاستوسیستهای ثانویه انجمادی با ۴۸ ساعت تاخیر و در طی ۲۴ ساعت چهارم به مرحله Hg و Hd رسیدند، به طوری که تفاوت معنی‌دار در تعداد بلاستوسیستهای ثانویه که به مزحله Hg و Hd رسیدند، تنها در ۲۴ ساعت چهارم نسبت به ۲۴ ساعت سوم (در محیطهای R_2 و R_2+Vero به ترتیب عبارت بود از P<0.05 و P<0.05)، یعنی با ۲۴ ساعت تاخیر نسبت به مورولا و بلاستوسیستهای اولیه انجمادی، تعداد زیادی از بلاستوسیستهای ثانویه انجمادی به مرحله Hg و Hd رسیدند. در اینجا نیز بیشترین تعداد بلاستوسیستهای ثانویه انجمادی که به مرحله Hg و Hd رسیدند متعلق به گروه بلاستوسیستهای ثانویه‌ای بود که در محیط R_2+Vero کشت داده شده بودند. لیکن تفاوت معنی‌داری در تعداد بلاستوسیستهای ثانویه انجمادی که به مرحله Hg و Hd رسیدند بین محیط R_2 و R_2+Vero مشاهده نشد (P>0.05).

جدول ۲: تکوین مورولاها درگروه کنترل و انجمادی، اعداد داخل پرانتز به درصد می‌باشد.

گروهها	تکرار	تعداد	مورولا پس از انجماد و در محیطهای R_2 و R_2+Vero طی پنج روز کشت				
			Hd,Hg	Hd,Hg	Hd,Hg	Hd,Hg	Deg. Hd,Hg
Days			۱	۲	۳	۴	۵
CMr	۵	۵۴	۱۱(۲۰)	۲۳(۴۲)c	۳۹(۷۲)a	۲۳(۸۱)	۴۶(۸۵)	۲(۴)
FMr	۶	۴۹	۶(۱۲)	۱۲(۲۴)	۲۵(۵۱)	۲۲(۶۵)	۲۵(۷۱)	۵(۱۰)
CMrv	۵	۴۸	۱۱(۲۲)	۳۲(۶۷)c	۳۷(۷۷)	۴۰(۸۳)	۲۲(۸۸)	۰(۰)
FMrv	۶	۴۷	۸(۱۷)	۱۲(۲۸)	۲۸(۶۰)	۲۲(۷۰)	۲۶(۷۷)	۳(۴)

CMr: مورولاهای گروه کنترل در محیط کشت R_2، FMr: مورولاهای انجمادی در محیط کشت R_2، CMrv: مورولاهای گروه کنترل در محیط کشت R_2+Vero، FMrv: مورولاهای انجمادی در محیط کشت R_2+Vero، Deg: بلاستوسیستهای دژنره شده، Hg و Hd: بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا (Hg) و خارج شده از زونا (Hd)، 1-5 روزهای کشت یک تا پنج، سطوح معنی‌دار بودن: a; P<0.05 b; P<0.01 C; P<۰/۰۰۱

جدول ۳: تکوین بلاستوسیستهای اولیه در گروههای کنترل و انجمادی، اعداد داخل پرانتز به درصد می‌باشد

گروهها	تکرار	تعداد	مورولا پس از انجماد و در محیطهای R_2 و R_2+Vero طی پنج روز کشت				
			Hd,Hg	Hd,Hg	Hd,Hg	Hd,Hg	Deg. Hd,Hg
Days			۱	۲	۳	۴	۵
CEBr	۵	۴۲	۱۱(۲۶)a	۳۰(۷۰)c	۳۲(۷۹)c	۲۶(۸۴)a	۲۸(۸۸)a	۱(۲)
FEBr	۶	۴۲	۳(۷)	۸(۱۹)	۱۸(۴۲)	۲۵(۵۸)	۲۷(۶۴)	۴(۹)
CEBrv	۵	۵۱	۱۵(۲۹)b	۲۷(۷۲)c	۴۲(۸۲)c	۴۳(۸۶)b	۴۶(۹۰)b	۱(۲)
FEBrv	۶	۷۲	۷(۱۰)	۱۶(۲۲)	۲۳(۳۵)	۴۴(۶۳)	۵۰(۶۸)	۳(۴)

CEBr: بلاستوسیستهای اولیه گروه کنترل در محیط R_2، FEBr: بلاستوسیستهای اولیه انجمادی در محیط کشت R_2، CEBrv: بلاستوسیستهای اولیه گروه کنترل در محیط کشت R_2+Vero، FEBrv: بلاستوسیستهای اولیه انجمادی در محیط کشت R_2+Vero، Deg: بلاستوسیستهای دژنره شده، Hg و Hd: بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا (Hg) و خارج شده از زونا (Hd)، سطوح معنی‌دار بودن: a:P<0.05 b;P<0.01 C;P<0.001

جدول ۴: تکوین بلاستوسیستهای ثانویه در گروههای کنترل و انجمادی، اعداد داخل پرانتز به درصد می‌باشد

گروهها	تکرار	تعداد	مورولا پس از انجماد و در محیطهای R_2 و R_2+Vero طی پنج روز کشت				
			Hd,Hg	Hd,Hg	Hd,Hg	Hd,Hg	Deg. Hd,Hg
Days			۱	۲	۳	۴	۵
CLBr	۸	۷۹	۲۷(۳۴)c	۵۹(۷۵)c	۶۸(۸۶)c	۷۱(۹۰)c	۷۲(۹۲)c	۲(۳)
FLBr	۵	۵۱	۲(۴)	۶(۱۲)	۱۴(۲۷)	۲۵(۴۹)	۲۷(۵۲)	۶(۱۲)
CLBrv	۵	۵۶	۲۲(۳۹)c	۴۵(۸۰)c	۵۱(۹۱)c	۵۲(۹۳)c	۵۲(۹۵)c	۲(۴)
FLBrv	۴	۴۵	۲(۷)	۷(۱۶)	۱۲(۲۱)	۲۵(۵۶)	۲۷(۶۰)	۲(۷)

CLBr: بلاستوسیستهای ثانویه گروه کنترل در محیط کشت R_2، FLBr: بلاستوسیستهای ثانویه انجمادی در محیط کشت R_2، CLBrv: بلاستوسیستهای ثانویه گروه کنترل در محیط کشت R_2+Vero، FLBrv: بلاستوسیستهای ثانویه انجمادی در محیط کشت R_2+Vero، Deg: بلاستوسیستهای دژنره شده، Hg و Hd: بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا (Hg) و خارج شده از زونا (Hd)، 1-5: روزهای کشت یک تا پنج، سطوح معنی‌دار بودن: a:P<0.05 b;P<0.01 C;P<0.001

بحث

در تحقیق حاضر به ترتیب ۹۵ درصد، ۸۵ درصد، ۷۶ درصد مورولا، بلاستوسیست ثانویه و اولیه زنده حاصله پس از انجماد به دست آمد که با نتایج مطالعه Kasia مطابقت دارد. Kasia و همکارانش در سال ۱۹۹۰ با استفاده از روشی یک مرحله‌ای و ساده، ۹۸ درصد مورولای زنده پس از انجماد شیشه‌ای گزارش نمودند (۲۴). این میزان برای بلاستوسیست اولیه ۹۱ درصد و برای بلاستوسیست گسترش یافته ۵۷-۶۶ درصد بود (۲۴؛ ۴۱). در توجیه این تفاوت در میزان زنده بودن جنینها پس از انجماد شیشه‌ای باید گفت که با پیشرفت مرحله تکاملی نفوذپذیری جنین نسبت به ضدیخ افزایش می‌یابد (۴۲)، در حالی که حجم هر سلول تشکیل دهنده بلاستوسیست نسبت به مورولا کاهش پیدا می‌کند، در نتیجه غلظت داخل سلولی اتیلن‌گلیکول که ضدیخ نفوذپذیر ترکیب EFS40 می‌باشد (۴۳) در بلاستوسیست بسیار بیشتر از مورولا خواهد شد، که می‌تواند سمیت بیشتری را در پی داشته باشد (۴۴). ضمناً مورولا و بلاستوسیست از نظر ساختاری با هم متفاوتند، زیرا بلاستوسیست دارای یک حفره پر از مایع به نام بلاستوسل[1] است که با افزایش اندازه بلاستوسل میزان شانس زنده بودن جنین[2] پس از انجماد شیشه‌ای کاهش می‌یابد (۴۱؛ ۴۵).

علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مورولا، بلاستوسیستهای ثانویه و اولیه با درصد نسبتاً مطلوبی (۵۳ تا ۷۷ درصد) در طی ۱۲۰ ساعت به مرحله در حال خروج از زونا (Hatching, Hg) و خارج شده از زونا (Hatched, Hd) رسیدند. در این میان بیشترین درصد موفقیت از آن جنینهایی بود که کمترین آسیب

1. Blastocell
2. Survival Rate

را در طی انجماد شیشه‌ای دیده و از هم‌کشتی سلولهای Vero سود برده بودند، به بیانی دیگر بیشترین درصد (۷۷ درصد) مربوط به مورولاهای انجمادی بود که در محیط کشت R_2+Vero کشت داده شده و کمترین درصد (۵۳ درصد) مربوط به بلاستوسیستهای ثانویه بود که در محیط R_2 کشت داده شده بودند. این امر احتمالاً حاکی از این است که انجماد شیشه‌ای با روش فوق کمترین آسیب را به مورولاها و بیشترین آسیب را به بلاستوسیستهای ثانویه وارد آورده است. البته تفاوت معنی‌داری در تعداد جنینهایی که در محیط R_2 و R_2+Vero به مرحله Hg و Hd رسیدند مشاهده نشد. اما بین تعداد مورولاها و بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه انجمادی که به مرحله Hg و Hd رسیده بودند تفاوت معنی‌دار بود. از طرف دیگر در حالی که اکثریت جنینهای گروه کنترل در ۲۴ ساعت دوم به مرحله Hg و Hd رسیدند، اکثریت جنینهای گروه انجمادی با ۲۴ تا ۴۸ ساعت تاخیر و در ۲۴ ساعت سوم و چهارم به مرحله در حال خروج از زونا رسیدند (مورولا و بلاستوسیستهای اولیه در ۲۴ ساعت سوم و بلاستوسیستهای ثانویه در ۲۴ ساعت چهارم). در توجیه این تاخیر Wilson JM و همکارانش در سال ۱۹۸۷ از سرگیری تکوین طبیعی جنین را پس از ذوب[1]، به علت بازیابی تدریجی و آرام فعالیت متابولیک و سنتیک طبیعی جنین، نیازمند گذشت زمان و وابسته به محیط کشت دانستند (۲۵)، البته این تاخیر با توجه به آسیب ساختارهای جنین در طی انجماد قابل درک است، زیرا برای انجام انجماد شیشه‌ای موفق نیاز به غلظت بالای ضدیخ در داخل سلول می‌باشد و این ضدیخ در داخل سلول ممکن است باعث تغییر ماهوی[2] پروتئینها شود (۱۰) و با توجه به اینکه سیتوپلاسم تخمک و جنین به طور نرمال حاوی حدود ۱۸ گرم ماده خشک به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر است (۴۶، ۴۷) و ۶۵ تا ۷۰ درصد آن یعنی در حدود ۱۲ گرم پروتئین می‌باشد (۴۸، ۴۹)، احتمال آسیب به واسطه فعل و انفعالات آبگریز[3] ضدیخ نفوذ کرده به داخل سلول با پروتئینهای غشا یا سیتواسکلتون وجود دارد (۱۰). با وجود اینکه Bavister محیط کشت G_2 (که محیط R_2 از نظر ترکیبات تقریباً معادل آن است) را محیط ایده‌آلی نمی‌داند و نیاز به تحقیقات بیشتری را برای درک نیازهای بلاستوسیستها قبل از لانه گزینی پیشنهاد می‌کند (۵۰) لیکن احتمالاً این محیط با داشتن همه اسیدهای آمینه و ویتامینهای ایگل، گلوکز زیاد و لاکتات کم شرایط مناسب برای تکوین جنینهای (پس از مرحله مورولا) آسیب دیده انجمادی فراهم می‌آورد.

هر چند گزارش Wiemer و همکارانش در سال ۱۹۹۴ (۳۲) و Chen و همکارانش در سال ۱۹۹۷ (۲۶) و Citadini و همکارانش در ۱۹۹۷ (۵۱) و نعمت‌الهی‌ماهانی و همکارانش در سال ۱۹۹۹ (۵۲) از کمک موثر سلولهای Vero در تکوین جنینها می‌باشد و مکانیسمهایی را نیز برای عملکرد آنها ارائه کرده‌اند، از جمله اینکه در سیستم هم‌کشتی سلولهای کمک کننده[4] با ترشح و آزاد کردن موادی مانند Insulin like growth factor (۵۳) و Insulin growth factor binding proteins (۵۴) و پپتیدهای با وزن مولکولی بین ۳ تا ۱۰۰ کیلودالتون که از سلولهای Vero حاصل می‌شود (پلی پپتیدهای با وزن مولکولی پائین، از جمله فاکتورهای رشد و یا سیتوکینها فاکتورهایی هستند که می‌توانند به طور قدرتمندی تکامل جنین را تحت تاثیر قرار دهند (۲۶)، امکانات ارتقاء کیفیت جنین در مراحل ابتدائی تکوین شده و جنینها را قادر می‌سازد تا بلوک تکوینی را با موفقیت پشت سر بگذارند[5] و یا اینکه سلولهای Vero با ترشح آنزیمهای پروتئولیتیک از قبیل کیموتریپسین محیط را از موادی که اثر مهار کننده بر تکامل جنین دارند پاک می‌کنند[6] (۲۸). اما نتایج این تحقیق حاکی از این بود که محیطهای کشت R_2 و سیستم هم‌کشتی Vero در محیط R_2 قابلیتهای تقریباً یکسانی در کمک به تکوین جنینهای آسیب دیده انجمادی و کنترل در مرحله مورولا، بلاستوسیست اولیه و ثانویه دارند. ضمن یادآوری این نکته که مکانیسم عمل دقیق عملکرد سلولهای کمک کننده در سیستمهای هم‌کشتی در پیشبرد تکامل جنین پستانداران و کمک به خروج از زونا دقیقاً مشخص نیست، شاید علت معنی‌دار نبودن تفاوت بین محیطهای کشت R_2 و R_2+Vero در کمک به تکوین مورولاها، بلاستوسیستهای اولیه و ثانویه انجمادی این باشد که محیط R_2، یا حاوی فاکتورهای لازم برای تحریک از سرگیری تکوین طبیعی جنینها پس از انجماد می‌باشد و یا اینکه شرایط لازم را برای تولید این فاکتورها توسط خود جنینها فراهم می‌آورد. از طرف دیگر این احتمال نیز وجود دارد که علت معنی‌دار نشدن تفاوت بین محیطهای کشت R_2 و R_2+Vero در کمک به تکوین جنینهای انجمادی و گروه کنترل، نژاد مورد استفاده در تحقیق حاضر باشد، لذا پیشنهاد می‌شود که نظیر این تحقیق بر روی نژادهای دیگر موش و حتی گونه‌های دیگر حیوانات نیز انجام شود.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر حاکی از این است که محیطهای کشت R_2 و R_2+Vero در کمک به تکوین جنینهای انجمادی قابلیتهای تقریباً یکسانی دارند، از این رو با وجود اینکه نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه برای حصول اطمینان بیشتر وجود دارد، می‌توان به جای استفاده از محیطهای هم‌کشتی که هم مشکل‌تر و هم متضمن هزینه بیشتر است، از محیط کشت R_2 برای کمک به جنینها پس از انجماد استفاده کرد. تاخیر ۴۸ ساعته تکوین جنینهای انجمادی نسبت به گروه کنترل حاکی از آسیب جنینها در طی انجماد و ذوب می‌باشد، اما آسیبهای وارده در جنین متعاقب انجماد شیشه‌ای برگشت‌پذیر است و نیاز به زمان دارد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق بخشی از طرح تحقیقاتی «بررسی اثر انجماد شیشه‌ای[7] بر فراساختار سلولی جنین موش در مرحله بلاستوسیست اولیه[8] به وسیله میکروسکوپ الکترونی» بود که در دویست و سیزدهمین نشست شورای پژوهشی دانشکده پزشکی شهیدبهشتی به تصویب رسید. محل اجرای این تحقیق در پژوهشکده رویان بود. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از ریاست محترم پژوهشکده رویان، جناب آقای دکتر

1. Thawing
2. Denaturation
3. Hydrophobic
4. Helper
5. Positive Conditioning
6. Negetive Conditioning
7. Vitrifi Cation
8. Early Blastocyst

سعید کاظمی و معاونت محترم پژوهشی، جناب آقای عبدالحسین شاهوردی اعلام می‌دارند.

References

1. Rall WF, Mery TK: Zona Fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. Theriogenologyn 1989; 31: 683-392
2. Whittingham DG, Leido SP, Mazur P: Survival of mouse embryos frozen to - 196°C and -296°C. Science 1972; 178: 411-414
3. Wood MJ, Whittinghman DG, Rall WF: The low temperature pereservation of mouse oocytes and embryos, in mammalina development: A practical approach: Ed M Monk IRL press Oxford 1987; 255-280
4. Willadsen SM: Factors effecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing in the freezing of mammalian embryos. Ciba foundation Symposium 52 (Elliott K, and Whelan J eds) Elsvier, Amesterdam, Holland 1977, pp 175-194
5. Kasai M, Niwa K, Iritani A: Survival of mouse embryos frozen and thawed repidly. J Reprod Fertil 1980; 51-56
6. Rall WF, Fahy GM: Ice-free Cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature 1985; 313: 573-575
7. Park SP, Kimey DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, Chung KS, Lim JH: Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. Hum Reprod 1999; 14(11): 2838-2843
8. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryam HT: Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 1984; 21: 407-426
9. Kasai Magosaburo: Cryopreservation of mammalian embryos. Mole Biotech 1997; 7: 173-179
10. Tsutomu Arakawa, John F Carpenter, Yoshiko A Kitam John H Crowe: The basis for toxicity of certain cryoprotecteants: A hypothesis. Cryobiology 1990; 27: 401-415
11. Mazur P: Freezing of living cells: Mechanism and implications. Am J Physiol 1984; 274: 125-142
12. Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashaman RJ, Grujpen CG Nottle, MB: Cryopreservation of porcine embryos. Nature 1995; 374-416
13. Kroener C, Luyet B: Formation of Cracks during the vitrification of Glycol Solution and disappearance of the Cracks during Rewarming. Biodynamica 1966; 10: 47-52
14. Pedro PB, Zhu SE, Makino N, Sakurai T, Edashige K, Kasai M: Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. Cryobiology 1997; 35: 150-158
15. Yang X, Chen Y, Chen J, Foote RH: Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation: I. Survival of Rabbit embryos in-vitro and in-vivo following sucrose treatment. Mol Reprod Dev 1990; 27: 110-117
16. Rall WF: Factors affecting the survival of the mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 1987; 24: 387-402
17. Pedro Prudenico B, Sakurai Takahashi, Edashige Keisuke and Kasai Magosaburo: Effects of osmotic shrinkage on the survival of mouse oocytes and embryos at various development stages. J Mam ova Res 1997; 14: 66-71
18. Lane Michelle, Lyons Elizabeth A, Bavister Barry D: Cryopreservation reduced the ability of hamster 2-cell embryos to egulate intracellular pH. Hum Reproduction 2000; 15(2): 389-394
19. Leclerc C, Backer D, Bulhr M, Warner A: Low intracellular pH is involved in the early embryonic death of DDK mouse eggs fertilized by alien sperm. Dev Dyn 1994; 200: 257-267
20. Zhao Y, Chauvet PJ, Alper SL: Expression and function of biocarbonate/chloride exchangers in the preimplantetion mouse embryo. J Biol Chem 1995, 270: 24428-24434
21. Lane M, Baltz JM, Bavister BD: Regulation of intracellular pH in hamster preimplantation embryos by the Na+/H+ antiporter. Biol Reprod 1998; 59: 1483-1490
22. Lane M, Baltz JM Bavister BD: Biocarbonate/ chlorida exchange regulates intracellular pH of embryos but not oocytes of the hamster. Biol Reprod 1999; 61: 452-457
23. Daniem M, Luciano AA, Peluso JJ: Propandiol alters intracellular pH and development potential of mouse zygottes independently of volume change. Hum Reprod 1990; 5: 212-216
24. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T: A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J Reprod Fertil 1990; 89: 91-97

25. Wilson JM, Caceci T, Potter GD, Kraemer DC: Ultrastructure of cryopreserved horse embryos. J Reprod Fertil Suppl 1987; 35: 405-417
26. Chen Hsin FU, Ho Hong-Nerng, Chen Shee-Uan, Chao Kuang-Han, Lin Heng-Ru, Huang Su-Cheng, Lee Tzu-Yao, Yang Yu-Shinh: Peptides extracted from vero cell culture overcome the blastocyst block of mouse embryos in a serum-free medium.J Assis Reprod Genet 1994; 11(3): 165-171
27. Thibodeaux Jhon K, Gdke Robert A: *In vitro* enhancement of early-stage embryos with co-culture. Arch Pathol Lab Med 1992; 116: 364-372
28. Wiemer K, Cohen J, Wiker S, Malter H, Wright G, Godke R: Co-culture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblast: morphology and implantation. Fertil Steril 1989; 52: 503-508
29. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Moke H, Ng PL, Ratnam SS: Co-culture in human assisted reproduction: Support of embryos *in vitro* and their specificty. Ann NY Acad Sci 1991; 626: 438-444
30. Menezo YIR, Guerin JF, Czyba JC: Improvement of human early embryo development in-vitro by co-cuture on monolayers of vero cells. Biol Reprod 1990; 42: 301-306
31. Yong-Bong Kim: Vero Cell Co-culture and Mouse Embryo Development. Assis Reprod Rev 1994; 6(4): 162-165
32. Wiemer KE, Cohen J, Amborski F: In-vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine gibroblast cells. Hum Reprod 1989; 4: 595-600
33. Gardner DK, Leese HJ: Concentrations of nutrients mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in-vitro. J Reprod Fertil 1990; 88: 360-368
34. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J: Environment of the preimplantation human embryos *in vitro*: Metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. Fertil Stril 1996; 65: 349-353
35. Clough JR: Energy metabolism during mammalian embryogenesis. Biochem Soc Trans 1985; 13: 77-79
36. Lane M, Gardner DK: Differential regulation of mouse embryos development and viability by amino acids. J Reprod Fertil 1997; 109: 153-164
37. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C: Evaluations of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. Hum Reprod 1998; 13: 169-177
38. Bavister BD: Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. Hum Reprod Update 1995; 1: 91-148
۳۹. حسین بهاروند، مجتبی رضازاده ولوجردی: مقایسه تکوین جنینهای موش در محیطهای کشت متوالی ساخته شده R_1 و R_2 (رویان ۱ و ۲) و معادلهای تجاری $G_{1.2}$ و $G_{2.2}$، مجله پزشکی حکیم، در دست چاپ
40. Gardner DK, Lane M: Culture and selection of viable blastocysts: A feasible proportion for human IVF: Human Reprod Update 1997; 3: 367-382
41. Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T: Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages in an Ethylene Glycol-based solution by a simple methode. Thriogenology (In press)
42. Mazur P, Rigopulos N, Jackowski SC, Leibo SP: Preliminary stimates of the permeability of mouse ova and early embryos to Glycerol. Biophys J 1976; 16: 232a (Abs)
43. Miamoto H, Ishibashi T: Survival of frozen-fhawed mouse and rat embryos in the presence of Ethylene Glycol. J Reprod Fertil 1977; 50: 427-432
44. Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurai T, Machida T: Crypreservation of expanded mouse blastocyst by vitrification in Ethylene Glycol-based solution. J Reprod Fertil 1993; 98: 139-145
45. Shaw JM, Diotallevi L, Trounson AO: A simple rapid 4.5M Dimethylsul-foxide freezing technique for the cryopreservation of one-cell to blastocyst stage preimplantation mouse embryos. Reprod Fertil Dev 1991; 3: 621-626
46. Abramczuk J, Sawicki W: Variation in dry mass and volum of nonfertilized oocytes and blastomeres of 1-,2-, and 4-cell mouse embryos. J Exp zool 1974; 188: 25-34
47. Leibo SP: Water permeability and its Activation Energy of fertilized Mouse Ova. J Membr Biol 1980; 53: 179-188
48. Brinster RL: Protein content of the mouse embryo during the first five days of the development. J Reprod Fertil 1963; 13: 413-420
49. Loewenstein JE, Cohen AI: Dry mass lipid content and protein content of the intact and zone-free mouse ovum. J Embryol Exp Morphol 1964; 12: 113-121
50. Bavister BD: Benefits of prolonged embryo culture. Hum Reprod 2000; Abstract book 1: 37-38
51. Citadini E, Cirimina R, Pelermo R, Cefalu E, Manno M, Ruvoldo G, Napoli P, Agrifoglio V: Coculture on

vero cells for embryo selection after ICSI or embryo thawing. J Assis Reprod Genet 1997; 14 (suppl): ps-06-4
52. Nematollahi N, Rezazadeh Valojerdi M: Effect of vero cell coculture on the development of frozen-thawed two-cell mouse embryos: J Assis Reprod Genet 1999; 16(7): 380-384
53. Paria B, Dey S: Preimplantation embryo development in-vitro: Cooperative interaction among embryo and role of growth factors: Proc Nat Acad Sci USA 1990; 87: 4756-4760
54. Lai YM, Wang HS, Lee CL, Lee JD, Haung HY, Lee JF, Soong YK: Insulin-like growth factor binding - produced by vero cells, huamn oviductal cell and human endometrial cells, and the role of insulin like growth factor binding-proteins 3 in mouse co-culture systems. Hum Reprod 1996; 11: 1281-1286