انجماد و ذوب جنینهای مرحله پیش لانه‌گزینی موش با پروپاندیول و ساکارز و تأثیر مرحله تکوینی جنین در موفقیت انجماد

سید نورالدین نعمت‌اللهی ماهانی Ph.D.☆، مجتبی رضازاده Ph.D.★♦، محمدعلی امامی میبدی Ph.D.☆

☆ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی افضلی پور، گروه آناتومی

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

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

چکیده

* **هدف:** بررسی خواص انجمادپذیری مراحل مختلف تکوینی جنینهای موش به روش انجماد کند.

* **مواد و روشها:** جنینهای ۱، ۲، ۴ و ۸ سلولی موش پس از تحریک تخمک‌گذاری با گنادوتروپین‌ها، از لوله رحم خارج شده و در حضور پروپاندیول و ساکارز به‌روش کند، منجمد و به‌سرعت ذوب شدند. جنینها پس از ذوب در محیط EBSS + ۱۰ درصد BSA به‌مدت ۴ تا ۵ روز کشت داده شدند و نتیجه تکوین آنها با گروه شاهد و خودشان مقایسه شد.

* **یافته‌ها:** جنینهای یک سلولی بهتر از سایر جنینها شرایط انجماد و ذوب را تحمل کردند و زنده ماندند؛ ۹۱ درصد در برابر ۸۰ درصد، ۸۲ درصد و ۸۵ درصد (به‌ترتیب در مورد جنینهای دو، چهار و هشت سلولی). تکوین جنینهای منجمد و ذوب شده چهار و هشت سلولی به مرحله بلاستوسیست ثانویه بیشتر بود. از نظر آماری نیز جنینهای چهار سلولی منجمد و ذوب شده نسبت به جنینهای دو و هشت سلولی با درصد بالاتری به مرحله خروج از قشر شفاف رسیدند ($P<0.05$).

* **نتیجه‌گیری:** جنینها در مراحل مختلف قادرند در حضور پروپاندیول و ساکارز با روش کند، منجمد شوند ولی میزان تکوین این جنینها یکسان نبوده و به مرحلهٔ آن، وابسته است.

گل واژگان: انجماد جنین، پروپاندیول، مرحلهٔ تکوین

مقدمه

بیش از پنجاه سال از زمانی که دانش زیست‌شناسی انجمادی[1] توانست روش قابل قبولی را برای انجماد سلولها عرضه کند، می‌گذرد (۱). در حالی‌که بیست‌وپنج سال بعد از نخستین گزارش مبنی بر موفقیت در انجماد برخی رده‌های سلولی، محققین توانستند جنین موش را با موفقیت منجمد ـ ذوب کنند و مجدداً در محیط آزمایشگاه کشت دهند (۲). به‌دنبال اولین گزارش موفقیت‌آمیز انجماد جنین پستانداران، تحقیق پیرامون مواد ضد یخ مناسب، روشهای انجماد، ذوب و... سرعت گرفت. هدف نهایی این تحقیقات، یافتن مناسب‌ترین مواد و روشها برای انجماد جنینهای مرحلهٔ پیش لانه‌گزینی بود. همزمان با این تحقیقات، نکته دیگری مورد توجه محققین قرار گرفت و آن پاسخهای متفاوتی بود که جنینها در مراحل مختلف (یک سلولی تا بلاستوسیست) نسبت به پدیده انجماد از خود نشان می‌دادند. اختلاف در انجمادپذیری جنینها، ناشی از تغییرات شگرفی است که یک جنین از مرحله یک سلولی تا بلاستوسیست متحمل می‌شود. تسهیمات سلولی که پس از لقاح در تخم صورت می‌گیرد، به‌طور مؤثری نسبت سطح به حجم بلاستومرها را تغییر می‌دهد. این تغییرات همان‌گونه که Mazur (۳) با معادله‌ای آنرا بیان کرد، بر خاصیت انجمادپذیری جنین اثر می‌گذارد. از یک‌سو در هر مرحله از حیات جنین، پروتئین و آنزیمهای ویژه‌ای ساخته می‌شود و منابع انرژی جنین از مواد ساده‌تر مانند پیروات و لاکتات به مواد پیچیده‌تر مانند گلوکز و اسیدهای چرب تغییر می‌کند (۴). از سوی دیگر در هر چرخه سلولی میزان DNA جنین افزایش می‌یابد و ساختمان غشاء سلولی و نفوذپذیری آن (۵) و همچنین فراساختار و ضخامت قشر شفاف[2]، همراه با تکوین جنین تغییر می‌کند (۶).

مجموعه این تغییرات می‌تواند خواص انجمادپذیری جنین را تغییر دهد و می‌توان انتظار داشت که جنین یک‌گونه خاص در مراحل مختلف، رفتار متفاوتی نسبت به پدیده انجماد از خود بروز دهد. اولین گزارش مبنی بر انجمادپذیری دو مرحله تکوینی جنین مربوط به Willmut (۷) است که با استفاده از گلیسرول جنینهای مرحله بلاستوسیست و هشت سلولی موش را منجمد کرد. در گزارش وی تفاوت چندانی بین خواص انجمادپذیری بلاستوسیست و جنین مرحله هشت سلولی وجود ندارد. درحالی‌که آزمایشهای دیگری (۸) اختلاف عمیق بین جنینهای مرحلهٔ مورولا، بلاستوسیست اولیه و بلاستوسیست ثانویه موش را نشان داد؛ جنینهای مرحلهٔ مورولا شرایط انجماد و ذوب را خیلی بهتر تحمل کرده و زنده ماندند. به‌نظر وی، افزایش آب درون بلاستوسیست باعث شده بود که آنها مدت کمتری زنده بمانند. در آزمایش دیگری (۹) جنینهای مرحله پیش هسته و چهار سلولی موش به‌کمک پروپاندیول و اتیلن گلیکول منجمد و ذوب شدند که جنینهای چهار سلولی توانستند شرایط انجماد و ذوب را بهتر تحمل کرده و زنده بمانند. گزارشهای دیگر نیز نشان دهندهٔ تأثیر مرحله تکوینی جنین در موفقیت انجماد است (۱۰).

برخی محققین تأثیر پذیری جنین را در روش انجماد شیشه‌ای[3] بررسی کردند تا مشخص شود آیا جنین پستانداران در مراحل مختلف به سایر روشهای انجماد نیز، همانند روش انجماد کند، پاسخ متفاوتی از خود نشان می‌دهد یا خیر؟ انجماد جنینهای یک‌سلولی تا بلاستوسیست موش به‌کمک مخلوطی از اتیلن‌گلیکول، فیکول و ساکارز نشان داد که جنینهای مرحله مورولا شرایط انجماد و ذوب را بهتر تحمل می‌کنند(۱۱)؛ درحالی‌که جنینهای دو سلولی و بلاستوسیست قادر به تحمل شرایط انجماد شیشه‌ای نبودند. آزمایشهای ما (۱۲) در مورد انجماد جنینهای یک، دو و هشت سلولی و تخمک موش نیز نشان داد که جنینهای هشت سلولی شرایط انجماد شیشه‌ای را بهتر تحمل کرده و پس از ذوب، به تکوین خود در آزمایشگاه ادامه می‌دهند. آزمایشهای متعددی که توسط محققین صورت گرفته حاکی از اختلاف انجمادپذیری جنینها در مراحل مختلف تکوین است.

با توجه به تغییر در شرایط فیزیکی و بیوشیمیایی جنینهای مراحل مختلف، برای انجماد هر مرحله از جنین، ممکن است روشی ویژه و یا ضدیخی مناسب به‌کار رود تا نتیجه دلخواه حاصل شود. در حال حاضر، برای انجماد جنین انسان با روش کند در مرحله پیش هسته، معمولاً از DMSO[4] به‌عنوان ضدیخ استفاده می‌شود، برای جنینهای دوسلولی تا مورولا از پروپاندیول و برای جنینهای مرحله بلاستوسیست، گلیسرول به‌کار می‌رود(۱۳). اینکه برای جنین هر پستانداری در یک مرحله خاص از چه نوع ضدیخ و چه روشی استفاده شود، موضوعی است که تاکنون به برخی از ابهامات آن پاسخ داده شده ولی هنوز در بسیاری از موارد نیاز به مطالعه و تحقیق آزمایشگاهی است تا یک روش مطمئن به‌عنوان یک الگوی فراگیر و قابل استفاده معرفی گردد.

در تحقیق حاضر، باکنترل و ثابت نگه داشتن مؤلفه‌هایی که ممکن است میزان موفقیت در انجماد و ذوب جنین را تغییر دهند مانند نوع ضدیخ، زمان تعادل، سرعت انجماد، سرعت ذوب، لوله انجماد و محیط کشت، سعی شده پاسخ جنینهای یک، دو، چهار و هشت سلولی موش به فرایند انجماد بررسی شود.

مواد و روشها

* جنین

جهت انجام آزمایشها از موشهای مادهٔ سفید، نژاد سوئیسی که بین ۴الی ۸ هفته سن داشتند و در مؤسسه رویان نگهداری می‌شدند استفاده شد. آب و غذای کافی در دسترس حیوانات قرار گرفته و دوره روشنایی و تاریکی دوازده ساعته بود. تنها حیواناتی که ظاهر سالم داشتند برای آزمایش انتخاب شدند. برای تحریک تخمک گذاری از ۷/۵ واحد (PMSG, Sigma) Pregnant Mare Serum Gonadotropin و ۷/۵ واحد هورمون کوریون انسانی (hCG, serono) با فاصله ۴۸ ساعت به طریق تزریق داخل صفاقی استفاده شد.

پس از تزریق hCG موشهای ماده یکی‌یکی داخل قفس موشهای نر

1. Cryobiology
2. Zona pellucida
3. Vitrification
4. Dimethyle sulfoxide

قرار داده شدند. مشاهده پلاک واژن در صبح روز بعد نمایانگر انجام جفت‌گیری بوده و هر موش باردار در قفسی جداگانه نگهداری شد.

برای بدست آوردن جنین ۱، ۲، ۴ و ۸ سلولی به ترتیب ۲۴ الی ۲۷، ۴۴ الی ۴۸، ۴۸ الی ۵۲ و ۶۶ الی ۶۸ ساعت پس از تزریق hCG موشهای ماده با کشیدن گردن، قطع نخاع شد و شکم حیوان در شرایط نیمه استریل باز شد و لوله رحم به کمک پنس و قیچی ظریف به ظرف محیط کشت حاوی EBSS[1] + ۱۰ درصد آلبومین پنج درصد انسانی (HSA)[2] که قبلاً در دمای ۳۷° سانتی‌گراد، گرم و با گازکربنیک ۵ درصد متعادل شده بود، منتقل شد. در زیر استریومیکروسکوپ، انتهای لوله رحم (قیف) مشخص شده و حدود ۰/۱ الی ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت به کمک سرسوزن 30G و سرنگ انسولین با فشار به داخل لوله رحم پاشیده شد و در نتیجهٔ آن، جنینها از انتهای بریده شدهٔ رحم خارج شدند. در جنینهای یک سلولی ناحیه آمپولِ لوله رحم، بریده شد و با فشار اندکی جنینها درون محیط کشت شناور شدند. جنینها پس از دو بار شستشو با محیط کشت، در یک قطره بزرگ محیط کشت در زیر روغن پارافین جمع‌آوری و تا زمان انجماد در انکوباتور گازکربنیک دار ۳۷° سانتی‌گراد نگهداری شدند. در هر نوبت آزمایش، تعدادی از جنینها به‌طور تصادفی به‌عنوان شاهد انتخاب شده و تکوین آنها بررسی شد.

* انجماد و ذوب جنین

برای انجماد جنین، روش کند که قبلاً کارآیی آن معلوم شده بود استفاده شد(۱۴)؛ به‌طور خلاصه جنینها در دسته‌های ۳۰-۱۵ تایی در دو مرحلهٔ ده دقیقه‌ای در محلول پروپاندیول ۱/۵ مولار و پروپاندیول + ساکارز ۱/۰ مولار متعادل شده به نی‌های مخصوص انجماد (CTE 880-0.2-EC, Stromberg, Germany) منتقل شدند. سپس نی‌ها را داخل دستگاه انجماد (CTE 880-Cryo-Technic,Erlangen, Stromberg, Germany) قرار داده و با سرعت کم تا دمای ۷°- سانتی‌گراد سرد شدند. برای القای انجماد (شروع یخ‌زدگی) به مدت پنج دقیقه در همین دما نگهداشته شدند، سپس به‌کندی تا دمای ۳۰°- سانتی‌گراد سرد و یکباره وارد نیتروژن مایع (۱۹۶°- سانتی‌گراد) شدند. سپس نی‌ها برای نگهداری به فایلهای مخصوص منتقل گردیدند.

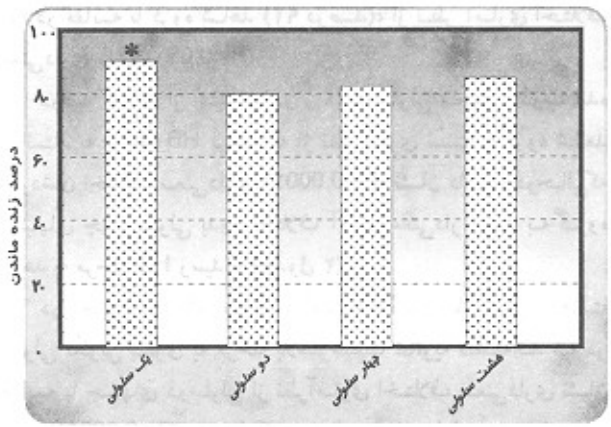
برای ذوب، نی‌های حاوی جنین از نیتروژن مایع خارج و به مدت ۱۰ ثانیه در حرارت آزمایشگاه و به‌مدت ۲۰ ثانیه در بن ماری ۳۰° سانتی‌گراد تکان داده شدند. پس از ذوب انتهای لوله بریده شد و محتویات لوله ابتدا به‌داخل محلول حاوی ۱/۵ مولار پروپاندیول و ۰/۲ مولار ساکارز انتقال یافت. پس از پنج دقیقه جنینها جمع‌آوری شد و در سه شستشو به تدریج غلظت پروپاندیول کم شد و در نهایت جنینها در محیط کشت حاوی ده درصد HSA دوبار شستشو شدند و در دسته‌های ده تایی به قطرات محیط کشت EBSS+ ده درصد HSA منتقل شدند. بلافاصله جنینهای زنده و مرده از نظر مرفولوژیکی ارزیابی شدند. جنینهای زنده به‌مدت ۵ روز به فاصله هر ۲۴ ساعت یک بار زیر استریومیکروسکوپ مشاهده و چگونگی تکوین و پیشرفت آنها به مراحل بالاتر تا مرحله خروج از قشر شفاف (HB)[3] گزارش شد.

* روش آماری و تجزیه تحلیل نتایج

یافته‌های پژوهش پس از جمع‌بندی بین هر گروه با شاهد مربوطه و بین مراحل مختلف تکوین با تست آماری χ^2 ارزیابی شدند.

یافته‌ها

جنینهای موش که در مراحل یک، دو، چهار و هشت سلولی بودند پس از ذوب زیر میکروسکوپ مشاهده و جنینهای سالم از جنینهای دژنره شده جدا شدند و به عنوان اولین تأثیر شرایط انجماد، نسبت جنینهای زنده به مجموع جنینها محاسبه شد (نمودار ۱). میزان تکوین جنینهای زنده نیز در مشاهدات بعدی ارزیابی شد.



نمودار ۱: میزان زنده ماندن جنینهای مراحل مختلف تکوین پس از انجماد و ذوب • $P<0.05$

در گروه شاهد ۷۷/۸۳ (۹۳ درصد) جنینهای یک سلولی به دوسلولی تکوین یافتند ولی ادامه تکوین آنها به‌دلیل نژاد موش مقدور نشد (این جنینها در محیط آزمایشگاه تا مرحله دوسلولی پیشرفت می‌کنند و در همین مرحله می‌مانند که به ایست تکوینی[4] معروف است). جنینهای دو، چهار و هشت سلولی گروه شاهد به‌خوبی تا مرحله بلاستوسیست و HB پیش رفتند. با وجود رشد بهتر جنینهای چهار و هشت سلولی، اختلاف آماری معنی‌داری بین گروهها مشاهده نشد(جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه میزان تکوین جنینهای غیرمنجمد مراحل مختلف در محیط EBSS.

مرحله رشد	تعداد جنین	دفعات تکرار	مورولا + بلاستوسیست اولیه(٪)	بلاستوسیست ثانویه(٪)	خروج از قشر شفاف(٪)
یک سلولی	۸۳	۵	-	-	-
دو سلولی	۱۱۲	۷	۹۵(۸۵)	۹۳(۸۳)	۴۲(۳۸)
چهارسلولی	۷۸	۷	۷۴(۹۵)	۷۲(۹۲)	۴۰(۵۱)
هشت سلولی	۱۱۶	۷	۱۱۲(۹۷)	۱۰۶(۹۱)	۵۷(۴۹)

1. Earls' Balanced Salt Solution
2. Human Serum Albumin
3. Hatching Blastocyst
4. Developmental block

تکوین جنینهای یک سلولی به دوسلولی در دو گروه آزمون و شاهد اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. به ترتیب ۸۶ درصد و ۹۳ درصد جنینها به مرحله دوسلولی رسیدند. در حالی که جنینهای دوسلولی به شدت تحت‌تأثیر شرایط انجماد قرار گرفتند و تنها ۴۰ درصد جنینهای منجمد ـ ذوب شده به مرحله بلاستوسیست ثانویه رسیدند که در مقایسه با گروه شاهد(۸۳ درصد) با ضریب اطمینان $P<0.0001$ کمتر تکوین یافته بودند. ولی تکوین جنینهای چهارسلولی منجمد ـ ذوب شده به مرحله بلاستوسیست ثانویه، اختلاف آماری معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد (۸۹ درصد در برابر ۹۲ درصد، $P>0.05$). با گذر از مرحله چهارسلولی به هشت سلولی، حساسیت جنینها به شرایط انجماد افزایش یافت به طوری که ۷۶ درصد جنینهای هشت سلولی منجمد ـ ذوب شده به مرحله بلاستوسیست ثانویه رسیدند که در مقایسه با گروه شاهد (۹۱ درصد)، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0.05$).

درصد کمتری از جنینهای دو و هشت سلولی منجمد ـ ذوب شده توانستند به مرحله HB برسند که از نظر آماری نسبت به گروه شاهد خودشان اختلاف معنی‌داری ($P<0.0001$) نشان دادند. درحالی‌که جنینهای چهار سلولی بدون اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به گروه شاهد به مرحله HB رسیدند (جدول ۲).

در مجموع جنینهای منجمد ـ ذوب شدهٔ مرحلهٔ چهار و هشت سلولی تکوین بهتری به مرحله بلاستوسیست ثانویه داشته‌اند که در مقایسه با جنینهای دوسلولی از نظرآماری اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P<0.0001$). درحالی‌که جنینهای چهار سلولی بهتر توانسته‌اند به مرحله HB برسند که در مقایسه با گروههای دو سلولی و هشت سلولی، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه میزان رشد و تکوین جنینهای منجمد شده مراحل مختلف با گروه شاهد.

مرحله رشد	گروه	تعداد جنین	بلاستوسیست ثانویه(٪)	خروج از قشر شفاف(٪)
یک سلولی	شاهد	۸۳	-	-
	آزمون	۱۰۲	-	-
دوسلولی	شاهد	۱۱۲	۹۳(۸۳)**	۴۲(۳۸)**
	آزمون	۱۷۲	۶۸(۴۰)	۷(۴)
چهارسلولی	شاهد	۷۸	۷۲(۹۲)	۴۰(۵۱)
	آزمون	۱۱۹	۱۰۶(۸۹)	۴۵(۳۸)
هشت‌سلولی	شاهد	۱۱۶	۱۰۶(۹۱)*	۵۷(۴۹)**
	آزمون	۱۹۲	۱۴۵(۷۶)	۴۶(۲۴)

* $P<0.01$, ** $P<0.01$

بحث

در آزمایشهای جاری از روش انجماد کند در حضور پروپاندیول (ضدیخ نفوذپذیر) و ساکارز (ضدیخ نفوذناپذیر) استفاده شد. حضور این مواد ضدیخ در محلول به دلیل افزایش فشار اسمزی و تمایل پروپاندیول برای نفوذ به داخل سلول، باعث خروج تدریجی آب به بیرون می‌شود. به‌علاوه، زمان طولانی انجماد (حدود ۲/۵ ساعت) باعث خروج آب از جنین و یخ زدن آن در محلول می‌شود. بدین ترتیب درصد بالایی از آب درون سلولی به بیرون هدایت شده و آن مقدار آبی که درون جنین باقی می‌ماند به دلیل کوچک بودن ذرات یخ نمی‌تواند به سلامت جنین صدمه بزند (۱۵). در آزمایشهای حاضر درصد زنده ماندن جنین مراحل مختلف به یکدیگر نزدیک است و می‌توان احتمال داد که آب درون جنین به خوبی خارج شده است. در آزمایشهایی که Shaw و همکاران (۹) انجام دادند جنینهای یک و چهار سلولی در حضور پروپاندیول و ساکارز و با شرایطی نزدیک به شرایط آزمایشهای حاضر منجمد و ذوب شدند. آنها توانستند درصد بالایی از جنینهای یک و چهارسلولی را پس از انجماد و ذوب، زنده نگه دارند. به‌نظر می‌رسد انجماد و ذوب جنینها در حضور پروپاندیول، روش قابل اعتمادی باشد. همان‌طورکه آزمایشها در مورد جنین انسان (۱۳)، گاو (۱۶) و موش (۱۷) نتایج قابل قبولی داشته است. به‌هرحال آزمایشهای جاری از جهتی با نتایج بدست آمده در آزمایشهای Shaw تفاوت دارد و آن میزان زنده ماندن جنینهای یک سلولی نسبت به چهار سلولی است که در آزمایشهای Shaw جنینهای چهار سلولی، بیشتر زنده مانده بودند درحالی‌که در آزمایش حاضر درصد زنده ماندن جنینهای یک سلولی بیشتر بود. این تفاوت ممکن است به اختلاف در نژاد موش (موش سفید نژاد سوئیسی در این آزمایش و موش CBA/Ca H WehixC57BL/6J در آزمایشهای Shaw)، اختلاف در نوع نی مورد استفاده و یا آن‌طورکه Balakier (۱۸) گزارش کرده است، به مرحلهٔ چرخه سلولی جنین مربوط باشد. Balakier جنینهای چهار سلولی موش را در دو فاز S و G_2 چرخه سلولی منجمد و ذوب کرد و نتیجه گرفت که جنینهای فاز G_2 بهتر می‌توانند شرایط انجماد و ذوب را تحمل کنند.

با توجه به اینکه سلول در فاز S اقدام به سنتز DNA می‌کند و این DNA ممکن است در جریان انجماد و ذوب صدمه ببیند بنابراین می‌توان احتمال داد که اگر سلول در مرحله S منجمد شود میزان تخریب DNA بیشتر خواهد بود. به همین دلیل برخی محققین پیشنهاد کرده‌اند که برای انجماد جنین، از مرحله یک سلولی استفاده شود تا هم از احتمال انجماد در حین همانند سازی DNA کاسته شود و هم خطر به‌هم‌پیوستن بلاستومرها و ایجاد سلولهای تتراپلوئید کاهش یابد (۱۸). نتایج آزمایشهای جاری با این پیشنهاد محققین همخوانی دارد زیرا بیشترین درصد زنده ماندن (۹۱ درصد) در جنینهای یک سلولی مشاهده شد.

البته باید در نظر داشت که به دلیل عدم تناسب کافی شرایط آزمایشگاه با جنین، میزان رشد و تکوین جنینها در شرایط آزمایشگاه نسبت به *in vivo* کمتر است و از سویی هر چه زمان توقف جنین در لوله رحم بیشتر باشد، امکان رشد و تکوین جنینها پس از انجماد و ذوب در محیط آزمایشگاه بیشتر است. به عبارت دیگر؛ باید انتظار داشت که

جنینهای جوانتر (یک سلولی، دوسلولی) نسبت به جنینهای مراحل بالاتر (هشت سلولی، مورولا) شانس کمتری برای تکوین در شرایط آزمایشگاه داشته باشند (۱۹). در آزمایشهای حاضر هر چند جنینهای دوسلولی به میزانی نزدیک به سایر جنینها زنده ماندند ولی میزان تکوین بعدی آنها کمتر از سایر گروهها بود. این یافته با نتیجه آزمایشهای محققینی که روش انجماد شیشه‌ای جنینها را به‌کار برده‌اند، هماهنگی دارد (۱۱)، یعنی درصد تکوین جنینها به مراحل بالاتر از یک سلولی به مورولا، افزایش و از مورولا به بلاستوسیست کاهش می‌یابد. آزمایشهای دیگری نیز مؤید این مطلب است (۸، ۲۰)، درحالی‌که انجماد مورولا و بلاستوسیست گاو در مراحل مختلف نتایج متضادی در پی داشته است (۲۱).

به‌هرحال گذشته از تشابهات و اختلافاتی که در کار محققین دیده می‌شود؛ می‌توان عواملی را در نظر گرفت که درصد زنده ماندن و تکوین جنینها را در جریان انجماد و ذوب و پس از آن، تحت‌تأثیر قرار دهند، مثلاً اگر در جریان انجماد و ذوب یک بلاستومر جنین دوسلولی صدمه ببیند در حقیقت ۵۰ درصد جنین صدمه دیده است و درصورتی‌که یک بلاستومر جنین چهار سلولی صدمه ببیند ۲۵ درصد جنین صدمه دیده است درحالی‌که صدمه دیدن بلاستومر جنین هشت سلولی تنها به تخریب ۱۲/۵ درصد جنین منجر می‌شود. به این ترتیب واضح است که افزایش تعداد بلاستومرها باعث کاهش صدمه کلی به جنین می‌شود و جنین شانس بیشتری برای تکوین به مراحل بالاتر را خواهد داشت. علاوه بر این؛ اندازه بلاستومرهای جنین نیز می‌تواند در موفقیت انجماد مؤثر باشد. اندازه بلاستومرهای جنین دوسلولی بزرگتر از چهار و هشت سلولی است و بزرگ بودن بلاستومرها می‌تواند باعث افزایش حساسیت این بلاستومرها به فشارهای اسمزی موجود در جریان انجماد شود (۲۲). تغییر در نسبت حجم به سطح سلول نیز در موفقیت انجماد مؤثر است (۲۳). عامل دیگری که ممکن است در موفقیت انجماد جنین تأثیر بگذارد غلظت و نوع ضدیخی است که استفاده می‌شود. به بیان دیگر؛ ممکن است جنین در هر مرحله با نوع خاصی از ضدیخ سازگاری داشته باشد که احتمالاً به دلیل تغییر در ساختار فیزیکوشیمیایی جنین در هر مرحله است. به‌علاوه غلظت مناسب ضدیخ نیز در هر مرحله جنین ممکن است با مرحله بعدی متفاوت باشد (۲۴). به‌هرحال تغییر در نوع و غلظت ضدیخ، همراه با تغییر در شرایط انجماد و ذوب، محققین را قادر خواهد ساخت که مناسب‌ترین روش را برای انجماد جنین در مراحل مختلف پیدا کنند. آزمایشهای حاضر نشان داد که جنینهای چهار و هشت سلولی به خوبی قادرند شرایط انجماد و ذوب را تحمل کرده و به مراحل بالاتر تکوین یابند. هر چند هنوز بین میزان تکوین جنینهای منجمد ـ ذوب شده و گروه شاهد اختلافاتی موجود است و برای نزدیک شدن به شرایط ایده‌آل باید تحقیقات دامنه داری صورت گیرد.

انجماد و ذوب جنینهای مراحل مختلف به کمک پروپاندیول و ساکارز با سرعت کم، روش قابل اعتمادی است که می‌تواند درصد بالایی از جنینها را سالم نگه دارد. درحالی‌که تغییرات منفی پس از انجماد در جنینها باعث می‌شود که تعدادی از جنینها در مراحل مختلف تکوین توقف کرده و به مرحله نهائی نرسند. این تغییرات به مرحله تکوینی جنین بستگی دارد و به‌نظر می‌رسد که جنینهای مراحل بالاتر بهتر بتوانند بر مشکلات ناشی از انجماد غلبه کنند.

تقدیر و تشکر

این پروژه بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۱۱-۲۱۸ مصوب جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران بوده که در موسسه رویان انجام شده است. نگارندگان تشکر خود را از جناب آقای علیزاده و خانمها لیلا باجلان و لیلا کریمیان به دلیل همکاریشان در امور آزمایشگاهی ابراز می‌دارند.

References

1. Polg C, Smith AU, Parkes AS: Survival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, London, 1949; 164: 166-174

2. Whittingham DG: Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature 1971; 233: 125-126

3. Mazur P: Cryobiology: the freezing of biological systems. Science 1970; 168: 939-949

4. Nonogaki T, Noda Y, Goto Y, Kishi J, Mori T: Developmental blokage of mouse embryos caused by fatty acids. J Assist Reprod Genet 1994; 11: 482-488

5. Daw A, Farrant J, Morris GI: Membrane leakage of solutes after thermal shock of freezing. Cryobiology 1973; 10: 126-133

6. Pellegrini C, Oldenbourg R, Keefe DL: The organization of zona pellucida filament changes during in vitro culture of preimplantation mouse embryos. J Assist Reprod Genet 1997; 14: 185S (abs)

7. Willmut I: The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Science 1972; 11: 1071-1079

8. Massip A, Vander zwalmen P, Leroy F: Effect of stage of development on survival of mouse embryos frozen - thawad rapidly. Cryobiology 1984; 21: 574-577

9. Shaw JM, Ward C, Trounson AO: Survival of mouse blastocysts slow cooled in propandioal or ethylen glycol is influenced by the thawing procedure, sucrose and antifeeze proteins. Theriogenology 1995; 43: 1289-1300

10. Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard J:

Dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. Anim Reprod Sci 1996; 42: 45-53
11. Miyake M, Kasai M, Zhu SE, Sakurani T, Machida T: Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylenglycol-based soulution by a simple method. Theriogenology 1993; 40: 121-134
12. Nematollahi N, Rezazadeh M, Hosseini A: The effect of different thawing rates on development of mouse embryos. Middle East Fert Soc, Alexandra Egypt 1995; 78-87
13. Lassalle B, Testart J, Renard JP: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propandiol. Fertil Steril 1985; 44: 645-651
14. Nematollahi N, Saito H, Rezazadeh M, Hiroi M: Vitrification of mouse cleaved embryos and oocyte with ethylene glycol and trehalose. Middle East Fert Soc J 1997; 3(1): 50-58
15. Rall WF: Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 1984; 24: 387-402
16. Takagi M, Otoi T, Suzuki T: Survival rate of frozen-thawed bovine IVM/IVF embryos in relation to post-thaw exposure time in two cryoprotectants. Cryobiology 1993a; 30: 466-469.
17. Renard JP, Babinet C: High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2- propandiol as cryoprotectant. J Exp Zool 1984; 230: 443-448
18. Balakier H, Zenzer M, Wang P, Mac Lusky NJ, Casper RF: The effect of cryopreservation on thedevelopment of S- and G2- phase mouse embryos. J In Vitro Fert Emb Trans 1991; 8: 89-95
19. Bavister BD; Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. Theriogenology 1988; 29: 143-154
20. Valdez CA, Abas Mazni O, Takahashi Y, Hishinoma M, Kanagawa H: Effects of equilibration time, precooling and development stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrifcation. Theriogenology 1989; 33: 627-637
21. Mahmoudzadeh AR, Van soon A, Bols P, Yesbaert MT, de Kruif A: Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of develpmental stage, two - step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. J Reprod Fert 1995; 103: 33-39
22. Tachikawa S, Oto T, Kondo S, Machida T, Kasai M: Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertillization. Mol Reprod Dev 1993; 34: 266-271
23. Berg U, Berm G: Development rates of in vitro produced IVM-IVF boving oocytes in different cell culture systems. Theriogenology 1990; 33: 195
24. Schneider U, Maurer RR; Factors affecting survival of frozen-thawed mouse embryos. Biol Reprod 1983; 29: 121-128