Original Article

The effect of freezing period on the viability and cleavage of two-cell embryos in mice

Navazesh A, Esmaeilnejad-Moghadam A*, Karimpour-Malekshah AA, Rezaei N, Ghasemi H

Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Mazandaran, I. R. Iran.

Received April 4, 2014; Accepted September 27, 2014

Abstract:

Background: Despite the advantages of the vitrified embryos, some negative aspects of the survival and cleavage of such embryos are reported. This study aimed to examine the effect of freezing period on the viability and cleavage of two-cell mouse embryos.

Materials and Methods: In this experimental study, following the induction of ovulation in female NMRI mice, mating and confirming the presence of vaginal plug, female mice were sacrificed by cervical dislocation, 48-44 h after hCG injection. The two-cell embryos were collected by flushing and incubated for 24 h in an incubator with CO2 stream, 37˚C. Embryos were divided into the 6 groups: the control group, freezing for 24 hours, 72 hours, one week, two weeks and one month. After the completion of the freezing periods, the embryos were thawed by the standard methods and their viability and cell division were examined.

Results: Not only the percentage of embryos survived after freezing period showed a significant difference compared to the control group, but there were also significant differences between the experimental groups ($P<0.05$). Embryo development after different freezing periods showed a significant decline compared to the control group ($P<0.0001$) and also between the experimental groups ($P<0.05$).

Conclusion: The freezing period for two-cell mouse embryos has negative effects on the embryo survival and cell division. It seems that freezing in two-cell stage embryos can reduce the ability to evolve to the higher stages. The best time to transfer to the frozen embryos to the uterus of female mice would be in 8-cell stage to provide the opportunity to continue the development of the reproductive system.

Keywords: Freezing period, Thawing, Cleavage, Two-cell embryos

* **Corresponding Author.**
Email: mog1339@gmail.com
Tel: 0098 911 151 0928
Fax: 0098 11 335 43087

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2014; Vol. 18, No 5, Pages 405-410

Please cite this article as: Navazesh A, Esmaeilnejad-Moghadam A, Karimpour-Malekshah AA, Rezaei N, Ghasemi H. The effect of freezing period on the viability and cleavage of two-cell embryos in mice. ***Feyz*** 2014; 18(5): 405-10.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31]

بررسی اثر مدت زمان انجماد بر زنده ماندن و کلیواژ جنین‌های دو سلولی موش

اعظم نوازش [۱]، امیر اسماعیل نژاد مقدم [۲*]، عباسعلی کریمپور ملکشاه [۳]، نور اله رضایی [۲]، هاتف قاسمی [۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: گزارشاتی مبنی بر تاثیر منفی انجماد شیشه‌ای بر بقا و کلیواژ جنین‌ها وجود دارد. هدف از این مطالعه، تاثیر مدت زمان انجماد جنین‌های دو سلولی موش بر زنده ماندن و کلیواژ آن‌ها بعد از ذوب می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، بعد از تحریک تخمک‌گذاری موش‌های ماده NMRI، جفت شدن با موش‌های نر و تایید وجود پلاک واژنی، موش‌های ماده ۴۸-۴۴ ساعت بعد از تزریق HCG، قطع نخاع شدند. جنین‌های دو سلولی حاصله به‌روش فلاشینگ جمع-آوری شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C با جریان CO2 نگهداری شدند. جنین‌ها در ۶ گروه شامل گروه شاهد، انجماد به-مدت ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت، یک هفته، دو هفته و یک ماه تقسیم شدند. بعد از اتمام زمان انجماد، جنین‌ها به روش استاندارد ذوب شده و زنده ماندن و تقسیم سلولی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: درصد جنین‌های زنده بعد از مدت زمان انجماد نه تنها نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد، بلکه اختلاف بین گروه‌ها هم مشهود بود ($P<۰/۰۵$). تکامل جنین‌ها بعد از انجماد در مدت زمان‌های مختلف نسبت به گروه شاهد ($P<۰/۰۰۰۱$) و در مقایسه‌های بین گروهی ($P<۰/۰۵$) افت چشم‌گیری را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: طول مدت نگهداری جنین‌های دو سلولی منجمد شده موش، تاثیر منفی بر بقاء و تقسیم سلولی آن‌ها دارد. به‌نظر می‌رسد که انجام انجماد جنین‌های موش در مرحله دو سلولی قابلیت تکامل به مراحل بالاتر را کاهش می‌دهد. بهترین زمان جهت انتقال به رحم موش ماده، ۸ سلولی می‌باشد تا فرصت ادامه تکامل در سیستم تولید مثل انجام پذیرد.

واژگان کلیدی: مدت زمان انجماد، ذوب، تقسیم سلولی، جنین‌های دو سلولی

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۳، صفحات ۴۱۰-۴۰۵

مقدمه

ناباروری مشکلی شایع است که ۱۵-۱۰ درصد زوج‌ها در سنین باروری با آن مواجهه می‌شوند [۱]. طبق تعریف، ناباروری عدم بارداری به مدت ۱۲ ماه یا بیشتر مشروط بر عدم استفاده از روش‌های پیشگیری از بارداری و داشتن نزدیکی است. شیوع نا-باروری اولیه، ۱۰/۶ درصد و ناباروری ثانویه، ۶/۷ درصد گزارش شده است [۲]. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی ۸۰ میلیون داوطلب درمان ناباروری در دنیا وجود دارد [۳]. امروزه استفاده از روش‌های کمک باروری (ART, Assisted reproductive technology) بهترین گزینه برای رفع مشکلات زوج‌های نابارور است. تلقیح آزمایشگاهی (IVF) و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI, Intra-cytoplasmic sperm injection)، دو روش موفقیت آمیز برای درمان ناباروری زوج‌ها و کمک برای حاملگی می‌باشد.

[۱] کارشناس ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

[۲] دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

[۳] استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

[۴] استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

*** نشانی نویسنده مسئول:**

دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی

تلفن: ۰۹۱۱ ۱۵۱۰۹۲۸ **دورنویس:** ۰۱۱۳۳۵۴۳۰۸۷

پست الکترونیک: mog1339@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۵ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۳/۷/۵

لقاح جنین‌های اضافی که با این روش به‌دست می‌آیند، منجمد می‌شوند تا در آینده بدون آن‌که بیمار دوباره وارد یک چرخه درمانی شود ذوب شده و برای انتقال مورد استفاده قرار گیرد [۴]. امروزه با توجه به فوائد انجماد جنین مانند کاهش ریسک تحریک بیش از حد دارویی تخمدان (OHSS, Ovarian hyper-stimulation syndrome)، بارداری‌های چند قلویی و در نهایت افزایش تجمعی احتمال باروری آن‌ها به‌عنوان جزء لاینفک روش-های کمک باروری محسوب می‌شود [۵]. در حال حاضر تمایل زیادی به استفاده از انجماد شیشه‌ای در حفظ جنین‌های حیوانی و انسانی وجود دارد. سرعت بالای انجماد و ذوب از ویژگی‌های بارز این تکنیک است. علی‌رغم تلاش‌های بسیار، فرآیند انجماد هنوز باعث تغییرات جدی کروموزومی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جنین می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که میزان موفقیت انجماد در نگهداری و بازگشت جنین نه تنها به روش انجمادی بلکه به مرحله تکوینی جنین هم بستگی دارد [۶]؛ در نتیجه احتمال می‌رود که آسیب پذیری جنین در مراحل مختلف سلولی باهم فرق کند. در همین راستا در سال‌های اخیر مطالعات مختلفی در رابطه با ارزیابی مرحله تکاملی مناسب برای انجماد جنین انجام شده است. انجماد شیشه‌ای در بسیاری از مراکز برای انجماد تخمک انسانی، جنین‌های مرحله پرونوکلئار، مرحله کلیواژ و مرحله بلاستوسیست [۱۱-۷] استفاده می‌شود. نتایج مقایسه جنین تازه با جنین منجمد در

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31]

بعضی از مطالعات بیان‌گر این مطلب است که میزان بقا و شانس درمان ناباروری با استفاده از انجماد جنین افزایش می‌یابد [۱۲]. در مراکز ناباروری در برخی موارد به‌دلیل آماده نبودن بیمار ناگزیر جنین‌های حاصله را فریز کرده و بعد از ۲۴ ساعت یا بیشتر مجددا ذوب کرده و انتقال می‌دهند و در مواقعی این زمان به هفته‌ها یا ماه‌ها می‌رسد. باید دانست که بعد از ذوب کردن جنین‌ها، تمامی آن‌ها مجددا به وضعیت قبل از انجماد بر نمی‌گردند و از طرف دیگر تمامی جنین‌های برگشت شده قابلیت تکامل به مراحل بعدی را ندارند. به‌نظر می‌رسد که یکی از عوامل این نابسامانی می‌تواند مدت زمان انجماد جنین‌ها باشد. این مطالعه به‌دنبال پاسخ‌گویی به این است که آیا مدت زمان انجماد شدن جنین‌های دو سلولی موش بر روند زنده ماندن و کلیواژ آن تاثیر دارد یا خیر؟

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی در تابستان ۹۲ در مرکز تحقیقاتی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران اجرا شد. در این تحقیق از موش سفید آزمایشگاهی گونه NMRI خریداری شده از انستیتو پاستور آمل استفاده شد. سن حیوانات بین ۶ تا ۱۲ هفته و سن نرها بیش از ۳ ماه بوده است و قبل از انجام آزمایش‌ها حداقل به‌مدت یک هفته در موسسه تحقیقات مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی مازندران طبق استانداردهای شناخته شده (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دسترسی آسان به غذا، آب، رطوبت و دمای کافی نگهداری شدند. هر مرحله کار و تزریق متشکل از ۵ موش ماده بوده است. به هر موش ۷/۵ واحد (PMSG, Pregnant mare's serum gonadotropin) به روش داخل صفاقی تزریق و پس از ۴۸ ساعت، ۷/۵ واحد HCG، تزریق شد. بلافاصله پس از تزریق HCG، هر موش ماده با یک موش نر از همان نژاد جفت شده و صبح روز بعد با کنترل پلاک واژنی موش‌های پلاک مثبت از بقیه جدا گردیده و در قفس جداگانه‌ای قرار گرفتند. از آنجایی‌که جنین‌های دو سلولی موش در مراحل ابتدایی دارای بلاک می‌باشند و در محیط آزمایشگاهی قادر به کشت نمی‌باشند لذا در این تحقیق، از جنین‌های دو سلولی که در مراحل آخر قرار داشتند (Late 2-cell) استفاده شد که ۴۸-۴۴ پس از تزریق HCG، از لوله رحمی حیوان خارج شده و به محیط کشت انتقال داده شدند. برای خارج کردن جنین‌ها از لوله رحمی موش، ابتدا موش‌های ماده پلاک مثبت با قطع نخاع گردنی کشته شده و در کنار شعله با استفاده از ابزار استریل با آغشته کردن قسمت شکمی حیوان به الکل، آن را باز کرده، روده‌ها را کنار زده و لوله رحمی را که در انتهای شاخ‌های رحمی قرار گرفته با دو برش ساده از تخمدان و شاخ رحمی جدا کرده و به قطره‌ای از محیط کشت که از قبل آماده شده و توسط روغن پوشیده شده بود، انتقال داده شد. از محیط کشت Ham's F10 حاوی بافر Hepes برای مرحله شستشو، فلاشینگ لوله رحمی و جمع آوری جنین‌ها استفاده شد (پودر این محلول محصول شرکت سیگما می‌باشد که توسط شرکت ژرف خرد تهران به صورت محلول درآمده است). هم‌چنین، محیط کشت T6 (خریداری شده از شرکت ژرف خرد تهران) برای کشت نهایی جنین‌ها و نگهداری آن‌ها در انکوباتور مورد استفاده قرار گرفت. انجماد و ذوب جنین‌ها بر اساس روش‌های استاندارد صورت گرفت [۶] محلول انجمادی اول (Vitrification Solution: VS1) با ترکیب محیط کشت Ham's+Hepes حاوی ۷/۵ درصد اتیلن گلیکول، ۷/۵ درصد دی متیل سولفوکسید و آلبومین سرم انسانی ۲۰ درصد استفاده شد. محلول انجمادی دوم (VS2) با ترکیبHam's+ Hepes حاوی ۱۵ درصد EG، ۱۵ درصد DMSO، ۰/۵ مولار ساکاروز و آلبومین سرم انسانی ۲۰ درصد استفاده شد. برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محیط ذوب اول (T1) از ۴۵/۷ میلی لیتر محیط Ham's+Hepes، ۳۴/۲۳ میلی گرم ساکاروز و ۲۰ میلی لیتر آلبومین سرم انسانی استفاده شد. هم‌چنین، برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محیط ذوب دوم (T2) از ۶۲/۸ میلی لیتر محیط Ham's+Hepes، ۱۷/۱۱۵ میلی گرم ساکاروز و ۲۰ میلی لیتر آلبومین سرم انسانی استفاده شد. همه محیط‌ها در زیر هود و به‌صورت استریل و به‌صورت جداگانه توسط فیلتر ۰/۲ میکرون تصفیه شده و در فلاسک و داخل یخچال نگهداری شدند. جنین‌های دو سلولی حاصله از نظر شکل و اندازه و هم‌چنین بلاستومرهای هم‌سان و زونای سالم مورد بررسی قرار گرفتند و بعد از یکسان سازی جنین‌ها به‌طور تصادفی ساده به ۶ گروه تقسیم شدند. گروه اول برای کشت (شاهد) و ۵ گروه بعدی برای انجماد (مورد) در نظر گرفته شد. کشت جنین‌های گروه شاهد برای مدت ۴ روز ادامه پیدا کرد. همگی جنین‌های دو سلولی ۵ گروه مورد منجمد شدند. انجماد جنین‌های دو سلولی در دو مرحله صورت گرفت؛ در زیر میکروسکوپ استریو با استفاده از میکروپیپت دهانی جنین‌ها کشیده شد و به قطره‌ای از محیط انجمادی اول (V1) انتقال داده شد. پس از ۱۰–۸ دقیقه، جنین‌ها به محیط انجمادی دوم (V2) منتقل شدند (همه این محیط‌ها از قبل در انکوباتور ۳۷°C از نظر دمایی متعادل شدند) و پس از گذشت یک دقیقه، به سرعت با حداقل مقدار از محیط V2 به‌صورت قطره‌ای بر روی کرایوتاپ قرار داده شده و بلافاصله وارد نیتروژن مایع شدند. مراحل ذوب جنین‌ها در فواصل زمانی ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت، یک هفته، دو هفته و یک ماه بعد از انجماد انجام شد. برای این منظور کرایوتاپ حاوی جنین‌ها از

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31]

نیتروژن مایع خارج شده و به‌سرعت به محیط ذوب اول (T1) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل شد. پس از گذشت یک دقیقه، جنین‌هایی که در محیط T1 رها شده بودند، با میکروپیپت دهانی کشیده شده و به سرعت به محیط T2 منتقل شدند. پس از ۳ دقیقه توقف در T2، جنین‌ها در ۳ قطره از محیط کشت شامل Ham's+Hepes با ۲۰ درصد سرم آلبومین انسانی به‌مدت ۵ دقیقه شستشو داده شده و سپس به محیط کشت اصلی که شامل T6 با ۴ میلی گرم سرم آلبومین گاوی بود، انتقال داده شد و میزان بقا پس از ذوب و روند تکاملی آن‌ها تا مرحله هچینگ (مرحله‌ای که جنین با شکافتن زونا پلوسیدا شروع به خارج شدن از آن می‌کند) بررسی شد. کشت جنین‌ها در انکوباتور $37\ ^{\circ}C$ با ۶ درصد جریان CO_2 ادامه یافت و در هر ۲۴ ساعت جنین‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست و هچینگ کشت داده شد و روز پیشرفت آن‌ها ثبت گردید. میزان زنده ماندن پس از ذوب (Survival rate)، میزان کلیواژ یا تقسیمات سلولی، نسبت رسیدن به مرحله بلاستوسیست و نسبت هچینگ شاخص‌هایی بودند که در ۵ گروه از جنین‌های دو سلولی ثبت شده و با هم مقایسه شدند. لازم به ذکر است جنین‌هایی که دارای مورفولوژی و اندازه طبیعی، رنگ روشن، بلاستومرهای یکسان، زونای سالم و فاصله طبیعی بین پرده شفاف و بلاستومر بودند، به‌عنوان جنین‌های زنده به ثبت می‌رسیدند. جنین‌هایی که رنگ تیره یا مایل به قهوه‌ای داشته و یا چروکیده بوده و بلاستومر آنها از پرده شفاف فاصله گرفته بود به‌عنوان جنین‌های غیر زنده از مطالعه حذف شدند. بررسی آماری یافته‌ها در نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ انجام شد. برای ارتباط بین گروه‌های مختلف با گروه کنترل از آزمون دقیق فیشر و آزمون مجذور کای با درجه آزادی ۱ استفاده شد. $P\leq ۰/۰۵$ بیان‌گر معنی‌دار بودن اختلاف تلقی شد.

نتایج

بر اساس یافته‌های این تحقیق انجماد جنین‌ها تاثیر به‌سزایی بر میزان زنده ماندن جنین‌ها دارد. چنانچه در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود نسبت جنین‌های سالم در گروه شاهد ۹۹/۵۴ درصد می‌باشد. با افزایش زمان نگهداری جنین‌ها در حالت انجماد، نسبت جنین‌های سالم پس از ذوب، کاهش یافته و نسبت جنین‌های دژنره افزایش می‌یابد. هم‌چنین، انجماد جنین‌ها بر میزان تکامل به مرحله ۴ و ۸ سلولی، مورولا، بلاستوسیست و هچینگ تاثیر منفی گذارده و مانعی برای رشد آنها می‌شود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱- تعداد و درصد جنین‌های سالم و دژنره بعد از ذوب کردن از انجماد

گروه	تعداد کل جنین‌ها	تعداد جنین های سالم (درصد)	تعداد جنین‌های دژنره (درصد)
شاهد	۲۲۰	❋(۹۹/۵۴)۲۱۹	(۰/۴۶)۱
۲۴ ساعت	۲۲۰	†† †(۹۰)۱۹۸	(۱۰)۲۲
۷۲ ساعت	۲۲۰	‡‡‡(۸۸/۶۳)۱۹۵	(۱۱/۳۷)۲۵
یک هفته	۲۲۰	ττ(۸۴/۰۹)۱۸۵	(۱۵/۹۱)۳۵
دو هفته	۲۲۰	□(۸۰/۴۵)۱۷۷	(۱۹/۵۵)۴۳
یک ماه	۲۲۰	(۷۲/۷۲)۱۶۰	(۲۷/۲۸)۶۰

* اختلاف معنی‌دار با گروه ۲۴ ساعت ($P<۰/۰۵$) و با دیگر گروه‌ها ($P<۰/۰۰۰۱$)
†عدم اختلاف معنی‌دار با گروه ۷۲ ساعت ($P=۰/۶۴$) و با گروه یک هفته ($P=۰/۰۹$).
†† اختلاف معنی با گروه دوهفته ($P=۰/۰۰۴$) و یک ماه ($P=۰/۰۰۰۱$).
‡ عدم اختلاف معنی‌دار با گروه یک هفته ($P=۰/۱۶$). ‡‡ اختلاف معنی‌دار با گروه دوهفته ($P=۰/۰۱$) و یک ماه ($P=۰/۰۰۰۱$).
τ عدم اختلاف معنی‌دار با گروه دو هفته ($P=۰/۳۱$).
π اختلاف معنی‌دار با گروه یک ماه ($P=۰/۰۳$).
□عدم اختلاف معنی دار با گروه یک ماه ($P=۰/۰۵۵$).

جدول شماره ۲- مقایسه میزان تکامل جنین‌های دو سلولی پس از انجماد شیشه‌ای در گروه‌های مختلف

گروه	تعداد جنین ۲ سلولی	تعداد جنین ۴ سلولی شده (درصد)	تعداد جنین ۸ سلولی شده (درصد)	تعداد جنین مورولا شده (درصد)	تعداد جنین بلاستوسیست (درصد)	تعداد جنین هچینگ شده (درصد)
شاهد	۲۱۹	❋(٪۹۹/۵۴)۲۱۸	❋(٪۹۹/۵۴)۲۱۸	❋(٪۹۹/۵۴)۲۱۸	❋(٪۸۹/۹۵)۱۹۷	❋(٪۲۴/۶۵)۵۴
۲۴ ساعت	۱۹۸	❋❋(٪۹۳/۹۳)۱۸۶	❋❋(٪۹۳/۹۳)۱۸۶	❋❋❋(٪۷۱/۷۱)۱۴۲	❋❋❋❋(٪۷/۰۷)۱۴	❋❋❋❋❋(٪۳/۰۳)۶
۷۲ ساعت	۱۹۵	†(٪۸۸/۷۱)۱۷۳	†(٪۸۸/۷۱)۱۷۳	††(٪۶۸/۷۱)۱۳۴	†††(٪۶/۱۵)۱۲	††††(٪۲/۵۶)۵
یک هفته	۱۸۵	‡(٪۸۴/۳۲)۱۵۶	‡(٪۸۴/۳۲)۱۵۶	‡‡(٪۶۱/۶۲)۱۱۴	‡‡‡(٪۲/۷۰)۵	۰
دو هفته	۱۷۷	T(٪۸۱/۹۲)۱۴۵	T(٪۸۱/۹۲)۱۴۵	T(٪۶۰/۴۵)۱۰۷	•(٪۲/۲۵)۴	۰
یک ماه	۱۶۰	(٪۹/۳۷)۱۵	(٪۹/۳۷)۱۵	(٪۶/۸۷)۱۱	۰	۰

❋اختلاف معنی‌دار نسبت به دیگر گروه ها ($P<۰/۰۰۰۱$). ❋❋ عدم اختلاف معنی‌دار با گروه ۷۲ ($P=۰/۰۶$) و اختلاف معنی‌دار با دیگر گروه‌ها ($P<۰/۰۰۲$). ❋❋❋عدم اختلاف معنی‌دار با گروه ۷۲ ساعت ($P=۰/۵۱$) و اختلاف معنی‌دار با دیگر گروه‌ها ($P<۰/۰۵$). ❋❋❋❋ عدم اختلاف معنی‌دار با گروه ۷۲ ساعت ($P=۰/۷۱$) و اختلاف معنی‌دار با دیگر گروه‌ها ($P<۰/۰۵$) ❋❋❋❋❋عدم اختلاف معنی‌دار با گروه ۷۲ ساعت ($P=۰/۶۱$). و اختلاف معنی‌دار با دیگر گروه‌ها ($P=۰/۰۱$). †عدم اختلاف معنی‌دار با گروه یک هفته ($P=۰/۲$) و گروه دوهفته ($P=۰/۰۶$) و اختلاف معنی‌دار با گروه یک‌ماه ($P<۰/۰۰۰۱$). †† عدم اختلاف معنی با گروه یک هفته ($P=۰/۱۴$) و دوهفته ($P=۰/۰۹$) و اختلاف معنی‌دار با گروه یک ماه ($P<۰/۰۰۰۱$). ††† اعدم خلاف معنی‌دار با گروه یک هفته ($P=۰/۱۰$) و دوهفته ($P=۰/۰۷$) و اختلاف معنی‌دار با گروه یک‌ماه ($P=۰/۰۰۰۷$). †††† اختلاف معنی‌دار با گروه‌ها ($P<۰/۰۵$). ‡ عدم اختلاف معنی‌دار با گروه دو هفته ($P=۰/۵۴$) و اختلاف معنی‌دار با گروه یک‌ماه ($P=۰/۰۰۰۱$). ‡‡ عدم اختلاف معنی داربا گروه دو هفته ($P=۰/۸۱$) و اختلاف معنی‌دار با گروه یک‌ماه ($P=۰/۰۰۰۱$). ‡‡‡ عدم اختلاف معنی‌دار با گروه دو هفته ($P=۰/۷$) و اختلاف معنی‌دار با گروه یک‌ماه ($P=۰/۰۳$).
T اختلاف معنی‌دار با گروه یک ماه ($P<۰/۰۰۰۱$). • عدم اختلاف معنی‌دار با گروه یک ماه ($P=۰/۰۵۵$)

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31]

بحث

این مطالعه تاثیر مدت زمان نگهداری جنین‌های دو سلولی موش در محیط انجماد را بر میزان بقا و رشد آن‌ها تا مرحله بلاستوسیست مورد بررسی قرار داد و نشان داد که طول مدت نگهداری جنین‌های دو سلولی موش در محیط انجماد، تاثیر منفی بر بقاء جنین‌ها و تقسیم سلولی آن‌ها دارد. عوامل متعددی بر میزان بقاء جنین‌های منجمد و تکامل آن‌ها به مراحل بالاتر تاثیر گذارند و صدماتی از قبیل پارگی قشر شفاف، افزایش وزیکول‌های سیتوپلاسمی، بر هم خوردن زمینه سیتوپلاسمی و تورم غشاء هسته از جمله آسیب‌هایی است که می‌تواند با انجماد بر جنین‌ها وارد شوند [۱۳]. مطالعه مزدرانی و همکارانش نتایجی مشابه نتایج این مطالعه را گزارش کردند. آن‌ها بیان داشتند که طول مدت نگهداری جنین‌ها در ازت مایع موجب افزایش ناهنجاری‌های کروموزومی پس از انجماد می‌شود که منجر به کاهش بقا و رشد آن‌ها می‌گردد [۱۴]. کاهش شدید بقا و رشد جنین‌های موش در مطالعه ما می‌تواند به همین دلایل و حساس بودن آن‌ها به تغییرات و شوک‌ها باشد. مطالعات متعدد دیگری هم که در این زمینه صورت گرفته است موید این مطلب می‌باشد. Van der Auwera و همکارانش نشان دادند که غلظت و مدت زمان قرار گیری جنین‌ها در محلول حاوی ضد یخ، اندازه سلول، نفوذ پذیری غشا و مرحله تکوینی جنینی از جمله پارامترهای مهم برای موفقیت انجماد شیشه‌ای می‌باشد [۱۵]. Royos و همکارانش نیز اعلام داشتند که انجماد جنین‌ها در مرحله دو سلولی با کاهش بقا و تکامل آن‌ها به مراحل بالاتر مواجه خواهد شد [۱۶]. مطالعه Zhang و همکارانش نشان داد که پتانسیل تکاملی جنین‌های دو سلولی موش بسیار حساس است. آن‌ها که اثر انجماد شیشه‌ای بر جنین‌های ۲، ۴ و ۸ سلولی موش را مورد بررسی قرار دادند، گزارش نمودند که میزان بقا پس از انجماد در هر سه رده سلولی یکسان بوده، اما میزان رسیدن به مرحله بلاستوسیست و هچینگ در جنین‌های دو سلولی به‌طور چشم‌گیری پایین بود [۶]. در مطالعه حاضر جنین‌های انجماد یافته دو سلولی بعد از ذوب شدن، میزان بقا ۸۲ درصد و میزان تقسیم سلولی ۶۰ درصد را نشان دادند اما میزان رسیدن به مرحله بلاستوسیست ۲ درصد بود، در صورتی‌که Ghorbani و همکاران به‌دنبال مطالعه‌ای که انجام دادند گزارش کردند که میزان رشد و نمو جنین‌های منجمد شده در مرحله مورولا افزایش چشم‌گیری دارد (۹۲ درصد) و از طرف دیگر این میزان در جنین‌های دو سلولی بسیار پایین بود (۲۵ درصد). آن‌ها اظهار داشتند که میزان بقا در جنین‌های دو سلولی منجمد شده بعد از دو هفته، ۸۶ درصد و میزان تکامل جنین‌ها، ۴۲ درصد و میزان بلاستوسیست ۲۵ درصد بود [۱۷]. این اختلاف شاید به‌دلیل نوع مدیوم و نوع روش انجماد و مدیوم‌های مرتبط باشد؛ چرا که Pacala و همکاران اعلام داشتند که روش‌های انجماد شیشه ای و نوع مدیوم‌های مورد استفاده بر روی بقا و رشد جنین‌ها بعد از ذوب شدن تاثیر دارد. آن‌ها اظهار داشتند که جنین‌های دو سلولی به عمل منجمد بسیار حساس می‌باشند [۱۸]. در مطالعه Hredzak و همکاران نشان داده شده که جنین‌های دو سلولی به انجماد بسیار حساس می‌باشند؛ به‌طوری‌که تنها ۲۲/۳ درصد جنین‌های دو سلولی به مرحله بلاستوسیست رسیدند. آن‌ها بیان کردند که عوامل متعددی از قبیل نوع موش، مرحله تکاملی جنین‌های منجمد شده و روش انجماد می‌تواند منجر به اختلاف نتایج مطالعات گوناگون باشد [۱۹]. مطالعه Cercas و همکاران هم تائید کرد که ذوب کردن جنین‌ها بعد از انجماد شیشه‌ای می‌تواند در روند کلیواژ جنین‌ها تاثیر بگذارد [۲۰]. هر چند که در مطالعه ما مشخص شد که طول مدت زمان انجماد تاثیر منفی بر بقا و تقسیم سلولی می‌گذارد، اما لازم به ذکر است که جنین‌های ذوب شده در هر یک از زمان‌های مورد آزمایش تا مرحله ۸ سلولی پیش رفته و اختلاف معنی‌داری با مرحله ۴ سلولی خود نداشتند. کاهش و اختلاف معنی‌دار بودن تکامل از مرحله ۸ سلولی به بعد رخ داد؛ به‌طوری‌که جنین‌های تکامل یافته به مرحله مورولا، بلاستوسیست و یا هچینگ با کاهش قابل توجهی نسبت به مرحله ۸ سلولی مواجه شدند.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مبین تاثیر منفی انجماد بر بقاء سلول می‌باشد. به‌طور کلی نتایج نشان می‌دهند که نگهداری جنین‌های دو سلولی موش در مدت زمان طولانی در ازت مایع باعث کاهش بقا و کلیواژ جنین‌های موش می‌شود و ممکن است این مشاهده برای جنین‌های انسانی نیز صادق باشد. اگر ضرورت یابد که جنین‌ها در مراحل پایین‌تری (دو سلولی) منجمد شوند، به‌نظر می‌رسد بعد از ذوب کردن و تکامل جنین بهترین زمان جهت انتقال، ۸ سلولی می‌باشد تا فرصت ادامه تکامل در سیستم تولید مثل انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

با تشکر و سپاس از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به‌دلیل حمایت مالی که از این پروژه نمودند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31]

References:

[1] Nojoumi M, Ashrafi M. Study of couples infertility in the west of tehran, in the year of 2000. ***J Iran Univ Med Sci*** 2002; 8(27): 8.

[2] Rohani Z, M. N Evaluation of the prevalence of fallopian tube abnormality in primary and secondary infertility based on hystrosalpingography findings. ***J Iran Univ Med Sci*** 1997; (53): 105-11.

[3] Nene U, Coyaji K, Apte H. a label of choice in the case of sexually dysfunctional couples. ***Patient Educ Couns*** 2005; 59(3): 234-8.

[4] Chen S, Lien Y, Chen H, Chao K, HO H, Yong Y. Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. ***Hum Reprod*** 2000; 15(12): 2598-603.

[5] Wiener-Megnazi Z, Lahav-Baratz S, Rothschild E, Abramovici H, Dirnfeld M. Impact of cryopreservation and subsequent embryo transfer on the outcome of in vitro fertilization in patients at high risk for ovarian hyperstimulation syndrome. ***Fertil Steril*** 2002; 78(1): 201-3.

[6] Zhang J, Cui J, Ling X, Li X, Peng Y, Guo X, et al. Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell, and 8-cell stages by cryotop method. ***J Assist Reprod Genet*** 2009; 26(11-12): 621-8.

[7] Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. ***Reprod Biomed Online*** 2005; 11(3): 300-8.

[8] Al-Hasani S, Osmen B, Koutlaki N, Schoepper B, Diedrich K, Schultze-Mosgau A. Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? ***Reprod Biomed Online*** 2007; 14(3): 288-93.

[9] Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, et al. randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. ***Hum Reprod*** 2008; 23(9): 1976-82.

[10] Rama Raju G, Jaya prakash G, Murali Krishna K, Madan K. Neonatal outcome after vitrified day3 embryo transfer: a preliminary study. ***Fertil Steril*** 2009; 92(1): 143-8.

[11] Youssry M, Ozmen B, Zohni K, Diedrich K, AL-Hasani S. Current aspects of blastocvst cryopreservation. ***Reprod Biomed Online*** 2008; 16(12): 311-20.

[12] Rezaei A, Khabazyan M, Ahmadi SF, Ahmadi S M, Razavi SH, Nasr Esfahani M H. factors affecting embryo freezing infertility help. ***J Iran Anatomical Sci*** 2006; 4(2): 153-61.

[13] Shee-Uan C, Y-R L. Open pulled straw for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. ***Hum Reprod*** 2000; 15(12): 2598-603.

[14] Mozdarani H, Moradi SZ. Effect of vitrification on viability and chromosome abnormalities in 8-cell mouse embryos at various storage durations. ***Biol Res*** 2007; 40(3): 299-306.

[15] Van der Auwera I, Cornillie F, Ongkowidjojo R, Pijnenborg R, Koninckx PR. Cryopreservation of pronucleate mouse owa: Slow versus ultrarapid freezing. ***Hum Reprod*** 1990; 5(5): 619-21.

[16] Royos AA. Quick freezing of mouse two, four and eight cell embryos with ethylene glycol plus sucrose or lactose: effects of developmental stage and equilibration period on survival in vitro. ***Animal Reprod Sci*** 1992; 27(2-3): 239-45.

[17] Ghorbani M, Sadrkhanlou R, Nejati V, Ahmadi A, Tizroo G. The effects of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol as vitrification protectants on different cleavage stages of mouse embryo quality. ***Veterinary Res Forum*** 2012; 3(4): 245-9.

[18] Pacala N, Ivan A, Cean A. Vitrification of mice embryos in different developmental stages using four vitrification methods. ***Biotechnol Biotechnological Equipment*** 2012; 26(5): 3324.

[19] Hredzak R, Ostro A, Maraaek I, Kaamarik J, Idilova V, Vesela J.Influence of slow-rate freezing and vitrification on mouse embryos. ***Acta Vet Brno*** 2005; (74): 23-7.

[20] Cercas R, Villas C, Pons I, Braña C, Fernandez-Shaw S. Vitrification can modify embryo cleavage stage after warming. Should we change endometrialpreparation? ***J Assist Reprod Genet*** 2012; 29(12): 1363-8.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-31]