مقایسه تکامل سلول تخم موش پس از انجماد آهسته با اتیلن گلیکول و پروپاندیول

دکتر حسن حسنی[۱]، دکتر ناصر سلسبیلی[۲]، دکتر پریچهر پاسبخش[۲]،
دکتر فیروزه اکبری[۳]، دکتر تقی الطریحی[۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: جنینهای اضافی که در هر سیکل با روش لقاح آزمایشگاهی بدست می‌آید، باعث شده که روشهای مختلف انجماد جنین با استفاده از ضدیخهای متعدد بسرعت پیشرفت کند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر اتیلن گلیکول بر روی میزان زنده ماندن و تکامل سلول تخم موش پس از انجماد آهسته و ذوب آنها بود.

مواد و روشها: تحقیق به روش تجربی (experimental) انجام شد. تخمک مثانهٔ دوم پس از تحریک تخمک‌گذاری از موشهای ماده بدست آمده و پس از مجاورت با اسپرم لقاح یافتند. ۱۶ تا ۱۷ ساعت پس از لقاح سلولهای تخم به صورت تصادفی به سه گروه کنترل، تست سمیت و انجماد تقسیم شدند. در گروه انجماد، جنینها با دو ضد یخ اتیلن گلیکول و پروپاندیول وبا استفاده از روش انجماد آهسته مشابه روش مورد استفاده در مورد جنین انسان منجمد شدند. جنینهای زنده پس از ذوب در محیط کشت به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شده و نتیجه تکوین آنها با گروه کنترل وخودشان مقایسه شد.

یافته‌ها: یافته‌های تست سمیت هیچگونه تفاوتی بین میزان زنده ماندن و تکامل سلولهای تخم تیمار شده با ضدیخهای اتیلن گلیکول و پروپاندیول با گروه کنترل نشان نداد. پس از ذوب میزان زنده ماندن سلولهای تخم منجمد شده با پروپاندیول بطور معنی‌دار بهتر از سلولهایی بود که با اتیلن گلیکول منجمد شده بودند (به ترتیب ۹۴/۱ و ۵۸/۲٪) و همچنین درصد تکامل سلولهای تخم منجمد شده با پروپاندیول تا مرحله بلاستوسیست در حال خروج از قشر شفاف با اختلاف معنی‌داری بیش از جنینهایی بود که با اتیلن گلیکول منجمد شده‌اند (به ترتیب ۶۸/۲ و ۳۹/۱٪، $p<0/0001$).

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: اتیلن گلیکول جایگزین مناسبی برای پروپاندیول در انجماد آهسته سلول تخم نیست. افزایش درصد زنده ماندن و تکامل جنینها تا مرحله بلاستوسیست در حال خروج از قشر شفاف با استفاده از پروپاندیول در انجماد آهسته سلول تخم مشخص می‌کند که پروپاندیول ماده مناسبی برای انجماد سلول تخم انسان نیز به شمار می‌آید.

واژگان کلیدی: اتیلن گلیکول، انجماد، سلول تخم ، لقاح آزمایشگاهی، موش

۱. دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه آناتومی
۲. دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه آناتومی
۳. دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه نازایی
۴. دانشگاه تربیت مدرس، گروه آناتومی

مقدمه

در طی چند دهه گذشته، لقاح آزمایشگاهی (IVF, In Vitro fertilization) و تکنیکهای مربوط به آن برای درمان بیماران نابارور روش بسیار مناسبی بوده است. اولین حاملگی حاصل از انتقال سلول تخم منجمد شده در سال ۱۹۸۳ توسط Trounson و Mohr (۱) و تولد اولین نوزاد انسان در سال ۱۹۸٤ توسط Zeilmaker و همکارانش (۲) گزارش شد.

تولد نوزادان سالم بعد از انتقال جنینهای منجمد و ذوب شده در مراحل اولیه تکامل بیش از پیش ارزش این تکنیک را برای بیماران نابارور که با روش IVF درمان می‌شوند به ارمغان آورده و از آن بعنوان یک روش رایج در مراکز درمانی استفاده می‌گردد. تعداد جنینهای اضافی که در هر سیکل با این روش بدست می‌آید، باعث شده است که روشهای انجماد جنین بسرعت پیشرفت کند. در این راستا بخاطر رعایت مسائل اخلاقی مربوط به استفاده از جنین انسان، تحقیقات اولیه جهت بررسی خواص ضد یخهای مختلف انجماد جنین با استفاده از مدلهای حیوانی انجام شد.

باید خاطر نشان ساخت که در زمان انجماد، سلولها در معرض آسیبهای گوناگونی قرار می‌گیرند که می‌توان به تشکیل کریستال داخل و خارج سلولی، تغییرات اسمزی و به دنبال آن جمع شدن سلولها اشاره کرد (۳،٤). علت این تغییرات را می‌توان انتخاب مرحله تکاملی جنین برای انجماد، نوع ضدیخ مورد استفاده، میزان غلظت آن، چگونگی انجام انجماد و ذوب دانست (٥،٦). به هرحال مرحله تکاملی جنین و انتخاب ضد یخ با غلظت مناسب عوامل مهمی در انجماد جنین محسوب می‌گردد. آزمایشهای متعدد که توسط محققین صورت گرفته حاکی از اختلاف انجمادپذیری جنینها در مراحل مختلف تکوین است. برای این که در زمان انجماد سلول تخم سنتز DNA در مرحله اینترفاز دچار اختلال نشود انجماد سلول تخم پس از ناپدید شدن پیش هسته نسبت به مراحل دو و چهار سلولی ارجحیت دارد، چون در بلاستومرها دومین و سومین سیکل سلولی غیر قرینه بوده و تعیین زمان مناسب برای انجماد مشکل است (۷).

در این راستا مطالعات متعددی در زمینه انجماد آهسته سلول تخم خرگوش (۸)، موش (۱۲-۹) و انسان (۱۵-۱۳) با ضد یخ پروپاندیول انجام شده است. این محققین گزارش کردند که درصد زیادی از جنینها پس از ذوب زنده مانده و تا مرحله بلاستوسیست تکامل می‌یابند. آنها همچنین تائید کردند که این ضدیخ برای انجماد آهسته سلول تخم مناسب است.

سمیت کم ضد یخ اتیلن گلیکول (۱۸-۱٦) و تولد نوزادان سالم پس از انجماد و ذوب (۲۲-۲۰) با این ضد یخ باعث شده تا از آن برای انجماد جنین انسان، خرگوش (۲۱،۱٦) و گوسفند (۲۲) نیز بطور گسترده‌ای استفاده شود. این ضد یخ علاوه بر انجماد آهسته جنین (۱۷) در انجماد شیشه‌ای (۱۹-۱۷) نیز بکار گرفته شده است. متاسفانه، هیچیک از مطالعاتی که بر روی نمونه‌های حیوانی انجام شده، با شرایط انجماد و ذوبی که در مورد انسان اجرا می‌شود مشابهت نداشته است. ولی فقط در دو مطالعه (۲۳،۱۲) این دو ضد یخ با غلظت مشابه در انجماد آهسته جنینهای یک و چهار سلولی موش با یکدیگر مقایسه شده است. در این مطالعات شرایط انجماد و

ذوب با روشی که در مورد انجماد آهسته جنین انسان اجرا می‌شده، مطابقت داشته است.

لذا مطالعه حاضر بگونه ای طراحی شده است تا از دو ضد یخ اتیلن گلیکول و پروپاندیول با غلظت ۱/۵ مول با پروتکل مشابه (۲۳) برای انجماد آهسته سلول تخم موش استفاده شود، تا درصد زنده ماندن و تکامل جنینها پس از ذوب با یکدیگر مقایسه و با تعویض محیط کشت در هر ۲٤ ساعت میزان زنده ماندن و تکامل جنینها بهبود یابد

مواد و روشها

جمع آوری تخمک موش:

تحقیق به روش تجربی بر روی ۵۹۵ سلول تخم از موشهای ماده نژاد NMRI در سن ۸-٦ هفته انجام گرفت. برای تحریک تخمک‌گذاری از IU ۱۰ human Menopausal Gonadotropin Hormone (hMG, Manufactured by: I.F.Serono S.P.A 125, via Casilina, Italy) و IU ۱۰از human Chorionic Gonadotropin (hCG, Gonatropin, Teikoku hormone Zoki)با فاصله ٤۸ ساعت به طریق تزریق داخل صفاقی استفاده شد. موشها ۱۳ تا ۱٤/۵ ساعت پس از تزریق به روش قطع نخاع گردنی کشته شده و به سرعت لوله های رحمی آنها جدا و به قطره‌ای از محیط کشت T6 (۲٤).

(NaCl 80.77, Kcl 1.48, NaH_2PO_4 0.39, $MgCl_2$ 0.49, $NaHCO_3$ 25, Phenol red 0.01, Na Pyruvate 23.29, Glucose 5.55, $CaCl_2$ 1.77, Peniciline G 62.28) $mg.ml^{-1}$ حاوی۵ میلی‌گرم (Bovine Serum BSA Albumin, fraction V, Sigma, St. Louis, MO) انتقال یافتند. در زیر استریومیکروسکوپ با سوراخ کردن لوله رحمی، تخمکها از لوله‌های رحمی خارج و به قطره محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA منتقل گردیدند. سلولهای کومولوس توسط هیالورونیداز ۰/۱ درصد (Sigma, St. Louis, MO) برداشته شد و پس از سه مرتبه شستشو، تخمکهایی که دارای یک جسم قطبی بودند قبل ازinsemination در محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA زیر روغن (M8410; Sigma) در انکوباتور 37^{oc} با $5\%\ CO_2$ و $5\%\ O_2$ کشت داده شد.

لقاح آزمایشگاهی یا IVF

برای انجام لقاح آزمایشگاهی از روش Wood استفاده شده است (۲۵). موش نر از همین نژاد به روش قطع نخاع گردنی کشته شده و به سرعت اپیدیدیم آنها جدا و پس از برش ظریف بر روی آن به قطره۳۰۰µL از محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر BSA منتقل شد. پس از ظرفیت پذیری اسپرم (۱/۵ ساعت در انکوباتور37^{oc} با $5\%\ CO_2$ و $5\%\ O_2$)، ۳۰µL از سوسپانسیون اسپرم به قطره ۳۰۰µL جدید محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA منتقل شد. سپس تخمکها به این قطره اضافه شد (غلظت نهایی اسپرم $1/2\times10^{6}$ در میلی‌لیتر بود). ٤ تا ٦ ساعت پس ازinsemination تخمکهای حاوی پیش هسته (علامت لقاح تخمک وجود دو پیش هسته و دومین جسم قطبی بوده که ٦ تا ۸ ساعت پس از insemination مشاهده می‌شود) را چند بار در محیط کشتT6 شستشو داده و در قطره ۳۰µL محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیترBSA بمدت ۱٦ تا ۱۷ ساعت پس ازinsemination [زیر روغن (M8410;

(Sigma) در انکوباتور 37^{oc} با CO_2 5% و 5% O_2] کشت داده شد.

فقط سلولهای تخم که مورفولوژی طبیعی داشته انتخاب و به گروههای کنترل، تست سمیت و انجماد تقسیم شد.

تهیه محلولهای انجماد و ذوب

محلولهای انجماد و ذوب در بافر PBS (phosphate buffer solution) حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA با و بدون ساکارز(S1888;Sigma) تهیه شد. از ضد یخهای اتیلن گلیکول (E9129; Sigma) و پروپاندیول (P6209; Sigma) با غلظت ۱/۵ مول استفاده شد. قبل از انجماد آهسته، سلولهای تخم با دو محلول انجمادی از هر ضد یخ تیمار شدند، که عبارتند از:

۱/۵ مول اتیلن گلیکول و ۱/۵ مول اتیلن گلیکول +۰/۱ مول ساکارز

۱/۵ مول پروپاند یول و ۱/۵ مول پروپاند یول +۰/۱ مول ساکارز

پس از انجماد آهسته ، برای سلولهای تخم نیز از سه محلول از هر ضد یخ استفاده شد، که عبارتند از:

۱ مول اتیلن گلیکول + ۰/۲ مول ساکارز ، ۰/۵ مول اتیلن گلیکول +۰/۲ مول ساکارز و ۰/۲ مول ساکارز

۱ مول پروپاند یول + ۰/۲ مول ساکارز ، ۰/۵ مول پروپاند یول +۰/۲ مول ساکارز و ۰/۲ مول ساکارز

تست سمیت ضد یخها

برای بررسی سمیت ضد یخها (اتیلن گلیکول و پروپاندیول)، تعدادی سلول تخم با محلول ۴/۵ مول ضد یخ بمدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه تیمار شده و سپس در سه مرحله با شستشو در محلولهای ۱ و ۰/۵ مول ضدیخ و بافر، ضدیخ از سلول تخم خارج شد. پس از شستشوی جنینهای تیمار شده با ضدیخ، آنها را بمدت ۱۲۰ ساعت در محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA زیر روغن در انکوباتور 37^{oc} با CO_2 5% و 5% O_2 کشت داده، میزان زنده ماندن و تکامل آنها تا مرحله بلاستوسیست و خروج از قشر شفاف با گروه کنترل مقایسه شد.

مراحل اجرای انجماد و ذوب

برای هر دو ضد یخ مراحل و روش انجماد و ذوب (۲۳) یکسان بوده، همچنین تمام مراحل پاساژ سلولهای تخم در درجه حرارت آزمایشگاه (۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. سلولهای تخم با ضدیخ ۱/۵ مول و محلول حاوی ضدیخ و ساکارز هر یک بمدت ۱۰ دقیقه متعادل شدند. پس از انتقال سلولهای تخم (۱۵ تا ۲۰ جنین در هر نی) به نی‌های مخصوص انجماد (I.M.V.L'Aigle, France) ، نی‌ها را داخل دستگاه انجماد (Kryo 10 machine,planer,Midlesex UK) قرار داده و سلولهای تخم بصورت زیر سرد شدند: از ۲۲^{oc} تا -۷^{oc} با سرعت -۲^{oc} در دقیقه، در -۷^{oc} شروع یخ زدگی القا شد، از -۷^{oc} تا -۳۳^{oc} با سرعت $-۰/۳^{oc}$ در دقیقه، از -۳۳^{oc} تا -۱۵۰^{oc} با سرعت -۵۰^{oc} و سرانجام نی‌ها یکباره وارد نیتروژن مایع (-۱۹۶^{oc}) شدند.

برای ذوب نی‌های حاوی جنین از نیتروژن مایع خارج و بمدت ۱۵ ثانیه در حرارت آزمایشگاه و بمدت ۲۰ ثانیه در بن‌ماری ۳۷^{oc} قرار داده شدند. پس از ذوب، انتهای نی‌ها را بریده و برای برداشت ضد یخ از سلولهای تخم سه مرحله زیر انجام شد:

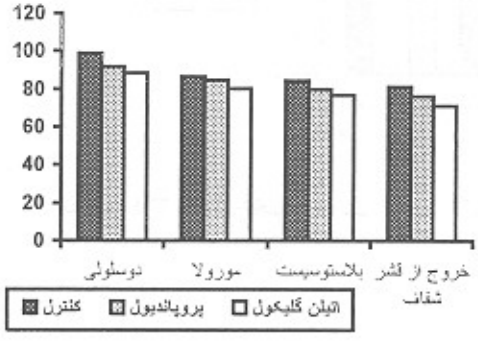
۱۰ دقیقه در محلول ۱ مول ضد یخ + ساکارز، ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۵ مول ضد یخ + ساکارز ، ۱۰ دقیقه در ساکارز، و ۱۰ دقیقه شستشو در بافر. بلافاصله سلولهای تخم زنده و مرده بوسیله میکروسکوپ معکوس از نظر مورفولوژیکی ارزیابی شدند. در نهایت سلولهای تخم (۱۰ سلول در هر قطره) درقطره۳۰μL محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر BSA زیر روغن در انکوباتور 37^{oc} با $5\%\ CO_2$ و $5\%\ O_2$ بمدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند.

میزان زنده ماندن و درصد تکامل جنین بین گروهها با روش آماری χ^2 بررسی و مقایسه شد.

یافته‌ها

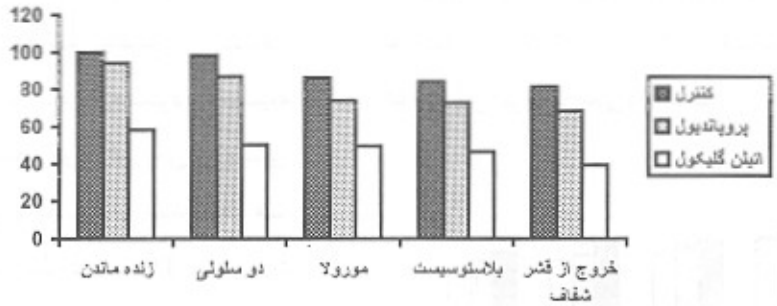
تحقیق روی ۵۹۵ سلول تخم موش شامل ۱۴۰ سلول در گروه کنترل، ۸۶ سلول برای تست سمیت اتیلن گلیکول، ۱۰۵ سلول تخم برای تست سمیت پروپاندیول و تعداد ۲۶۴ سلول با ضد یخهای اتیلن گلیکول و پروپاندیول (به ترتیب ۱۱۰ و ۱۵۴ سلول) بروش انجماد آهسته انجام شد.

نتایج تست سمیت برای اتیلن گلیکول و پروپاندیول در نمودار ۱ و نشان داده شده است. سلولهای تخم که با اتیلن گلیکول و پروپاندیول تیمار شده‌اند (به ترتیب ۸۸/۳ ٪و ۹۱/۶٪)، پس از ۲۴ ساعت کشت به مرحله دو سلولی تکامل یافته‌اند در حالیکه این میزان در گروه کنترل ۹۸/۶٪ بود. پس از ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت از کشت، سلولهای تخم تیمار شده با ضد یخ اتیلن گلیکول به مراحل مورولا، بلاستوسیست و خروج از قشر شفاف (به ترتیب، ۸۰/۲٪، ۷۶/۷ ٪و ۷۱٪) تکامل یافتند، این مقادیر در مورد آن دسته از سلولهای تخم که با ضد یخ پروپاندیول تیمار شده‌اند به ترتیب، ۸۴/۷، ۸۰ و ۷۶/۲ درصد و در گروه کنترل به ترتیب، ۸۶/۴، ۸۴/۳ و ۸۱/۴ درصد می‌باشد که تفاوت بین گروهها معنی‌دار نیست.



نمودار ۱: توزیع ۳۳۱ سلول تخم برحسب درصد تکامل آنها به تفکیک نوع ضدیخ و گروه کنترل

نتایج انجماد سلولهای تخم موش با ضد یخهای اتیلن گلیکول و پروپاندیول در نمودار ۲ نشان داده شده است. از تعداد کل ۲۶۴ سلول منجمد شده با ضد یخهای اتیلن گلیکول و پروپاندیول در ۱۰ مرحله آزمایش، به ترتیب ۵۸/۲ و ۹۴/۱درصد پس از ذوب زنده مانده‌اند که در هر دو گروه پائینتر از کنترل بوده است. آن دسته از سلولهای تخم که با استفاده از ضد یخ اتیلن گلیکول منجمد شده‌اند، پس از ۲۴، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت از کشت (به ترتیب، ۵۰/۲، ۴۹/۵، ۴۶/۴ و ۳۹/۱درصد) به مراحل دو سلولی، مورولا، بلاستوسیست و خروج از قشر شفاف تکامل یافته‌اند که با گروه کنترل (به ترتیب، ۹۸/۶، ۸۶/۴، ۸۴/۳ و ۸۱/۴درصد) و با آندسته از سلولهای تخم که با استفاده از پروپاندیول منجمد شده‌اند(۸۷، ۷۴، ۷۲/۷ و ۶۸/۲درصد) تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p<0/0001$).



نمودار ۲: توزیع ۲٦٤ سلول تخم برحسب درصد تکامل آنها به تفکیک نوع ضدیخ در انجماد آهسته و گروه کنترل

بحث

نتایج تست سمیت برای اتیلن گلیکول و پروپاندیول نشان داد که اتیلن گلیکول و پروپاندیول بر میزان زنده ماندن و تکامل سلولهای تخم موش سمیت کمی دارد، که تائیدی بر مطالعات قبلی (۱۷، ۱۹، ۲۰) است که بر روی جنین حیوانات دیگر انجام شده است. وقتی که سلول تخم با اتیلن گلیکول و پروپاندیول تیمار می‌شود، پس از گذشت زمان کوتاهی چروکیدگی آن برطرف شده و حجم اصلی خود را بدست می‌آورد، این وضعیت نشان می‌دهد که اتیلن گلیکول بسرعت از طریق غشای سلول و منطقه شفاف انتشار یافته و همچنین سریعا به تعادل می‌رسد. از طرف دیگر ، تیمار کردن سلول با این غلظت اتیلن گلیکول نیز باعث چروکیدگی و افزایش فشار اسمزی سلول شده است.

تحقیق حاضر نشان داد که اتیلن گلیکول در انجماد آهسته بر روی میزان زنده ماندن سلولهای تخم موش با استفاده از مراحل مختلف ذوب مشابه با مراحل ذوب جنین انسان تاثیر دارد که با مطالعه **Emiliani** (۱۲) مطابقت و با گزارش **Shaw** (۲۳) مغایرت دارد. در این مطالعات ذوب جنین با گرم کردن آهسته (قرار دادن نی ها در درجه حرارت آزمایشگاه بمدت ۱۵ ثانیه) و سپس با گرم کردن سریع (قرار دادن نیها بمدت ۲۰ ثانیه در بن ماری ۳۷^{oc}) شروع شد، ولی فقط **Shaw** افزایش درصد زنده ماندن جنینها پس از ذوب را گزارش کرد. کاهش درصد زنده ماندن جنینها در مطالعه ما و **Emiliani** ممکن است به علت روش ذوب جنینها باشد بگونه‌ای که مرحله آغازین گرم کردن یا خیلی سریعتر (قرار دادن نیها بمدت کمتر از ۲۰ ثانیه در بن ماری ۳۷^{oc}) و یا خیلی کندتر(قرار دادن نیها در درجه حرارت آزمایشگاه بمدت بیش از ۱۵ ثانیه) انجام شده است. نتایج مطالعه ما و **Emiliani** نشان داد که درصد زنده ماندن (به ترتیب، ۵۸/۲ و ٦۰درصد) جنین یک سلولی پس از انجماد آهسته با ضد یخ اتیلن گلیکول پائینتر از میزانی است که توسط **Shaw** (٪٦٥) گزارش شده است. در مقایسه با مطالعه **Shaw**، درصد پائینتر زنده ماندن سلولهای تخم در مطالعه ما و **Emiliani**، ممکن است به علت تفاوت ژنتیکی

بین نژادهای موش باشد. تفاوت ژنتیکی بین نژادهای مختلف حیوانات می‌تواند بر مقاومت جنینها نسبت به انجماد و بر واکنش بین جنین و ضدیخ تاثیر بسزایی داشته باشد (۱۲).

درصد تکامل سلول تخم موش منجمد شده با اتیلن گلیکول تا مراحل دو سلولی و بلاستوسیست در حال خروج از قشر شفاف در این مطالعه (به ترتیب، ۵۰/۲ و ۳۹/۱درصد) کمتر از مطالعه قبلی (به ترتیب، ۸۲ و ۴۴٪) بود که توسط **Emiliani** انجام شده است. در مقایسه با مطالعه **Emiliani**، درصد پائینتر تکامل جنینهای یک سلولی تا مراحل دو سلولی و بلاستوسیست در حال خروج از قشر شفاف، ممکن است به علت تفاوت ژنتیکی بین نژادهای موش و به علت تفاوت شرایط و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مربوط به آزمایشگاه باشد. بهر حال، درصد تکامل جنین یک سلولی موش منجمد شده با اتیلن گلیکول تا مراحل دو سلولی و بلاستوسیست در حال خروج از قشر شفاف در این مطالعه و مطالعه **Emiliani** کاهش چشمگیری را نشان داده است. بنابر این مطالعه ما و **Emiliani** ثابت کرد که اتیلن گلیکول ضد یخ مناسبی برای انجماد آهسته جنین در مرحله یک سلولی نمی‌باشد، ولی **Shaw** و همکاران ثابت کردند که انجماد آهسته جنین چهار سلولی با ضد یخ اتیلن گلیکول مناسب بوده و پس از ذوب میزان زنده ماندن جنینها افزایش می‌یابد، بنابراین پتانسیل استفاده از این ضد یخ برای انجماد جنین انسان در این مرحله را تقویت کرد.

در مطالعه حاضر، با استفاده از ضد یخ پروپاندیول در انجماد آهسته سلول تخم موش پس از ذوب مشخص شد که درصد زیادی از سلولها زنده مانده (۹۴/۱٪) و به ترتیب، ۸۷٪ و ۶۸/۲٪ به مراحل دو سلولی و خروج از قشر شفاف تکامل یافته اند. که تائیدی بر مطالعات قبلی است (۱۵-۸ و۲۳). در آخرین مطالعه (۲۳) درصد بالایی از جنینهای یک سلولی (۹۲٪) منجمد شده با پروپاندیول پس از ذوب زنده مانده، ۹۶٪ به مرحله دو سلولی و ۷۰٪ به مرحله بلاستوسیست در حال خروج از قشر شفاف تکامل یافته‌اند. در مطالعه حاضر، با استفاده از ضد یخ پروپاندیول در انجماد آهسته سلول تخم موش (به ترتیب، ۹۴/۱، ۸۷ و ۶۸/۲درصد) نتایج تقریبا مشابهی بدست آمده است. اگر چه مراحل انجماد و ذوب در این دو مطالعه مشابه بوده است ولی در مطالعه ما پس از ذوب سلولهای تخم و کشت آنها بمدت ۱۲۰ ساعت، بازای هر ۲۴ ساعت جنینهای زنده به محیط کشت جدید منتقل شد. با توجه به تفاوت نژاد موش در این مطالعه و تحقیق مشخص شد که تعویض محیط کشت جنین می‌تواند تکامل آنها را بهبود بخشد، که تائیدی بر مطالعه قبلی است (۲۷). پس از انجماد و ذوب سلول باقیمانده ضد یخ موجود در سلول بتدریج از آن خارج شده و می‌تواند بر روی جنین تاثیر مخربی ایجاد کند، بنابر این تعویض محیط کشت از این وضعیت جلوگیری می‌کند. این مطالعه نیز ثابت کرد که ضد یخ پروپاندیول برای انجماد آهسته جنین یک سلولی مناسب است، و وقتیکه از پروپاندیول برای انجماد جنین در این مرحله استفاده می‌شود، درصد زنده ماندن و تکامل جنینها تا مراحل بالاتر افزایش می‌یابد.

در نتیجه، اتیلن گلیکول جایگزین مناسبی برای پروپاندیول در انجماد آهسته جنین یک سلولی نیست. در صورتیکه، افزایش درصد زنده ماندن و تکامل جنینها تا مرحله بلاستوسیست در حال خروج از قشر شفاف با استفاده از پروپاندیول در انجماد آهسته جنین یک سلولی مشخص می‌کند که پروپاندیول ماده مناسبی برای انجماد جنین یک سلولی انسان به شمار می‌آید..

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم پزشکی تهران (خصوصا اساتید گروه آناتومی) و مرکز ناباروری کوثر برای تامین هزینه ها، واز همکاری آقایان دکتر اکبری و دکتر نوروزی، آقایان بهاروند و شیخی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature 1983; 305: 707-9.

2- Zeilmaker GH, Alberda AT, Van Gent I. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril 1984; 42: 293-6.

3- Mazur P, Rall WF, Leibo SP. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Cell Biophys 1984; 6:197-213.

4- Kasai M. Principles of the cryopreservation of mammalian embryos by vitrification. In: Miyamoto H, Marbe N (eds). Reproductive Biology Update: Novel Tools for Assessment of Environment Toxicity. Shoukadou Bookseller Company, Kyoto, Japan, p: 415-424

5- Kono T, Suzuki O, Tsunoda Y. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. Cryobiology 1988; 25: 170-3.

6- Zhu SE, Sakurai T, Edashige K, Machida T, Kasai M. Cryopreservation of zona-hatched mouse blastocysts. J Reprod Fertil 1996; 107:37-42.

7- Balakier H, MacLusky NJ, Casper RF. Characterization of the first cell cycle in human zygotes: implications for cryopreservation. Fertil Steril 1993; 59: 359-65.

8- Al-hasani S, Hepnar C, Diedrich K, Van der Ven H, Krebs D. Cryopreservation of rabbit zygotes. Hum Reprod 1992; 7 Suppl 1 :81-3.

9- Van der Auwera I, Cornillie F, Ongkowidjojo R, Pijnenborg R, Koninckx PR. Cryopreservation of pronucleate mouse ova: slow versus ultrarapid freezing. Hum Reprod 1990; 5(5):619-21.

10- Liu J, Van den Abeel E, Van Steirteghem AC. Assessment of ultrarapid and slow freezing procedures for 1-cell and 4-cell mouse embryos. Hum Reprod 1993; 8(7):1115-9.

11- Van den Abbeel E, Van der Elst J, Van Steirteghem AC. The effect of temperature at which slow cooling is terminated and of thawing rate on the survival of one-cell mouse

embryos frozen in dimethyl sulfoxide or 1 ,2-propandiol solutions. Cryobiology 1994; 31(5):423-33.

12- Emiliani S, Bergh MVD, Vannin AS, Biramane J, Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propandiol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. Hum Reprod 2000; 15:905-10.

13- Tesarik J, Hanzelka Z, Travnik P. Developmental capacity of human embryos after cryopreservation in the unicellular zygote stage. Cesk Gynekol 1989; 54(10):740-7.

14- Wright G, Wiker S, Elsner C, Kort H, Massey J, Mitchell D, et al. Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications for cryopreservation. Hum Reprod 1990; 5(1):109-15.

15- Veeik LL, Maloney MK, Amundson CH, Muasher SJ, Borthman LJ, Jones HW, et al. Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. Fertil Steril 1993; 59: 1202-7.

16- Donnay I, Auquer P, Kaidi S. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. Anim Reprod Sci 1998; 52:93-104.

17- Bautista NAJ, TakahashiY, Kanagawa H. In vitro viability of mouse zygotes vitrified in ethylene glycol. Jpn J Vet Res 1998; 45: 193-8 .

18- Zhu SE, Kasai M, Otoge H. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. J Reprod Fertil 1993; 98:139-45.

19- Ali J, Shelton JN. Vitrification of pre-implantation stages of mouse embryos. J Reprod Fertil 1993; 98:450-65.

20- Zhu SE, Sakuray K, Edashige K. Cryopreservation of zone-hatched mouse blastocysts. J Reprod Fertil 1996; 107:37-42.

21- 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; 89:91-7.

22- Cocero MJ, Sebastian AL, Barragan ML. Differences on post-thawing survival between bovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. Cryobiology 1996; 33:502-7.

23- Shaw JM, Ward C, Trounson AO. Evaluation of propandiol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. Hum Reprod 1995; 38: 95-105.

24- Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. J Reprod Fertil 1982; 66:161-8.

25- Wood MJ, Whittingham DG, Lee SH. Fertilization failure of mouse oocytes is not due to premature cortical granule release. Biol Reprod 1992; 46:1187-95.

26- Voelkel SA, Hu XY. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology 1992; 37: 23-35.

27- Takagi M, Sakonju I, Suzuky T. Viability of inner cell mass of frozen thawed IVF/IVM bovine embryos using various cryoprotectants. Theriogenology 1994; 41: 310-5.

28- Kaufmann RA, Menezo Y, Azout A. Co-culture blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. Fertil Steril 1995; 64: 1125-9.