

بقاء و رشد رویان‌های ۸ سلولی موش پس از منجمد نمودن سریع در دو سرما محافظ حاوی گلیسرول- سوکروز و اتیلن گلیکول- فایکول- سوکروز

فاطمه توده دهقان^۱ محمدحسن متدین^۱ حبیب‌الله ناظم^۲ علی محمدپور^۳ پرویز تاجیک^{۴*}

(۱) موسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی کرج، کرج-ایران.

(۲) گروه فیزیولوژی جانوری، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان-ایران.

(۳) فارغ‌التحصیل دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان-ایران.

(۴) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران-ایران.

(دریافت مقاله: ۱۵ مهر ماه ۱۳۸۶، پذیرش نهایی: ۱۸ اردیبهشت ماه ۱۳۸۸)

چکیده

ذخیره و نگهداری طولانی مدت رویان پستانداران از مدت‌ها قبل شناخته شده است. امروزه انجماد و نگهداری گامت و رویان ابزاری مناسب برای حفظ صفات ژنتیکی حیوانات آزمایشگاهی، گونه‌های کمیاب و در معرض انقراض محسوب می‌شود و این سلول‌های منجمد، جایگزین با ارزشی برای کلنی حیوانات پرورشی فعال می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر انجماد شیشه‌ای و ویتریفیکاسیون، با استفاده از سرما محافظ‌های گلیسرول- سوکروز (GS) و اتیلن گلیکول- فایکول- سوکروز (EFS40) بر روی بقاء رویان‌های مرحله ۸ سلولی و مورولا در موش آزمایشگاهی بود. تعداد ۸۱ سر موش ماده بالغ نژاد NMRI بعد از ازدیاد تخمک‌گذاری با PMSG و تزریق HCG جفت اندازی شدند و تعداد ۳۵۱ رویان بدست آمد، که ۲۵۸ عدد (۷۳/۵ درصد) از آن‌ها در مراحل ۸ سلولی و مورولا بودند. تعداد ۱۸۸ رویان ۸ سلولی و مورولا به قطره‌های حاوی سرما محافظ‌های گلیسرول- سوکروز و EFS40 منتقل شدند. بعد از آن به طور متوسط ۴ رویان در هر نی قرار داده شد و انتهای نی‌ها مسدود گردید. سپس طی دومرحله با استفاده از بخار نیتروژن مایع سرد و سپس غوطه‌وری در نیتروژن مایع تا دمای منهای ۱۹۶ درجه سانتیگراد سرد شدند. یک تا سه ماه بعد رویان‌ها ذوب، بازیافت و کشت داده شدند. میزان بازیافت رویان‌های گروه EFS، (۹۰ درصد) بیشتر از این مقدار در گروه GS (۸۵ درصد) محاسبه گردید. همچنین میزان بقاء و تکوین رویان‌ها به مرحله بعدی، بلاستوسیستی، در سرما محافظ EFS40 (۵۳/۷ درصد) نسبت به سرما محافظ GS (۱۹/۶ درصد) اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0.001$) با این حال گروه EFS در مقایسه با رویان‌های تازه، غیر منجمد، که درصد تکوین به مرحله بلاستوسیست در آن‌ها ۶۸/۶ درصد بود اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). ولی این میزان با گروه GS اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.001$). بطور کلی نتایج حاصل از مطالعه ما نشان می‌دهند که ویتریفیکاسیون رویان‌های ۸ سلولی و مورولای موش نژاد NMRI با استفاده از سرما محافظ EFS40 روشی مناسب، آسان و مقرون به صرفه جهت ذخیره‌سازی و نگهداری این رویان‌ها در حالت انجماد می‌باشد.

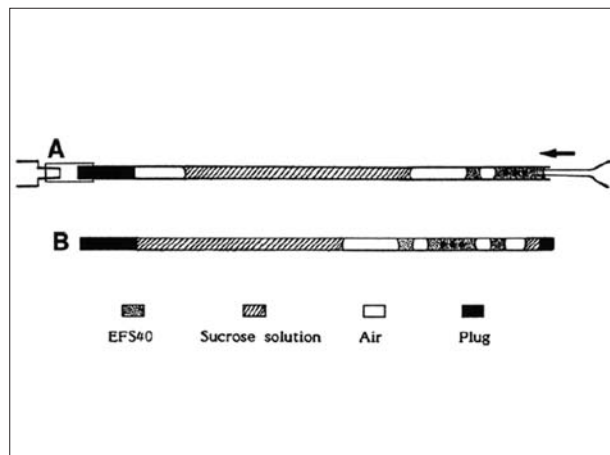
واژه‌های کلیدی: سرما محافظ، انجماد رویان، رویان موش، ویتریفیکاسیون، افزایش تخمک‌گذاری.

قابل برنامه‌ریزی جهت کاهش تدریجی درجه حرارت نیازمند می‌باشد. این روش پرهزینه و زمانبر است. روش انجماد سریع که برای اولین بار توسط Rall و Fahy (۲۲) و سپس توسط Massip و همکاران (۱۶) انجام شد؛ ساده و کم هزینه می‌باشد. این روش تحت به‌عنوان ویتریفیکاسیون شناخته شده است، مزایای آن در مقایسه با روش قدیمی، زمان کم و عدم تشکیل کریستال‌های یخ که باعث آسیب‌های سلولی می‌گردد، می‌باشد. روش ویتریفیکاسیون برای انجماد رویان‌های پیشرفته شامل بلاستوسیست‌های هچ شده که در آزمایشگاه (in vitro) تولید شده و یا از جانور (in vivo) استحصال شده‌اند نیز مناسب است (۲۹). آسیب‌های وارده به رویان در طی فرآیند انجماد ممکن است بواسطه تشکیل کریستال‌های یخ داخل و خارج سلولی، مسمومیت شیمیایی و یا آسیب اسمزی ایجاد گردند (۱۱)، سرما محافظ‌های متعددی در انجماد رویان مورد استفاده قرار می‌گیرد که بر اساس ایجاد مسمومیت در رویان از پائین‌ترین سمیت عبارتند از: اتیلن گلیکول (EG)، پروپاندیول، گلیسرول، دی متیل سولفوکسید (DMSO) و

مقدمه

یکی از اهداف انجماد رویان، نگهداری طولانی مدت و بقاء بالا و با کیفیت رویان برای انتقال به مادران گیرنده و تولد نوزادان در زمان مناسب می‌باشد. رویان موش در سال ۱۹۷۲ توسط Whittingham و همکاران بطور موفقیت آمیزی منجمد و نگهداری گردید (۳۴). در سال ۱۹۷۷، و تینگهام اولین تولد حاصل از انتقال رویان در مرحله مورولای موش‌ها را گزارش کرد (۳۳). ۱۰ سال بعد چن انجماد ائوسیت‌های انسان را گزارش نمود (۲). تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی به عنوان مهمترین فاکتور مضر در فرآیند انجماد که می‌تواند اثرات منفی بر بقاء و نمو رویانی بر جای بگذارد مورد توجه قرار گرفته است (۲۸). ویتریفیکاسیون روش ساده، ارزان و با سرعت زیاد، می‌باشد که بواسطه ویسکوزیته بالای مواد سرما محافظ آن یک توده شیشه مانند جامد را تشکیل داده و از ایجاد کریستال‌های یخ داخل سلولی جلوگیری می‌کند. انجماد با سرعت کنترل شده یا آهسته، به دستگاه خاص و





تصویر ۱- پیکربندی نی. (A) معرفی رویان‌ها (ع) داخل EFS40 و (B) نی پس از مسدود شدن.

محلول سوکروز: PB1 حاوی ۰/۵M سوکروز. پس از فیلتر نمودن با فیلتر ۰/۲۰/۴۵ μm در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.
محلول فایکول: PB1 حاوی ۳۰ درصد فایکول (سیگما) و ۰/۵ M سوکروز (سیگما).

محلول EFS40: PB1 حاوی ۴۰ درصد اتیلن گلیکول (EG)، ۱۸ درصد فایکول و ۰/۳ M سوکروز (۹). محلول گلیسرول - سوکروز: مطابق روش (۶) تهیه شد.

محلول ذوب: حاوی PB1، سوکروز و سرم آلبومین گاو (BSA) که در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

عمل آوری رویان‌ها: رویان‌های ۸ سلولی و مورولا. در دمای اتاق به داخل قطره‌های حاوی مواد سرم‌محافظ، گلیسرول - سوکروز (GS) و اتیلن گلیکول - فایکول - سوکروز (EFS40) انتقال یافتند. و مجدداً از نظر ظاهری مورد ارزیابی قرار گرفته و همراه مواد سرم‌محافظ به داخل نی‌های انجماد آماده شده منتقل شدند. به طور متوسط به هر نی ۴ رویان منتقل شد.

آماده سازی و تجهیز نی انجماد: پر کردن نی‌ها: سرنگ انسولین و نی به گنجایش ۰/۲۵ ml را با کمک رابطه به همدیگر متصل کرده و ۶۰ قسمت محلول سوکروز، ۱۵ قسمت هوا، ۳ قسمت EFS40، ۴ قسمت هوا و ۱۳ قسمت EFS40 را بداخل نی مطابق شکل (۱) بارگیری شد (بر اساس Kasai و همکاران در سال ۱۹۹۲). سپس رویان‌های ۸ سلولی و مورولا به قطره‌های محلول EFS40 و گلیسرول - سوکروز (GS) انتقال یافته و سپس بطور متوسط تعداد ۴ رویان در هر نی قرار داده شد. و نی را بطور افقی نزدیک لبه میز کار قرار می‌دهیم. درجه حرارت بر روی میز کار بایستی (۲± درجه سانتیگراد) ۲۰ درجه سانتیگراد باشد. پس از گذشت دو دقیقه نی‌های حاوی رویان با کمک سیلر برقی مسدود شد (۹، ۲۵) و سپس در بخار نیتروژن که در فاصله ۲ سانتیمتری سطح آزاد از مایع قرار داشت به مدت ۳ دقیقه سرد و منجمد گردیدند.

سپس نی درون نیتروژن مایع غوطه ور شد تا دمای آن‌ها به ۱۹۶- درجه

استامید. هر چند شدت آسیب می‌تواند بستگی به عواملی مانند اندازه و شکل سلول‌ها، نفوذپذیری غشاء، وضعیت و مرحله رویانی، گونه و منشأ رویانی، تولید شده در آزمایشگاه یا جانور، داشته باشد (۲۸). هدف از روش ویتریفیکاسیون به حداقل رساندن مسمومیت رویان، از طریق افزایش سرعت سرد کردن و کاهش غلظت سرم‌محافظ‌ها می‌باشد (۱۵). به طور کلی انجماد رویان و گامت [۱۸] و ایجاد بانک رویان (۱۹) از وقوع تغییرات ژنتیکی جلوگیری می‌کند و جایگزین با ارزشی برای کلنی حیوانات پرورشی فعال می‌باشد (۲۵، ۳۰). این تکنیک همچنین در علوم مربوط به ژنتیک موش و حفظ نژادهایی که در معرض انقراض هستند، ابزار ویژه‌ای محسوب می‌گردد. در این مطالعه کوشش بر این بود که اثر ویتریفیکاسیون با استفاده از دو نوع سرم‌محافظ (EFS40، GS) بر روی رویان‌های مرحله ۸ سلولی و مورولای موش سفید مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش کار

معرف‌ها: همه معرف‌ها از محصولات شرکت سیگما تهیه گردید.
 سوپراوولاسیون و استحصال رویان: تعداد ۸۱ سر موش ماده بالغ نژاد NMRI از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، با سن ۷.۸ هفته بطور تصادفی انتخاب گردید. جهت سازگاری با محیط حداقل یک هفته در شرایط کنترل شده، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، تغذیه با غذای فشرده، تهیه شده در موسسه رازی و آب لوله کشی به شکل آزاد در اختیارشان قرار داشت. دمای سالن ۲۲±۲ درجه، رطوبت نسبی ۵۰±۵ درصد و تعویض هوا ۲۰-۱۰ بار در ساعت انجام میگرفت. بعد از یک هفته، حیوانات به صورت اتفاقی به دو گروه تقسیم شدند گروه مطالعه (n=۶۰) و گروه شاهد (n=۲۱). به هر موش هر دو گروه یک نوبت به میزان ۸ واحد eCG به روش داخل صفاقی و ۴۶.۴۸ ساعت بعد ۸ واحد hCG به روش مشابه تزریق گردید. موشهای ماده بلافاصله پس از تزریق دوم، با نرهای بالغ NMRI بصورت هر موش نر با یک موش ماده آمیزش داده شدند. صبح روز بعد، موش‌هایی که دارای پلاک واژنی بودند باردار محسوب شده و روز جفتگیری، روز یکم آبستنی آن‌ها در نظر گرفته شد (۷). دو و نیم روز بعد موشهای باردار با روش جابجائی گردنی، معدوم، و اویداکت و رحم آن‌ها خارج و در پتری دیش حاوی محیط M2 قرار داده شد. بعد از فلاش اویداکت و رحم، رویان‌ها در قطره‌های M2 که توسط روغن پارافین پوشیده شده بودند جمع آوری و مورد ارزیابی قرار گرفتند (۲۵). سپس رویان‌های ۸ سلولی و مورولا به قطره‌های محیط T6 حاوی ۴ mg/ml سرم آلبومین گاو (BSA) منتقل شدند و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و CO₂ ۵ درصد قرار داده شدند. رویان‌های گروه شاهد برای رسیدن به مرحله بلاستوسیستی در انکوباتور باقی ماندند.

آماده سازی محلول‌های انجماد - محیط PB1: افزودن ۵/۵۶ mM گلوکز، ۰/۳۳ mM پیرووات، ۱۰۰ IU/ml پنی سیلین و ۳ mg/ml از BSA به بافر PBS، تنظیم PH (۷/۲۰/۷/۴) و سپس فیلتر محیط با فیلتر ۰/۲۰/۴۵ μm سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.



جدول ۱- رویانهای حاصل از سوپراوولاسیون موشهای NMRI (درصد).

مشخصات رویان	تعداد	درصد
۴-۱ سلولی	۸۱	۲۳/۰۸
۸ سلولی و مورولا	۲۵۸	۷۳/۵۰
دژنره	۱۲	۳/۴۲
جمع	۳۵۱	۱۰۰

جدول ۲- رویانهای استحصال شده و بقاء یافته موش NMRI پس از انجماد در محیط آزمایشگاهی a-b: ستونهای دارای حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند (P<0.05).

نام سرما محافظ	رویانهایی استفاده شده	رویانهایی منجمد شده	رویانهایی ذوب شده	رویانهایی بازیافت شده (%)	رویانهایی زنده و رشد کرده (%)
GS	۸۳	۸۳	۶۰	۵۱(۸۵)	۱۰(۱۹/۶) ^a
EFS40	۱۰۵	۱۰۵	۶۰	۵۴(۹۰)	۲۹(۵۳/۷) ^b
کنترل	۷۰	-	-	-	۴۸(۶۸/۶) ^b
جمع	۲۵۸	۱۸۸	۱۲۰	۱۰۵	۱۰۰

شستشو به محیط T6 حاوی ۴mg/ml انتقال یافته و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵CO2 درصد بمدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. آسیب فیزیکی سلولهای رویان پس از دوره کوتاه کشت به راحتی قابل مشاهده است. اینگونه رویانها بر اساس مورفولوژی سیتوپلاسم و دیواره سلولی ارزیابی شدند و نسبت رویانهای زنده تکوین یافته به مراحل بعدی به کل رویانها محاسبه و با نتایج گروه کنترل مقایسه شدند.

آنالیز آماری: دادههای رویانهای زنده در محیط آزمایشگاهی توسط آزمون کای-اسکواریاس در دو سطح (p<۰/۰۵) و (p<۰/۰۰۱) مورد آنالیز قرار گرفتند.

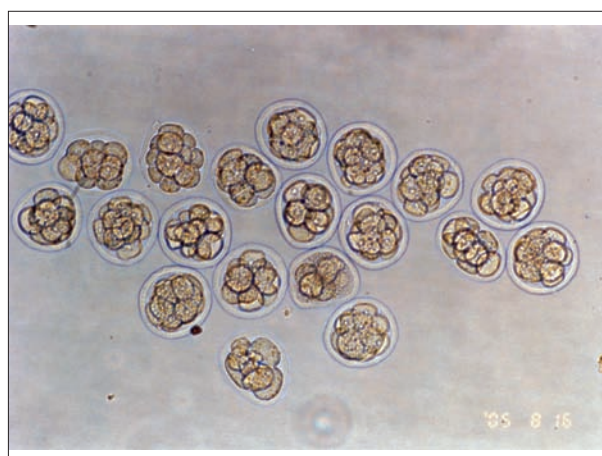
نتایج

نتایج بدست آمده از ویتریفیکاسیون رویانهای ۸ سلولی و مورولای موش نژاد NMRI با استفاده از دو سرم محافظ گلیسرول - سوکروز (GS) و اتیلن گلیکول - فایکول - سوکروز (EFS40) در جدول ۱ نمایش داده شده است.

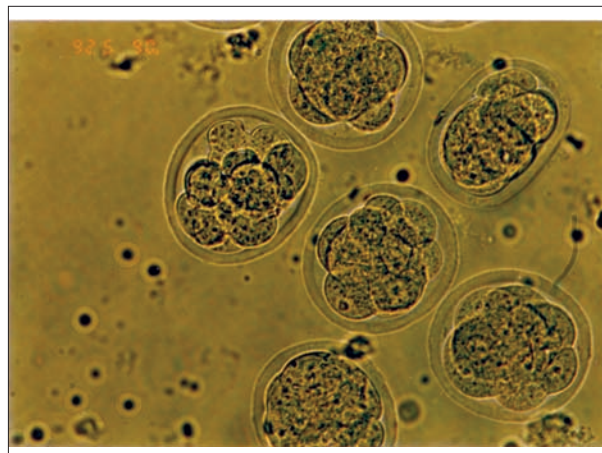
در مجموع از تعداد ۸۱ سرموش ماده نژاد NMRI در گروه تحت آزمایش سوپر اووله شده (۵)، ۴۲ سر (۵۱/۸) دارای پلاک واژنی بودند. ۴۲.۴۸ ساعت پس از تزریق hCG، تعداد ۳۵۱ رویان جمع آوری گردید که بطور متوسط ۸/۳۵ رویان به ازاء هر سر حیوان محاسبه گردید. تعداد ۲۵۸ (۷۳/۵ درصد) رویان ۸ سلولی و مورولا (تصویر ۳)، ۸۱ عدد (۲۳/۱ درصد) رویان ۱.۴ سلولی (تصویر ۲) و ۱۲ عدد (۳/۴ درصد) از آنها دژنره بودند. رویانهای ۸ سلولی و مورولا مطابق با معیارهای مورد نظر (۲۵) ارزیابی شدند که براساس آن ۱۴۷ رویان (۵۷ درصد) درجه A، ۹۷ رویان (۳۷/۶ درصد) درجه B و ۱۴ رویان (۵/۴ درصد) درجه سانتیگراد بودند.



تصویر ۲- رویانهای ۴-۲ سلولی.



تصویر ۳- مرحله رویانی هشت سلولی و مورولا.



تصویر ۴- رویانها پس از ذوب.

سانتیگراد برسد. ۱.۳ ماه بعد، جهت ذوب رویانها، نیهای انجماد از نیتروژن مایع خارج، برای مدت ۱۵ ثانیه در درجه حرارت اتاق قرار داده و سپس آنها را به درون حمام آب گرم ۲۰ درجه سانتیگراد منتقل گردیدند. برای بازگشت رویانها به حالت اول (rehydration)، آنها را در محلول سوکروز نگهداری کرده و سپس در محیط PB1 حاوی ۴mg/ml، سه بار شستشو دادیم. پس از



نشان داده است (۳۴). (علاوه بر آن EG به آسانی وارد بلاستومرهای رویانی شده و تشکیل کریستال های یخ را محدود می سازد و نفوذ پذیری آن به داخل رویان نیز نسبت به گلیسرول بیشتر است (۱۴). از آنجایی که رویان های ۸ سلولی و مورولا نسبت به دیگر مراحل رویانی بیشتری میزان راندمان را پس از انجماد و ذوب دارند (۱۲، ۲۹) لذا در این مطالعه رویان های ۸ سلولی و مورولای موش نژاد NMRI برای انجام تحقیق استفاده گردید. چسبیدن رویان به دیواره آمپول های شیشه ای و ترکیدن آمپول ها در حین ذوب جزء دلایل ذکر شده برای مفقود شدن رویان ها در طی انجماد، بوده است (۳۰). در گزارش ترانسون (۲۴) گم شدگی رویان بلافاصله پس از ذوب مشاهده نشده است. اما ترکیب نی ها بصورت شاخص توسط رال (۲۱) گزارش شده است. در این مطالعه آسیب دیدگی و یا ترکیب نی ها اتفاق نیفتاد و در هر نوبت ۹۰ درصد از رویان ها باز یافت شدند. به نظر می رسد، عدم ترکیب نی ها در این تحقیق به دلیل مسدود کردن انتهای نی ها بوسیله سیلر حرارتی و قرار دادن آن ها در بخار ازت به مدت ۲ دقیقه قبل از غوطه وری در ازت مایع بوده است (۲۴).

نتایج مطالعه ما با نتایج دیگر محققین از نظر میزان آسیب دیدگی رویان های ذخیره شده در نی های پلاستیکی همخوانی دارد. این میزان نسبت به ذخیره رویان در آمپول های شیشه ای کمتر می باشد (۲۳). Kasai و همکاران (۹، ۱۲) نشان دادند که در معرض قرار گرفتن مورولای موش به EFS در دماهای متفاوت، هنگامی که دما پائین ولی مدت مواجهه با سرم محافظ بیشتر باشد مسمومیت EFS کمتر خواهد بود و میزان زنده ماندن رویان ها بالاتر می گردد. مورولاهایی که در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و ۲۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۲ و ۵ دقیقه در معرض EFS قرار گرفتند ۱۰۰ درصد ۹۵ آن ها به مرحله بلاستوسیتی تکوین می یابند. و با افزایش دما به ۳۰ درجه سانتیگراد برای مدت ۲ دقیقه میزان زنده ماندن رویان ها ۱۸ درصد کاهش می یابد. به نظر می رسد که اختلاف بدست آمده در مطالعه ما با مطالعات کازائی و دیگر محققین، تفاوت در دمای محیط EFS در هنگام انجماد باشد (۱۲) ذخیره رویان ها در سرم محافظ های گلیسرول - سوکروز (GS) و اتیلن گلیکول - فیکول - سوکروز (EFS) نشان داد که نسبت های باز یافت رویان پس از انجماد. ذوب در سرم محافظ اول ۸۵ درصد و رسیدن به مرحله بلاستوسیت ۱۹/۶ درصد مشخص گردید. این نتایج با گزارش Bertolini و همکاران (۱) در سال ۲۰۰۵ اختلاف قابل ملاحظه ای را نشان نداد. گزارش ۸۴ درصد رشد رویان های ۴ روزه که با استفاده از گلیسرول ۲ مولار و سوکروز ۰/۵ مولار منجمد شده بودند، اختلافی را با نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد؛ که ممکن است بدلیل اختلاف در مرحله رشد رویانی باشد (۳۱، ۳۵، ۳۶). نتایج نشان داد که کاربرد روش ویتریفیکاسیون با استفاده از گلیسرول، فیکول و سوکروز و بارگیری رویان ها در نی انجماد برای مورولای ۴ روزه و بلاستوسیت های ۵ روزه مؤثر می باشد (۳۲). در مطالعه ما، میزان باز یافت رویان های منجمد شده در سرم محافظ EFS، ۹۰ درصد و درصد زنده ماندن و تکوین به مرحله بلاستوسیت ۵۳/۷ درصد بود که در

مدت زمان در معرض قرار گرفتن نی های انجماد حاوی رویان در بخار نیتروژن به مدت ۲ دقیقه تعیین گردید و سپس نی ها برای انجماد نهایی در مخزن نیتروژن مایع غوطه ور شدند. میزان بقاء رویان ها در گروه های انجماد (EFS40، GS) و کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. بقاء رویان ها در مواجهه با سرم محافظ متفاوت بود. میزان بقاء و تکوین رویان ها به مرحله بلاستوسیتی در سرم محافظ EFS40 نسبت به سرم محافظ GS بیشتر بود (به ترتیب ۵۳/۷ درصد و ۱۹/۶ درصد) که از نظر آماری اختلاف معنی دار داشتند ($p < 0.001$). همچنین درصد باز یافت رویان ها پس از ذوب به ترتیب ۹۰ درصد در صدم ۸۵ درصد برای سرما محافظ ها EFS40 و GS محاسبه گردید. با این حال در مقایسه با رویان های تازه، غیر منجمد، که درصد تکوین به مرحله بلاستوسیت در آن ها ۶۸/۶ درصد بود اختلاف معنی داری نداشت ($p < 0.05$) ولی این میزان با گروه GS اختلاف معنی داری را نشان داد ($p < 0.001$). (جدول ۱، تصویر ۲، ۴ و نمودار ۱).

بحث

استفاده از رویان منجمد جزء اساسی تکنولوژی اصلاح باروری می باشد و در حال حاضر میزان بارداری حاصل از رویان های منجمد تقریباً دو سوم رویان های تازه است (۱۴). استفاده از روش ویتریفیکاسیون برای انجماد رویان های موش (۱۲)، خرگوش (۱۰) و گاو (۸) با میزان بالای موفقیت گزارش شده است. مطالعات نشان داده اند میزان ماندگاری رویان ها پس از ذوب، در روش ویتریفیکاسیون نسبت به انجماد آهسته و انجماد فوق سریع، بیشتر است که این امر بدلیل عدم تشکیل یخ داخل سلولی در این روش می باشد (۴، ۲۰، ۲۲، ۲۷). در سال ۱۹۹۸ Mukaida و همکاران (۱۷) رویان های موش را با ۲، ۱ پروپان دیول، دی متیل سولفوکسید، اتیلن گلیکول، گلیسرول یا استامید که هر یک با محلول محتوی ۳۰ درصد فیکول به همراه سوکروز M ۰/۵ رقیق شده بودند را با روش ویتریفیکاسیون منجمد کردند. نتایج آزمایشات این مطالعه، منجر به یافتن سرم محافظ و روش مناسب برای ویتریفیکاسیون رویان های ۸ سلولی موش گردید. که بواسطه آن، زمینه استفاده از این روش برای انجماد رویان های انسانی در تکنولوژی اصلاح باروری فراهم گردید به طوری که ویتریفیکاسیون جهت ذخیره سازی رویان های ۴، ۸ سلولی انسان با ترکیب ۴۰ درصد اتیلن گلیکول (EG)، ۱۸ درصد فیکول ۰/۳ mol/l سوکروز به عنوان محلولی با سمیت پائین و با ویژگی های پایدار، مورد استفاده قرار گرفت (۱۷). همچنین کارایی انجماد شیشه ای رویان های انسانی در مراحل ۸، ۱۶ سلولی و مرحله مورولا بر اساس محلول مبتنی بر اتیلن گلیکول (EG) مورد تأیید قرار گرفته است (۳۷). از طرف دیگر اتیلن گلیکول بطور گسترده جهت ویتریفیکاسیون رویان های پستانداران مختلف مورد استفاده قرار می گیرد (۱۳). البته در تعداد کمی از آزمایشات اخیر از محلول های مبتنی بر این سرم محافظ جهت ویتریفیه نمودن رویان های انسانی استفاده شده است. در مطالعات انجام شده، اتیلن گلیکول نسبت به گلیسرول و پروپیلن گلیکول مسمومیت کمتری از خود



References

- Bertolini, M., Lange, M. D. C., Rodrigues, J. L. (2005) In vitro and in vivo survival of mouse morulas and blastocysts following vitrification in 45% glycerol. *Acta Sci. Vet.* 33: 245-251.
- Chen, C. (1986) Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet.* 1:884-886.
- Emiliani, S., Berg, M. V. D., Vannin, A. S., Biramane, J., Englert, Y. (2000) Comparison of ethylene glycol, 1-, propandiol glycerol for cryopreservation of sloe-closed mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocytes. *Hum. Reprod.* 15:905-910.
- Fahy, G., MacFaran, D., Angell, C., Meryman, H. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology.* 21: 407-426.
- Gackson, IJ., Abbott, CM. (2000) *Mouse Genetics and Transgenics: A practical Approach.* Oxford University Press, USA. pp. 40-42.
- Glenister, P.H., Rall, W.F. (2000) Cryopreservation and rederivation of embryo and gametes. pp. 27-59. In *mouse genetics and transgenics: a Partical approach.* Jackson-JJ and Abbott-CM (eds) Unversity Press, Oxford. London, UK.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. (1994) *Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual (2th ed.)* Cold Spring Harber, New York, USA. pp. 130-142.
- Ishimori, H., Kasai, K., Inai, M., Nagao, Y., Itasaka, J., Miki, Y., Seiki, N., Kainuma, H. (1993) Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylen glycol and dimethyl sulfoxide. *Therogenology.* 40: 427- 423.
- Kasai, M. (1997) Cryopreservation of Mammalian Emryos. *Mol. Biotechnol.* 7: 173-9.
- Kasai, M., Hamaguchi, Y., Zhu, SE., Miyake, T., Sakurai, T., Machida, T. (1992) High Survival of rabbit morula after vitrification in an ethylen glycol-based solution by a simple method. *Biol. Reprod.* 46: 1042-1046.
- Kasai, M., Ito, K., Edashige, K. (2002) Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum. Reprod.* 17: 1863-74.
- Kasai, M., Nishimori, M., Zhu, SE., Sakurai, T., Machida, T. (1992) Survival of mouse morulae vitrified in an ethylen glycol-based solution after exposure to the solution at various tempratures. *Biol. Reprod.* 47: 1134-1139.
- Kasai, M., Zhu, S., Pedro, P., Nakamura, K., Sakurai, T., Edshige, K. (1996) Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology.* 33: 459-464.
- Konc, J., Cseh, S., Varga, E., Kriston, R., Kanyó, K. (2005) Cryopreservation of oocytes and embryos in human assisted reproduction. *J. Reproduktionsmed Endokrinol.* 2: 251-8.
- Liebermann, J., Dietl, J., Vanderzwalmen, P., Tucker, M.J. (2003) Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: Where are we now? *Reprod. Biomed. Online.* 7:623-633.
- Massip, A., Vanderzwalmen, P., Scheffen, B., Ectors. (1986) Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *CryoLetters.* 7:270-273.
- Mukaida, T., Wada, S., Takahashi, K., Pedro, PB., An, TZ., Kasai, M. (1998) Vitrification of human embryos based on assessment of suitable Conditions for 8-Cell mouse embryos. *Hum. Reprod.* 13: 2874-2879.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انجام شده است لذا لازم میدانم از همکاریهای مدیریت محترم و مدیر محترم گروه پژوهش موسسه کمال تشکر و قدردانی را بنمایم.



18. Pinkert, C.A. (1998) Mouse sperm cryopreservation. *Lab. Anim. Sci.* 48: 224.
19. Polge, C. (1977) The freezing of mammalian embryo: preservation and possibilities, in the freezing of mammalian embryo (Elliot, K. and Whelan, J., eds.), Elsevier, Amsterdam, The Netherland. pp. 3-13.
20. Porcu, E. (2001) Oocyte freezing. *Semin. Reprod. Med.* 19:221-230.
21. Rall, W.F. (1987) Factors affecting The survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology.* 24: 387-402.
22. Rall, W.F., Fahy, G.M. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature.* 313: 573-5.
23. Rall, W.F., Meyer, T.K. (1989) Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology.* 31: 683-692.
24. Rall, W.F., Wood, M.J. (1994) High in vitro survival of day 3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin. *J. Rprod. Fert.* 101: 681-8.
25. Sakkas, D. (2001) Evaluation of embryo quality: a strategy for sequential analysis of embryo development with the aim of single embryo transfer. In: Assisted reproductive techniques, Martin Dunt, UK. pp.228-229.
26. Trounson, A., Sjoblom, P. (1988) Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. *Fertil. Steril.* 50:373-6.
27. Vajta, G. (2000) Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:357-364.
28. Vajta, G., Kuwayama, M. (2006) Improving cryopreservation systems. *Theriogenology.* 65: 236-244.
29. Vajta, G., Holm, P., Greve, T., Callesen, H. (1997) Survival and development of bovine blastocysts produced in vitro after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. *J. Reprod. Fert.* 111: 65-70.
30. Van den Abbeel, E., Cames, M., Eaesberghe, LV., Devroey, P., Steirteghem, A.C.V. (1997) A randomized comparison of the cryopreservation of one-cell human embryos with a slow cotrolled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plugging into liquid nitrogen. *Hum. Reprod.* 12: 1554-1560.
31. Van der Auwera, I., Cornillie, F., Pijnenborg, R., Konickx, P.R. (1992) The age of pronucleate mouse ova influences their development in vitro and survival after freezing. *Hum. Reprod.* 7: 660-665.
32. Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Debauche, CH., Standaert, V., Roosendaal, E.V., Vandervorst, M., Bollen, N., Zech, H., Mukaida, T., Takahashi, K., Schoysman, R. (2002) Birth after vitrification at morula and blastocyst Satges: Effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum. Reprod.* 17:744-751.
33. Whittingham, D.G. (1977) Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196 °C. *J. Reprod. Fert.* 49:89-94.
34. Whittingham, D.G., Leibo, S.P., Masur, P. (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 °C. *Sci.* 187: 411-414.
35. Williams, T.J., Johnson, S.E. (1985) Quick freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology.* 23: 235.
36. Wilmut, I. (1972) The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent, and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.* 11:1071-1079.
37. Yokota, Y., Yokota, H., Yokota, M., Sato, S., Araki, Y. (2001) Birth of healthy twins from in vitro development of human refrozen embryos. *Fertil. Steril.* 76: 1063-1065.



SURVIVAL AND DEVELOPMENT OF MOUSE 8-CELLS EMBRYOS AFTER VITRIFICATION IN GLYCEROL-SUCROSE AND ETHYLEN GLYCOL BASED SOLUTIONS

Toodeh-dehghan, F.¹, Motedayyen, M.H.¹, Nazem, H.², Mohammadpor, H.³, Tajik, P.^{4*}

¹Razi Institute, Tehran, Karaj-Iran.

²Department of Biology, School of Sciences, Payame Noor University, Isfahan, Isfahan-Iran.

³Graduated from the Department of Biology, School of Sciences, Payame Noor University, Isfahan, Isfahan-Iran.

⁴Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

(Received 7 October 2007 , Accepted 8 May 2009)

Abstract:

Nowadays gamete and embryo freezing is an appropriate approach for preserving of genetic traits in laboratory animals, rare and endangered species. Frozen cells are suitable replace for actively breeding animals colony. The aim of this study was to preserve laboratory mouse embryo, using vitrification method and comparing effect of two cryoprotectants, glycerol-sucrose(GS) and ethylene glycol-ficoll-sucrose (EFS40) on 8-cells and morula stage embryos of the mouse. Following mice superovulation 258(73.5%) out of 351 embryos were in 8-cell and moroula stages. 188 morphologically intact embryos were exposed in the GS and EFS40 drops and then each 4 of them transferred to one special micro tube and after ends sealing, finally were cooled up to -196°C with liquid nitrogen vapors and immediately plunged into liquid nitrogen. One to three months later, embryos were thawed, recovered and cultured. The recovery rate of post-thawing embryos from EFS group (90%) was more than percentage of embryos recovered from GS (85%) group. In also survival rate of embryos undergoing further cleavage post-culturing to blastocyte stage, from EFS and GS groups were 53/7% and 19/6% respectively. This difference was significant at $p < 0.001$. However difference between EFS group with fresh embryos, un-frozen embryos, for achieve to blastocytes stage which was 68/6% for second group, wasn't significant ($p < 0.05$), but this item was significant between fresh embryo and GS groups ($p < 0.001$) Generally results of our study show that, use of vitrification of 8-cell and morula NMRI mouse strain embryos using EFS as cryoprotectant is a suitable, easy and economical method for preservation of mouse embryos.

Key word: cryoprotectant, mouse cryopreservation, mouse embryo, vitrification, super ovulation.

*Corresponding author's email: ptajik@ut.ac.ir, Tel: 021-61117002, Fax: 021-61117001

