مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶۵، شماره ۱، ۳۰-۲۵

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] حبیب الله ناظم[۲] علی محمدپور[۳] پرویز تاجیک[۴*]

۱) موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، کرج - ایران.
۲) گروه فیزیولوژی جانوری، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان - ایران.
۳) فارغ التحصیل 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 ویتریفیکاسیون، با استفاده از سرما محافظ‌های گلیسرول ـ سوکروز (GS) و اتیلن گلیکول ـ فیکول- 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 تخمک گذاری 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 مرولا به قطره‌های حاوی سرما محافظ‌های گلیسرول ـ 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 دو مرحله با استفاده از بخار نیتروژن مایع سرد و سپس غوطه وری 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 معنی دار داشت ($p<0/001$) با این حال گروه EFS در مقایسه با رویان‌های تازه، غیر منجمد، که درصد تکوین به مرحلهٔ بلاستوسیت در آن‌ها ۶۸/۶ درصد بود اختلاف معنی داری نداشت ($p>0/05$). ولی این میزان با گروه GS اختلاف معنی داری را نشان داد ($p<0/001$). 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 ذخیره سازی و نگهداری این رویان‌ها در حالت انجماد می‌باشد.

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

مقدمه

یکی از اهداف انجماد رویان، نگهداری طولانی مدت و بقاء بالا و باکیفیت 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 مرحلهٔ مورولای موش‌ها را گزارش کرد (۳۳). ۱۰ سال بعد چن انجماد ائووسیت‌های 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 نمورویانی 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 تودهٔ 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 قابل برنامه ریزی 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 بلاستوسیت‌های 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 سمّیت عبارتند از: اتیلن گلیکول (EG)، پروپاندیول، گلیسرول، دی متیل سولفوکسید (DMSO) و

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۰۲-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: ptajik@ut.ac.ir

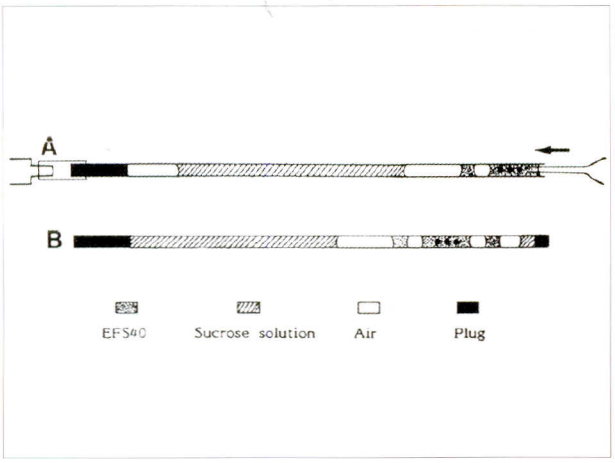
استامید. هرچند شدت آسیب می تواند بستگی به عواملی مانند اندازه و شکل سلول ها، نفوذپذیری غشاء، وضعیت و مرحلهٔ رویانی، گونه و منشأ رویانی، تولید شده در آزمایشگاه یا جانور، داشته باشد(۲۸). هدف از روش ویتریفیکاسیون به خداقل رساندن مسمومیت رویان، از طریق افزایش سرعت سرد کردن و کاهش غلظت سرما محافظ ها می باشد(۱۵). به طور کلی انجماد رویان و گامت [۱۸] و ایجاد بانک رویان(۱۹) از وقوع تغییرات ژنتیکی جلوگیری می کند و جایگزین با ارزشی برای کلنی حیوانات پرورشی فعال می باشد(۲۵،۳۰). این تکنیک همچنین در علوم مربوط به ژنتیک موش و حفظ نژادهائیکه در معرض انقراض هستند، ابزار ویژه ای محسوب می گردد. در این مطالعه کوشش بر این بود که اثر ویتریفیکاسیون با استفاده از دو نوع سرمامحافظ (EFS40, GS) بر روی رویان های مرحلهٔ ۸ سلولی و مورولای موش سفید مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش کار

معرف ها: همهٔ معرف ها از محصولات شرکت سیگما تهیه گردید.

سوپر اوولاسیون 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 شرائط 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 ۲ ± ۲۲ درجه، رطوبت نسبی ۵ ± ۵۰ 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، موش هائی که دارای پلاک واژنی بودند باردار محسوب شده و روز جفتگیری، روز یکم آبستنی آن ها در نظر گرفته شد (۷). دو و نیم روز بعد موشهای باردار با روش جابجائی گردنی، معدوم، و اویداکت و رحم آن ها خارج و در پتری دیش حاوی محیط M2 قرار داده شد. بعد از فلاش اویداکت و رحم، رویان ها در قطره های M2 که توسط روغن پارافین پوشیده شده بودند جمع آوری و مورد ارزیابی قرار گرفتند(۲۵). سپس رویان های ۸ سلولی و مرولا به قطره های محیط T6 حاوی ۴mg/ml سرم آلبومین گاو (BSA) منتقل شدند و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 قرار داده شدند. رویان های گروه شاهد برای رسیدن به مرحله بلاستوسیتی در انکوباتور باقی ماندند.

آماده سازی محلول های 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(۷/۲-۷/۴) و سپس فیلتر محیط با فیلتر ۰/۲-۰/۴۵ µm سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.



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

محلول سوکروز: PB1 حاوی ۰/۵ M سوکروز. پس از فیلتر نمودن با فیلتر ۰/۲-۰/۴۵ µm در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

محلول فایکول: PB1 حاوی ۳۰ درصد فایکول (سیگما) و ۰/۵ M سوکروز (سیگما).

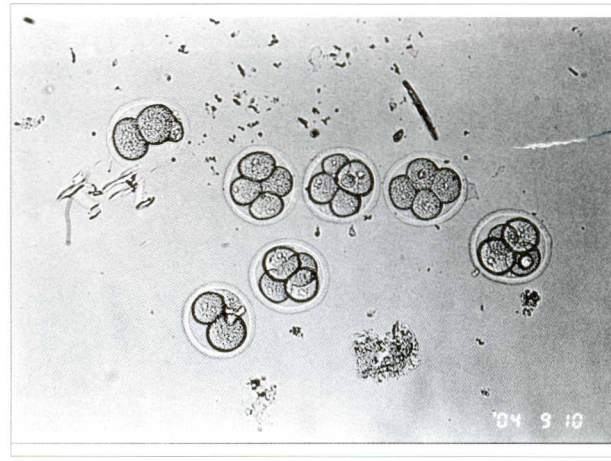
محلول EFS40: PB1 حاوی ۴۰ درصد اتیلن گلیکول (EG)، ۱۸ درصد فایکول و ۰/۳ M سوکروز (۹). محلول گلیسرول – سوکروز: مطابق روش (۶) تهیه شد.

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

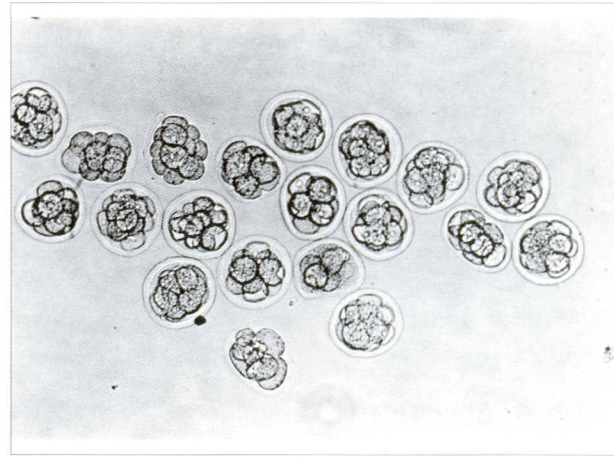
عمل آوری رویان ها: رویان های ۸ سلولی و مرولا. در دمای اتاق به داخل قطره های حاوی مواد سرمامحافظ، گلیسرول – سوکروز (GS) و اتیلن گلیکول – فایکول – سوکروز (EFS40) انتقال یافتند. و مجدداً از نظر ظاهری مورد ارزیابی قرار گرفته و همراه مواد سرمامحافظ به داخل نی های انجماد آماده شده منتقل شدند. به طور متوسط به هر نی ۴ رویان منتقل شد.

آماده سازی و تجهیز نی انجماد: پر کردن نی ها: سرنگ انسولین و نی به گنجایش ۰/۲۵ml را با کمک رابط 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 (براساس Kasai و همکاران در سال ۱۹۹۲. سپس رویان های ۸ سلولی و مورولا به قطره های 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 لبهٔ میز کار قرار می دهیم. درجه حرارت برروی میز کار بایستی (۲±درجه سانتیگراد) ۲۰ درجه سانتیگراد باشد. پس از گذشت دو دقیقه نی های حاوی رویان با کمک سیلر برقی مسدود شد (۹،۲۵) و سپس در بخار نیتروژن که در فاصله ۲ سانتیمتری سطح آزاد ازت مایع قرار داشت به مدت ۳ دقیقه سرد و منجمد گردیدند.

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



تصویر ۲- رویان‌های ۴-۲ سلولی.



تصویر ۳- مرحله رویانی هشت سلولی و مورولا.

تصویر ۴- رویان‌ها پس از ذوب.

سانتیگراد برسد. ۱۰-۳ 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

جدول۱- 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 معنی‌دار هستند ($P<0.05$).

نام سرما محافظ	رویانهای استفاده شده	رویانهای منجمد شده	رویانهای ذوب شده	رویانهای بازیافت شده(٪)	رویانهای 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 ۵CO2درصد بمدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. آسیب فیزیکی سلولهای رویان پس از دورهٔ کوتاه کشت به راحتی قابل مشاهده است. اینگونه رویان‌ها بر اساس مورفولوژی سیتوپلاسم و دیوارهٔ 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 ـ اسکوار بر اساس در دو سطح ($p<0/05$) و ($p<0/001$) مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج

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

در مجموع از تعداد ۸۱ سر موش ماده نژاد NMRI در گروه تحت آزمایش سوپر اوولهٔ شده (۵)، ۴۲ سر (۵۱/۸) دارای پلاک واژنی بودند. ۴۸-۴۲ 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 (۷۳/۵درصد) رویان ۸ سلولی و مورولا (تصویر ۳)، ۸۱ عدد(۲۳/۱درصد) رویان ۴-۱ سلولی (تصویر ۲) و ۱۲ عدد (۳/۴درصد) از آن‌ها دژنره بودند. رویان‌های ۸ سلولی و مورولا مطابق با معیارهای مورد نظر (۲۵) ارزیابی شدند که بر اساس آن ۱۴۷ رویان (۵۷ درصد) درجه A، ۹۷ رویان (۳۷/۶درصد) درجهٔ B و ۱۴ رویان (۵/۴درصد) درجه سانتیگراد بودند.

مدت زمان در معرض قرار گرفتن نی‌های انجماد حاوی رویان در بخار نیتروژن به مدت ۲ دقیقه تعیین گردید و سپس نی‌ها برای انجماد نهایی در مخزن نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. میزان بقاء رویان‌ها در گروه‌های انجماد (GS، EFS40) و کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. بقاء رویان‌ها در مواجهه با سرمامحافظ‌ها متفاوت بود. میزان بقاء و تکوین رویان‌ها به مرحله بلاستوسیتی در سرمامحافظ EFS40 نسبت به سرمامحافظ GS بیشتربود (به ترتیب ۵۳/۷درصد و ۱۹/۶درصد) که از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند ($p<0/001$). همچنین درصد بازیافت رویان‌ها پس از ذوب به ترتیب ۹۰درصد درصدو ۸۵درصد برای سرما محافظ‌ها EFS40 و GS محاسبه گردید. با این حال در مقایسه با رویان‌های تازه، غیرمنجمد، که درصد تکوین به مرحلهٔ بلاستوسیت در آن‌ها ۶۸/۶درصد بود اختلاف معنی‌داری نداشت ($p<0/05$) ولی این میزان با گروه GS اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<0/001$). (جدول۱، تصویر ۲،۳ و ۴، نمودار۱).

بحث

استفاده از رویان منجمد جزء اساسی تکنولوژی اصلاح باروری می‌باشد و در حال حاضر میزان بارداری حاصل از رویان‌های منجمد تقریبا دو سوم رویان‌های تازه است(۱۴). استفاده از روش ویتریفیکاسیون برای انجماد رویان‌های موش (۱۲)، خرگوش (۱۰) و گاو (۸) با میزان بالای موفقیت گزارش شده است. مطالعات نشان داده‌اند میزان ماندگاری رویان‌ها 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 می‌باشد(۴،۲۰،۲۲،۲۷). در سال ۱۹۹۸ Mukaida و همکاران(۱۷) رویان‌های موش را با ۲،۱-پروپاندیول، دی متیل سولفوکسید، اتیلن گلیکول، گلیسرول یا استامید که هریک با محلول محتوی ۳۰درصد فیکول به همراه سوکروز M ۰/۵ رقیق شده بودند را با روش ویتریفیکاسیون منجمد کردند. نتایج آزمایشات این مطالعه، منجر به یافتن سرمامحافظ و روش مناسب برای ویتریفیکاسیون رویان‌های ۸ سلولی موش گردید. که بواسطه آن، زمینه استفاده از این روش برای انجماد رویان‌های انسانی در تکنولوژی اصلاح باروری فراهم گردید به طوری‌که ویتریفیکاسیون جهت ذخیره سازی رویان‌های ۴-۸ سلولی انسان با ترکیب ۴۰درصد اتیلن گلیکول (EG)، ۱۸درصد فیکول، ۰/۳ mol/l سوکروز به عنوان محلولی با سمیّت پائین و با ویژگی‌های پایدار، مورد استفاده قرار گرفت(۱۷). همچنین کارایی انجماد شیشه‌ای رویان‌های انسانی در مراحل ۱۶-۸ سلولی و مرحلهٔ مورولا بر اساس محلول مبتنی بر اتیلن گلیکول (EG) مورد تأیید قرار گرفته است(۳۷). از طرف دیگر اتیلن گلیکول بطور گسترده جهت ویتریفیکاسیون رویان‌های پستانداران مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۳). البته در تعداد کمی از آزمایشات اخیر از محلول‌های مبتنی بر این سرمامحافظ جهت ویتریفیه نمودن رویان‌های انسانی استفاده شده است. در مطالعات انجام شده، اتیلن گلیکول نسبت به گلیسرول و پروپیلن گلیکول مسمومیت کمتری از خود نشان داده است(۳۴). (علاوه برآن EG به آسانی وارد بلاستومرهای رویانی شده و تشکیل کریستال‌های یخ را محدود می‌سازد و نفوذ پذیری آن به داخل رویان نیز نسبت به گلیسرول بیشتر است(۱۴). از آنجایی‌که رویان‌های ۸ سلولی و مورولا نسبت به دیگر مراحل رویانی بیشترین میزان راندمان را پس از انجماد و ذوب دارند(۱۲،۲۹) لذا در این مطالعه رویان‌های ۸ سلولی و مرولای موش نژاد NMRI برای انجام تحقیق استفاده گردید. چسبیدن رویان به دیوارهٔ آمپول‌های شیشه‌ای و ترکیدن آمپول‌ها در حین ذوب جزء دلایل ذکرشده برای مفقودشدن رویان‌ها در طی انجماد، بوده است(۳۰). در گزارش ترانسون (۲۶) گم شدگی رویان بلافاصله پس از ذوب مشاهده نشده است. اما ترکیدگی نی‌ها بصورت شاخص توسط رال (۲۱) گزارش شده است. در این مطالعه آسیب دیدگی و یا ترکیدگی نی‌ها اتفاق نیفتاد و در هر نوبت ۹۰درصد ۸۵درصد از رویان‌ها باز یافت شدند. به نظر می‌رسد، عدم ترکیدگی نی‌ها در این تحقیق به دلیل مسدود کردن انتهای نی‌ها بوسیلهٔ سیلر حرارتی و قرار دادن آن‌ها در بخار ازت به مدت ۲ دقیقه قبل از غوطه وری در ازت مایع بوده است(۲۴).

نتایج مطالعه ما بانتایج دیگر محققین از نظر میزان آسیب دیدگی رویان‌های ذخیره شده در نی‌های پلاستیکی همخوانی دارد . این میزان نسبت به ذخیره رویان در آمپول‌های شیشه‌ای کمتر می‌باشد(۲۳). Kasai و همکاران (۹،۱۲) نشان دادند که در معرض قرار گرفتن مورولای موش به EFS در دماهای متفاوت، هنگامی‌که دما پائین ولی مدت مواجهه با سرمامحافظ بیشتر باشد مسمومیت EFS کمتر خواهد بود و میزان زنده ماندن رویان‌ها بالاتر می‌گردد. مورولاهایی که در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و ۲۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۲ و ۵ دقیقه در معرض EFS قرار گرفتند ۱۰۰درصد-۹۵ آن‌ها به مرحلهٔ بلاستوسیتی تکوین می‌یابند. و با افزایش دما به ۳۰درجه سانتیگراد برای مدت ۲ دقیقه میزان زنده ماندن رویان‌ها ۱۸درصد کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد که اختلاف بدست آمده در مطالعه ما با مطالعات کازائی و دیگر محققین، تفاوت در دمای محیط EFS در هنگام انجماد باشد(۱۲) ذخیره رویان‌ها در سرمامحافظ‌های گلیسرول – سوکروز (GS) و اتیلن گلیکول – فیکول – سوکروز (EFS) نشان داد که نسبت‌های بازیافت رویان پس از انجماد-ذوب در سرمامحافظ اول ۸۵درصد و رسیدن به مرحلهٔ بلاستوسیت ۱۹/۶ درصد مشخص گردید. این نتایج با گزارش Bertolini و همکاران (۱) در سال ۲۰۰۵ اختلاف قابل ملاحظه‌ای را نشان نداد. گزارش ۸۴درصد رشد رویان‌های 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 می‌دهد؛ که ممکن است بدلیل اختلاف در مرحلهٔ رشد رویانی باشد(۳،۳۱،۳۵،۳۶). نتایج نشان داد که کاربرد روش ویتریفیکاسیون با استفاده از گلیسرول، فیکول و سوکروز و بارگیری رویان‌ها در نی انجماد برای مورولای ۴ روزه و بلاستوسیت‌های ۵ روزه مؤثر می‌باشد(۳۲). در مطالعهٔ ما، میزان بازیافت رویان‌های منجمد شده در سرمامحافظ EFS، ۹۰درصد و درصد زنده ماندن و تکوین به مرحلهٔ بلاستوسیت ۵۳/۷درصد بود که در

مقایسه با رویان‌های غیر منجمد که درصد تکوین به مرحلهٔ بلاستوسیت ۶۸/۶ درصد بود اختلاف معنی داری نداشت ($p<0/05$) ولی این میزان با گروه GS اختلاف معنی داری را نشان داد ($p<0/001$). بطور کلی می توان پیشنهاد نمود که انجماد رویان‌های ۸ سلولی و مورولا با روش ویتریفیکاسیون و با استفاده از EFS در دمای محیطی کنترل شده، روشی کاملاً مناسب و مقرونبه صرفه جهت ذخیره سازی رویان موش می‌باشد. و با توجه به گستردگی استفاده از موش آزمایشگاهی در تحقیقات، این مطالعه می‌تواند زمینهٔ مناسبی را برای ایجاد بانک رویان حیوانات آزمایشگاهی فراهم نماید.

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.

References

1. 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.
2. Chen,C. (1986) Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet. 1:884-886.
3. 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.
4. Fahy, G., MacFaran, D., Angell, C., Meryman, H. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology. 21: 407-426.
5. Gackson, IJ., Abbott, CM. (2000) Mouse Genetics and Transgenics: A practical Approach. Oxford University Psress, USA. pp. 40-42.
6. 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.
7. Hogan, B., Beddington,R., Costantini,F., Lacy,E. (1994) Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual (2^{th}ed.) Cold Spring Harber, NewYork, USA. pp. 130-142.
8. 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.
9. Kasai,M. (1997) Cryopreservation of Mammalian Emryos. Mol. Biotechnol. 7: 173-9.
10. 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.
11. 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.
12. Kasai, M., Nishimori, M., Zhu, SE., Sakurai, T., Machida, T. (1992) Survival of mouse morulae vtirified in an ethylen glycol-based solution after exposure to the solution at various tempratures. Biol. Reprod. 47: 1134-1139.
13. Kasai, M., Zhu, S., Pedro, P., Nakamura, K., Sakurai, T., Edshige, K. (1996) Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. Crybiology. 33: 459-464.
14. 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.
15. 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.
16. Massip, A., Vanderzwalmen, P., Scheffen, B., Ectors. (1986) Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. CryoLetters. 7:270-273.
17. 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.

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. Rpord. 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 Dunti, 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. Fertil. 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 pluging 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. Fertil. 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]*

[1]*Razi Institute, Tehran, Karaj-Iran.*

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

[3]*Graduted from the Department of Biology, School of Sciences, Payame Noor University, Isfahan, Isfahan-Iran.*

[4]*Department 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 perserve 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 recoverd 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 diffrence between EFS group with fresh embryos, un-frozen embryos, for achieve to blastocytes stage which was 68/6% for secound group, wasn't significant ($p<0.05$), but this item was singnificant between fresh embryo ang GS groups ($p<0.001$) Generlly 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**