مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
جلد چهار، شماره چهار-آ، پاییز ۱۳۸۴، ۲۱۹-۲۱۰

اثر انجماد شیشه‌ای بر بقای پس از انجماد و ناهنجاری‌های کروموزومی جنین‌های هشت سلولی موش سفیدآزمایشگاهی

دکتر حسین مزدارانی[۱]، شبنم زرعی مرادی[۲]

دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۱۱/۲۰ اصلاح نهایی: ۱۳۸٤/۵/۳ پذیرش مقاله: ۱۳۸٤/٦/١٤

چکیده

زمینه و هدف: تلاش‌هایی برای نگهداری جنین‌هایی که در روش‌های کمک باروری (ART) تولید می‌شوند در حالت انجماد صورت گرفته است. در عین حال هنوز استفاده از جنین‌های منجمد شده به دلیل مشکلات تکنیکی به صورت متداول مورد استفاده قرار نمی‌گیرد و از این رو ضرورت بررسی بیشتر در مورد روش‌های انجماد و تأثیر انجماد بر ساختار و بقای سلول حایز اهمیت است. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر انجماد بر میزان بقای جنین‌ها و ناهنجاری‌های کروموزومی در زمان‌های مختلف پس از انجماد بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از جنین‌های ۸ سلولی استفاده شد که به روش فلاشینگ از موش‌های گونه NMRI، پس از گذشت سه روز از زمان کوپل شدن به دست آمد. جنین‌ها در محلول انجماد حاوی اتیلن گلیکول به نی انجماد منتقل و در ازت مایع نگهداری شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر - یک تا سی روز - جنین‌ها از حالت انجماد خارج و میزان بقا و ناهنجاری‌های کروموزومی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج مبین تأثیر منفی انجماد بر بقاء جنین‌ها می‌باشد به گونه‌ای که بقای جنین‌های گروه شاهد از ۹۸/۳٪ به ۷۹/۲٪ در مدت یک ماه پس از انجماد کاهش یافت. تأثیر سوء زمان انجماد بر ساختار کروموزومی جنین‌ها برای همه زمان‌های در نظر گرفته شده به طور معنی‌داری مشاهده شده است ($p<۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: کاهش بقا و بروز ناهنجاری‌های کروموزومی در جنین‌های منجمد شده می‌تواند ناشی از صدمه بر دوک تقسیم، ارگانل‌های سیتوپلاسمی و یا اسکلت سلولی باشد که در نتیجه، انجماد غیریکنواخت اندام‌های درون سلولی ایجاد می‌شود. این تغییرات عموماً به آنیوپلوییدی کروموزومی و نهایتاً مرگ سلولی منجر می‌شود. این مشاهده ممکن است برای جنین‌های انسان نیز صادق باشد.

واژه‌های کلیدی: جنین موش پیش از لانه گزینی، انجماد شیشه‌ای، بقاء، ناهنجاری کروموزومی

۱- (نویسندهٔ مسئول) استاد گروه آموزشی ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
تلفن:۸۸۰۱۱۰۰۱-۰۲۱، فاکس: ۸۸۰۰۶۵۴۴-۰۲۱، پست الکترونیکی: mozdarah@modares.ac.ir
۲- کارشناس ارشد گروه آموزشی ژنتیک، واحد تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی و گروه ژنتیک، پژوهشکده رویان، تهران

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:30 +0430 on Monday May 20th 2019

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:30 +0430 on Monday May 20th 2019

مقدمه

بیش از ۵۰ سال از زمانی که علم انجماد زیستی توانست به روش قابل قبولی جهت انجماد سلول‌ها برسد می‌گذرد [۱]. همه کوشش‌های انجام شده تاکنون در زمینه انجماد، در جهت افزایش میزان بقا و تسهیل روش انجمادی و مؤثر بودن آن صورت گرفته است.

Whittingham و همکاران برای اولین بار موفقیت انجماد جنین‌های موش را نشان دادند [۲]. انجماد جنین‌ها زمانی قابل کاربرد است که به بقای بالایی منجر شده و ثابت شود که هیچ‌گونه اثر زیان‌آوری بر روی مراحل بعدی تکوین ندارد [۳].

لقاح آزمایشگاهی (IVF)[1] و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)[2]، دو روش موفقیت‌آمیز برای درمان ناباروری زوج‌ها و کمک برای حاملگی می‌باشد. جنین‌های اضافی که با این روش به دست می‌آیند منجمد می‌شوند تا در آینده بدون آنکه بیمار دوباره وارد یک چرخه درمانی شود برای انتقال مورد استفاده قرار گیرد [۴]. گزارش شده است که جنین‌های ۸-۴ سلولی انسان و بلاستوسیست‌های منجمد شده به یک حاملگی طبیعی منتهی شده‌اند [۵]. در لقاح آزمایشگاهی به دلیل موقعیت‌های خاص کلینیکی، نگهداری جنین یا تخمک در شرایط انجماد ضروری می‌باشد. مواردی از قبیل مشکلات انتقال جنین از طریق کانال سرویکال و یا هر موقعیت دیگری که باعث تأخیر انتقال بشود، نیاز به نگهداری جنین در شرایط سرما را ضروری می‌سازد [۶]. تصور می‌شود که مراحل انجماد - ذوب نباید باعث هیچ‌گونه کم شدن بقاء شود و یا نباید وقوع اختلالات ژنتیکی، بدشکلی جنین و یا سقط‌ها را افزایش دهد [۷].

حفظ ساختار طبیعی قشر شفاف، یک هدف مهم در انجماد جنین می‌باشد زیرا قشر شفاف سالم از انتقال بسیاری از عوامل پاتوژن جلوگیری می‌نماید [۸]. تصور می‌شود که آسیب قشر شفاف در ارتباط با سفت شدن محیط سوسپانسیونی جنین در طی سرد کردن می‌باشد [۹]. در مطالعات آمده است که آسیب این ارگان به علت فشارهای مکانیکی ناشی از ذوب شدن غیریکنواخت یا آهسته بلورهای یخ در طی گرم شدن می‌باشد [۱۰]. مراحل معمول منجمدسازی برای جنین‌های پستانداران، به کنترل دقیق مقدار یخ در طی سرد و گرم کردن نیاز دارد [۱۱]. نشان داده شده که انجماد سریع در محلولی که شامل دی‌متیل سولفوکساید DMSO[3] است می‌تواند باعث صدمات شدید کروموزومی شود و نیز بقاء جنین را در محیط آزمایشگاه و در حالت *in vivo* کاهش دهد. بر این اساس، وقوع صدمات کروموزومی مانند نوآرایی‌ها، تحت نفوذ غلظت DMSO و نیز نحوه کارکردن با نی انجماد است. این پیشنهاد مطرح است که دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها به خاطر ضد یخ‌ها و یا سرد کردن، باعث می‌شود که کروماتیدهای خواهری در لقاح به طورطبیعی از هم جدا نشوند و این عدم تفکیک منتهی به آنیوپلوییدی شود [۶]. اختلال در دوک‌های میتوزی به کاهش لقاح و عدم رشد جنین‌ها منجر می‌شود [۱۲]. اختلالات کروموزومی شدید مانند: تریزومی کروموزوم‌های ۱۳، ۱۸ و ۲۱ و یا بدشکلی‌های مادرزادی خفیف و شدید در جنین‌ها و نوزادان حاصل از جنین‌های منجمد شده گزارش شده است [۱۴-۱۳]. مطالعه‌ای دیگر در مورد آنیوپلوییدی و موزائیسم کروموزوم‌های X و Y در جنین‌های منجمد شده انسانی (روز دوم و سوم تکامل)، نشان داد که بخش عظیمی از جنین‌های ذوب شده که ایست تسهیمی را در طول ۲۴ ساعت اولیه کشت آزمایشگاهی نشان می‌دهند، از ناهنجاری‌های عددی کروموزومی برخوردار می‌باشند [۱۵].

با توجه به گزارش‌های منتشر شده در زمینه تأثیر سرما بر عملکرد دوک‌ها و نهایتاً ایجاد اختلال کروموزومی، در این مطالعه تأثیر انجماد شیشه‌ای با استفاده از اتیلن گلیکول که یکی از روش‌های متداول و سریع انجماد جنین است، و نیز تأثیر زمان ماندگاری جنین‌ها در حالت انجماد بر بقاء و ناهنجاری‌های کروموزومی جنین هشت سلولی موش سفید بررسی گردید.

1- *in vitro* fertilization
2- Intracytoplasmic sperm injection
3- Dimethyl sulfoxide

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:30 +0430 on Monday May 20th 2019

مواد و روش‌ها

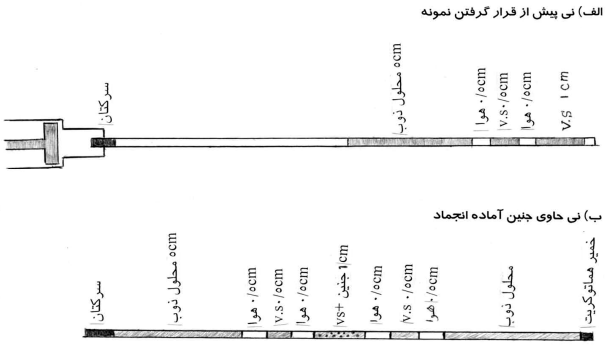
مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی است که به روش زیر انجام شده است:

تحریک تخمک‌گذاری و جمع‌آوری جنین: از موش سفید آزمایشگاهی گونه NMRI (انستیتو پاستور تهران) استفاده شد. سن موش‌ها بین ۸-۶ هفته بود و قبل از انجام آزمایش‌ها حداقل به مدت یک هفته در شرایط حیوانخانه پژوهشکده رویان در شرایط دما (۲۳± ۲ºC)، غذا (پلت) و نور مناسب (۱۴ ساعت روشنایی، ۱۰ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. هر مرحله کار و تزریق؛ متشکل از ۸ موش ماده بوده است. به هر موش ۱۰ واحد PMSG[1] (اینتروت، هلند) ، به روش داخل صفاقی تزریق و پس از ۴۸ ساعت،۱۰ واحد HCG[2] (ارگانون، هلند)، تزریق شد. پس از تزریق، هر دو موش ماده با یک موش نر کوپل شد. صبح روز بعد، موش‌های پلاک مثبت از بقیه جدا شدند. پس از گذشت ۶۸-۶۶ ساعت از تزریق HCG موش‌های ماده پلاک مثبت به روش دررفتگی گردنی نخاعی شده، پس از تشریح، اویداکت (لوله تخم بر) آن جدا شده و در محیط کشت مناسب به روش فلاشینگ[3] از ناحیه اینفاندیبولوم، جنین‌های ۸ سلولی از سر دیگر لوله تخم بر خارج شدند. محیط کشت مورد استفاده T6 حاوی ۴mg/ml سرم آلبومین گاو (BSA)[4] سیگما بود که ۲۴ ساعت پیش از کشتن حیوانات، قطره‌گذاری شده، برای جلوگیری از آلودگی روی آن‌ها پارافین مایع (Gibco BRL) ریخته و در انکوباتور ۳۷ºC، با جریان CO2 به مدت یک شبانه روز، نگهداری شد.

محلول انجماد: محلول انجماد (VS)[5] حاوی PB1 (بافر فسفات سالین)، فایکول، ساکارز (Sigma)، ۴۰٪ اتیلین گلیکول (آلدریچ آمریکا) بود. در حقیقت ابتدا محلول فایکول ساکارز با استفاده از PB1 با افزودن فایکول و ساکارز ساخته شد و به نسبت ۲ به ۳ اتیلن گلیکول (اتیلن گلیکول ۴۰٪) به آن اضافه و محلول نهایی انجماد ساخته شد که قابل نگهداری در دمای ۴ تا ۲۰- درجه سانتی‌گراد بود.

محلول ذوب حاوی PB1، ساکارز و سرم آلبومین گاو (BSA)، و قابل نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود.

انتقال جنین به نی: در این تحقیق از روش ا نجماد شیشه‌ای بر طبق پروتکل Kasai استفاده شد [۱۱]. برای انجام این کار از سرنگ انسولین، نی انجماد فرانسوی ۰/۲۵ میلی‌لیتر، محیط ذوب، محیط انجماد، خمیر هماتوکریت، پیپت پاستور، شیشه ساعت، ظرف مخصوص کشت ۳۵ میلی‌متر، انکوباتور مرطوب ۳۷ درجه سانتی‌گراد با جریان ۵٪ CO2 و ۹۵٪ هوا، پارافین مایع و تانک نیتروژن مایع استفاده شد. نحوه قرار گرفتن جنین در نی انجماد در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: مراحل آماده‌سازی نی انجماد

درجه حرارت محیط کار۳±۲۳ درجه سانتی‌گراد بود. تمامی محلول‌های مورد استفاده می بایست در این درجه حرارت متعادل شوند. سپس تعداد ۱۰-۸ عدد جنین با استفاده از پیپت پاستور در شیشه ساعتی که حاوی محلول انجماد بود، قرار داده شد. پس از یک دقیقه، جنین‌ها از این محیط جمع‌آوری شده و به داخل نی انجماد تزریق شدند (شکل۱- ب). حدود ۳-۲ دقیقه نی در داخل بخار نیتروژن نگهداری شده و سپس وارد تانک نیتروژن شد. زمان کل انجام این مراحل ۳/۵-۳ دقیقه بوده است.

در این بررسی تعداد ۳۷۰ سر موش سفیدآزمایشگاهی گونه NMRI مورد استفاده قرار گرفت. تعداد کل جنین ۸ سلولی، ۱۳۰۰ عدد بود. در این بررسی ۴ گروه مورد آزمایش واقع شدند. گروه کنترل شامل جنین‌های منجمد نشده و

1- Pregnant Mare Serum Gonadotropin
2- HumanChronicGonadotropin
3- flushing
4- Bovine Serum Albomin,
5- Vitrification Solution

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:30 +0430 on Monday May 20th 2019

گروه‌های آزمون شامل جنین‌های منجمد شده بودند که در زمان‌های مختلف، تحت انجماد قرار گرفتند (گروه‌های ۲۴ ساعت، یک هفته و یک ماه). در طی این مدت جنین‌ها در ازت مایع نگهداری شدند.

به طور تقریبی در هر گروه تعداد ۳۵۵ عدد جنین، منجمد و مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه کلیه جنین‌های ۸-۵ سلولی به عنوان جنین ۸ سلولی در نظر گرفته شد.

مراحل ذوب و نحوه بررسی بقاء: روز پیش از ذوب، محیط معمولی T6 حاوی ۴mg/mL BSA قطره‌گذاری و یک شبانه روز، در انکوباتور قرار داده شد. نی انجماد از تانک نیتروژن خارج گردید و به مدت ۱۰ ثانیه در دمای اتاق نگهداری و سپس ظرفی را از آب با دمای اتاق پر نموده و نی به مدت ۱۰ ثانیه در آن شناور شد. پس از خارج نمودن نی، انتهای خمیر هماتوکریت آن با قیچی جدا شد. سپس نی را به صورت سروته گرفته (دقیقاً روی محیط ذوب) سر کتان را قیچی کرده و محیط داخل نی به درون محیط تازه ذوب تخلیه گردید. جنین‌ها زیر میکروسکوپ اسکن و پس از اطمینان از حضور جنین‌ها و با گذشت ۴-۳ دقیقه به درون قطره‌های محیط کشت که در انکوباتور قرار گرفته بود منتقل شدند. جنین‌ها درچندین قطره (۸-۷ قطره) شستشو داده شده و سپس ظرف حاوی جنین‌ها به انکوباتور منتقل و ۶-۴ ساعت به حال خود گذاشته شد. بررسی بقای جنین‌ها پس از این مرحله انجام شد.

در این بررسی جنین سالم به جنینی اطلاق شد که ۸۰٪ بلاستومرها سالم بوده و فاصله بلاستومرها از قشر شفاف نرمال باشد. جنین دژنره به جنینی اطلاق شد که حاوی بیش از ۲۰٪ بلاستومر چروکیده یا گرانوله بوده و یا فاصله بلاستومرها از قشر شفاف زیاد شده باشد.

بررسی کروموزومی جنین‌ها: به منظور بررسی کروموزومی جنین‌ها از روش Dyban [۱۷-۱۶] با اصلاحاتی استفاده شد. پس از برداشتن یا نازک کردن قشر شفاف دور هر جنین، با استفاده از اسید تایرود، جنین‌ها به ظرف حاوی محیط کشت و کلشیسین (۰/۲ μg/ml) (Gibco BRL) به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل و به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس، مقدار ۱-۲ میلی‌لیتر محلول سیترات سدیم سیگما ۱٪ بر روی شیشه ساعت ریخته و جنین‌ها به این محلول منتقل شدند. محلول سیترات سدیم محلولی هیپوتونیک بوده و باعث تورژسانس سلول‌ها می شود. پس از ۴۵ دقیقه هر ده جنین بر روی یک لام با روش تثبیت سه مرحله‌ای با فیکساتیو کارنوی متشکل از نسبت‌های مختلف اسیداستیک و متانول (مرک)[1] تثبیت شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، جنین‌ها با محلول گیمسا (مرک) با غلظت ۳٪ و به مدت ۳ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. آنالیز کروموزومی با استفاده از یک میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی ۱۰۰۰ برابر انجام شد [۱۸] وجنین‌ها بر مبنای تعداد کروموزوم‌های شمارش شده به صورت دیپلویید (۲n=۴۰)، آنیوپلویید (تعداد کروموزوم‌ها کمتر یا بیشتر از ۲n)، هایپردیپلویید (>۲n) و پلی‌پلویید (۳n یا بیشتر) دسته‌بندی شدند.

آنالیز آماری: با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 11.2 از آزمون‌های آماری کای دو و فیشر برای آنالیز آماری و ارزیابی معنی‌دار بودن یافته‌ها استفاده شد.

نتایج

نتایج در جداول ۱ و ۲ خلاصه و در نمودار ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: نتایج بقاء در زمان‌های مختلف پس از انجماد

پارامترها / گروه آزمایشی	تعداد کل جنین	تعداد جنین سالم	تعداد جنین دژنره	درصد بقاء
کنترل	۶۰	۵۹	۱	۹۸/۳
۲۴ ساعت	۳۵۴	۳۱۹	۳۵	۹۰/۱*
یک هفته	۳۶۰	۳۰۲	۵۸	۸۳/۹**
یک ماه	۳۶۰	۲۸۵	۷۵	۷۹/۲**

**** با گروه کنترل، اختلاف معنی‌دار دارد (p<۰/۰۵)***

***** با گروه کنترل، اختلاف معنی‌دار دارد (p<۰/۰۱)***

چنانچه در این شکل مشاهده می‌شود، نسبت جنین‌های سالم در گروه کنترل قریب به ۱۰۰٪ می‌باشد. با افزایش زمان نگهداری جنین‌ها در حالت انجماد نسبت جنین سالم پس از

1- Merck

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:30 +0430 on Monday May 20th 2019

ذوب، کاهش و نسبت جنین‌های دژنره افزایش می‌یابد. به عنوان مثال در گروه ۲۴ ساعت نسبت به گروه کنترل کاهش چشم‌گیری در بقاء مشاهده می‌شود به گونه‌ای که پس از یک ماه درصد بقا از ۹۸/۳٪ (گروه شاهد) به ۷۹/۲٪ کاهش یافت (جدول ۱).

جدول ۲: انواع ناهنجاری‌های کروموزومی مشاهده شده در جنین‌ها در زمان‌های مختلف پس از انجماد

پارامترها / گروه آزمایشی	متافازهای شمارش شده	جنین‌های آنیوپلویید	جنین‌های هایپردیپلویید	جنین‌های پلی پلویید	جنین‌های طبیعی	درصد کل ناهنجاری‌ها
کنترل	۶۰	۵	۰	۱	۵۴	۱۰
۲۴ ساعت	۳۱	۱۰	۰	۱	۲۰	۳۵/۴*
یک هفته	۳۴	۹	۱	۴	۲۰	۴۱/۷*
یک ماه	۳۸	۱۰	۳	۸	۱۶	۵۵/۲*

**** با گروه کنترل، اختلاف معنی‌دار دارد (p<۰/۰۱).***

نتایج حاصل از بررسی میزان وقوع ناهنجاری‌های کروموزومی در جنین‌ها پس از انجماد در جدول ۲ و نمودار ۱ ارایه شده است. درصد ناهنجاری‌های کروموزومی از نوع آنیوپلوییدی در گروه کنترل، ۸/۳٪ می‌باشد. با افزایش زمان انجماد میزان این ناهنجاری‌ها افزایش می‌یابد و سپس حالت یکنواخت به خود می‌گیرد. به طوری که در گروه ۲۴ ساعت، ۳۲/۳٪، در گروه یک هفته، ۲۶/۵٪ و در گروه یک ماه، ۲۶/۳٪ می‌باشد (نمودار ۱). با مقایسه گروه ۲۴ ساعت با گروه کنترل، وقوع آنیوپلوییدی ۲۴٪ افزایش یافت (p=۰/۰۰۴) و در مقایسه گروه یک هفته با گروه کنترل این میزان افزایشی معادل ۱۸/۲٪ (p=۰/۰۱۸) و گروه یک ماه نسبت به گروه کنترل افزایش ۱۷ درصدی (p=۰/۰۱۶) را نشان داد که از نظر آمار ی کاملاً معنی‌دار است.

یافته‌های موجود در جدول ۲، نشان می‌دهد که میزان وقوع ناهنجاری‌های هایپردیپلویید و پلی‌پلویید در گروه‌های آزمایشی کاملاً معنی‌دار است (p<۰/۰۱).

میزان وقوع کل ناهنجاری‌ها (بدون درنظر گرفتن نوع آن) نیز بررسی شد. این میزان در مقایسه گروه کنترل و گروه یک هفته، افزایش ۴۱/۲ ٪ داشت که از لحاظ آماری کاملاً معنی‌دار است (p=۰/۰۰۱) و در مقایسه گروه کنترل با گروه یک ماه افزایش ۳۸/۶ درصدی مشاهده شد که این مقدار نیز کاملاً معنی‌دار می‌باشد (p=۰/۰۰۱).

این میزان در گروه یک هفته و گروه یک ماه هم‌چنان افزایش داشت ولی تقریباً حالت یکنواخت را نشان می‌داد. با مقایسه گروه ۲۴ ساعت با گروه کنترل، بقاء به میزان ۸/۲٪ کاهش یافت (p=۰/۰۳۷) و مقایسه گروه یک ماه با گروه کنترل، میزان کاهش ۱۸/۱ درصدی مشاهده گردید (نمودار ۱).

نمودار ۱ : نمودار مقایسه‌ای درصد بقا و ناهنجاری‌های کروموزومی جنین ۸ سلولی موش در زمان‌های مختلف پس از انجماد.

بحث

بقاء پس از ذوب: طبق نتایج نشان داده شده در جدول ۱ و نمودار ۱ طول مدت نگهداری در محیط انجماد بر بقاء پس از انجماد جنین‌ها اثر منفی دارد. به نظر می‌رسد صدمات ناشی از انجماد که بر جنین تحمیل می‌شود، ناشی از عوامل

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:30 +0430 on Monday May 20th 2019

متعددی از جمله، صدمات ساختمانی مانند پارگی قشر شفاف، افزایش وزیکول‌های سیتوپلاسمی، بر هم خوردن زمینه سیتوپلاسمی، تورم غشاء هسته و اختلالات کروموزومی ناشی از شکسته شدن دوک‌های میوزی (در اووسیت) می‌باشد [۱۹].

امروزه انجماد جنین به روش‌های متفاوت و با استفاده از ضدیخ‌های متنوعی انجام می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که در روش انجماد آهسته درصد بقاء جنین‌های دارای تسهیم بیشتر، از میزان بالاتری برخوردار است و درصد حاملگی و تولد نوزاد زنده نیز بیشتر می‌باشد. از طرف دیگر گزارش‌ها نشان می‌دهد که میزان موفقیت روش انجماد سریع، وابسته به مرحله تکاملی جنین می‌باشد [۲۰]. مطالعه دیگری نشان می‌دهد که غلظت و مدت زمان قرارگیری جنین‌ها درمحلول حاوی ضدیخ، اندازه سلول، نفوذپذیری غشا، و مرحله تکوینی جنینی از جمله پارامترهای مهم برای موفقیت انجماد فوق سریع می‌باشد [۲۱]. Miyake و همکارانش [۲۲] نشان دادند با استفاده از روش انجماد شیشه‌ای میزان حیات بلاستوسیست‌ها به دلیل وسیع شدن حفره بلاستوسل کاهش می یابد.

روش انجماد شیشه‌ای به شکل‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است؛ به عنوان مثال در روش انجماد شیشه‌ای ساده که در این تحقیق نیز مورد استفاده قرار گرفت، تصور می‌شود میزان بقاء جنین بالا باشد و به عنوان یک روش متداول برای انجماد و نگهداری جنین‌های موش در آزمایشگاه‌های مختلف توصیه می‌شود [۱۱]. نشان داده‌اند در روش انجماد شیشه‌ای دو مرحله‌ای، بقاء جنین‌ها به وضوح بیشتر از روش انجماد شیشه‌ای ساده است [۲۳]. و بقای بالاتری با روش انجماد شیشه‌ای با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گزارش شده است [۲۴].

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود بقای جنین‌ها پس از انجماد کاهش یافته و این میزان با افزایش زمان نگهداری جنین‌ها در حالت انجماد کاهش بیشتری می‌یابد . در مطالعات انجام شده قبلی مشخص نیست که جنین‌ها تا چه مدت در حالت انجماد نگهداری شده‌اند. از این رو ممکن است عوامل متعددی در آسیب رساندن به سلول در حالت انجماد نقش داشته باشد. انجماد و گرم کردن سلول‌ها زنجیره‌ای از استرس متشکل از انجماد، سرد کردن، گرم کردن و رهیدراته کردن را به سلول وارد می‌کند [۲۵]. هر یک از این عوامل می‌تواند باعث صدمه‌ای به سلول شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد قشر شفاف جنین‌های موش و گاو، به دلیل تغییرات حرارتی در طول سرد و گرم کردن صدمه می‌بینند [۲۶].

پژوهش‌های انجام شده به وسیله Kasai و همکارانش در سال ۲۰۰۲ [۲۷] مبین آن است که تشکیل یخ در درون سلول‌ها، سمیت شیمیایی مواد ضدیخ، تورم اسمزی، چروکیدگی اسمزی، پاره شدن قشر شفاف و تشکیل یخ در خارج سلول در عدم بقای جنین‌ها پس از ذوب نقش دارد [۲۷]. این رخدادها احتمالاً باعث تغییرات مورفولوژیکی در جنین‌ها می‌شود که پس از ذوب به شکل‌های مختلفی قابل مشاهده می‌باشد . اغلب ممکن است نوع صدمه‌ای که پس از انجماد جنین حاصل می شود را از ظاهر جنین‌ها پس از ذوب و متعاقب آن کشت جنین‌ها در محیط نتیجه‌گیری کرد. این امر می‌تواند به بهبود روش‌های انجماد جنین‌های بسیاری از گونه‌ها از جمله انسان، کمک کند [۲۷]. از جمله آسیب‌هایی که طی انجماد به جنین وارد می‌آید، صدمه به قشر شفاف حایز اهمیت بسیاری است. Landa عنوان کرد که آسیب قشر شفاف، از فشارهای مکانیکی ناشی از ذوب شدن غیریکنواخت یا آهسته بلورهای یخ در طی گرم شدن ناشی می‌شود. برطبق این نظریه، بلورهای یخ اطراف جنین در طی ذوب در جهت‌های مخالف هم حرکت کرده و نیروهایی به قشر شفاف وارد می‌کنند که باعث ایجاد آسیب می‌شود [۱۰]. در انجماد شیشه‌ای در خارج سلول یخ تشکیل نمی‌شود ولی در داخل سلول امکان تشکیل یخ وجود دارد و این در صورتی است که محلول ضدیخ به اندازه کافی به داخل سلول نفوذ ننماید و یا به عبارت دیگر غلظت ضدیخ به اندازه کافی زیاد نباشد [۲۸]. بعضی از جنین‌ها، در اثر سرمای زیر درجه حرارت فیزیولوژیکی، به شدت دچار آسیب می‌شوند. حساسیت به سرما وابسته به گونه، مراحل تکاملی جنین و نیز شرایط تکوین جنین می‌باشد. مراحل اولیه تکامل جنینی بسیاری از گونه‌ها، نسبت به سرمای زیر درجه حرارت فیزیولوژیکی،

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:30 +0430 on Monday May 20th 2019

حساسیت بالایی دارند. در دمای ۵ تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد، آب خارج سلولی شروع به یخ زدن می‌کند اما آب داخل سلولی به دلیل جلوگیری غشاء سلول از نفوذ بلورهای یخ به داخل سلول، وجود الکترولیت‌ها و پروتئین‌ها سردتر شده ولی یخ نمی‌زند. وجود یخ خارج سلولی باعث وارد شدن آسیب‌های مختلف به جنین می‌شود و به غشاء، آسیب فیزیکی وارد می‌کند [۲۹]. ضمناً بلورهای یخ داخل سلولی برای جنین کشنده می‌باشد. در طی انجماد،خطر تشکیل یخ داخل سلولی همیشه وجود دارد که یا در طی ذوب و یا توسط یخ خارج سلولی و در زمان سرد کردن القا می‌شود [۲۸]. اگر سرعت ذوب زیاد باشد، سلول زمانی برای تشکیل مجدد بلورهای یخ و یا بزرگ شدن بلورها نخواهد داشت و در نتیجه بلور یخ شکل نمی‌گیرد [۳۰].

می‌توان چنین نتیجه گرفت که کاهش بقای مشاهده شده در این بررسی به علت نفوذ نامناسب مواد ضدیخ به داخل سلول و نیز به دلیل صدمه به قشر شفاف به سبب ایجاد کریستال‌های یخ در اطراف سلول باشد.

ناهنجاری‌های کروموزومی: نتایج ارایه شده در جدول ۲ و نشان داده شده در نمودار ۱ مبین آن است که با افزایش مدت نگهداری جنین در حالت انجماد، درصد وقوع ناهنجاری‌های کروموزومی (از قبیل آنیوپلوییدی و پلی‌پلوییدی) افزایش می‌یابد.

در مطالعه‌ای که در مورد وقوع تبادل کروماتیدهای خواهری (SCE)[1] در جنین‌های هشت سلولی منجمد و ذوب شده انجام شد، فراوانی SCE درجنین‌هایی که مدت ۵ دقیقه در معرض مواد ضدیخ بودند بسیار کم بود [۳۱].

Shaw و Kola در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که انجماد سریع با ضد یخ DMSO می‌تواند باعث صدمات شدید کروموزومی شود و نیز بقاء جنین‌ها را در شرایط *in-vitro* و *in-vivo* کاهش می‌دهد. وقوع و شدت این صدمات تحت نفوذ عامل غلظت DMSO و نیز موقعیت جنین در نی انجماد در زمان سرد کردن به روش سریع است. به نظر می‌رسد این صدمات بیشتر به دلیل عواملی مانند شکل گیری کریستال‌های یخ در طول سرد کردن سریع بوده است [۷].

در مطالعه دیگری نشان داده شد که انجماد جنین‌های جوان موش با ضدیخ پروپاندیول، می‌تواند باعث شکل‌گیری سلول‌های پلی پلوییید یا مکانیسم الحاق خود به خودی بلاستومرها شود. به نظر می‌آید انجماد و ذوب، مسئول الحاق بلاستومرها هستند و این رخداد بدون ارتباط با نوع ضدیخ به کار رفته و نیز کیفیت آن می‌باشد [۳۲]. با توجه به درصد وقوع آنیوپلوییید و پلی پلوییید امکان دارد که دهیدراسیون و تورم اسمتیکی باعث تغییرات در اسکلت سلول و نهایتاً، منجر به پلی پلوییدی و آنیوپلوییدی شود [۲۶]. با توجه به این که کلیه جنین‌های منجمد شده در این مطالعه کیفیت عالی داشته‌اند (۱۰۰٪ بلاستومرها سالم بود)، این مسئله که انجماد و ذوب مسئول الحاق بلاستومرها است و بدون ارتباط با نوع ضدیخ و کیفیت جنین می‌باشد را تصدیق می‌شود [۳۳].

احتمال دارد نگهداری درازمدت جنین‌ها در محلول‌های ضدیخ حاوی اتیلن‌گلیکول، در عملکرد دوک تقسیم و میکروتوبول جنین‌ها نیز تأثیر بگذارد [۳۴] و از این رو باعث بقای کمتر آن‌ها شود (جدول ۱، نمودار ۱). انکوباسیون یک ساعته به رشته‌های دوک نرمال و کروموزوم‌ها اجازه بهبودی می‌دهد [۴]. تأثیر انجماد بر دوک سلولی تخمک‌ها نیز نشان داده شده است [۳۵].

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در این پژوهش همراه با گزارش‌های متعدد منتشر شده مبین تأثیر انجماد بر بقاء سلول پس از انجماد و وقوع ناهنجاری‌های کروموزومی می‌باشد. به طور کلی نتایج نشان می‌دهند که نگهداری جنین‌های موش در مدت زمان طولانی در ازت مایع، از طرفی باعث کاهش بقای جنین‌ها و از طرفی موجب افزایش ناهنجاری‌های کروموزومی پس از انجماد می‌شود، که خود منجر به کاهش بقاء می‌گردد؛ ممکن است این مشاهده برای جنین‌های انسان نیز صادق باشد.

1- Sister Chromatid Exchange

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشکده رویان وابسته به جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران انجام شده است.

References

[1] Poly C, Smith AV, Parkes AS. Survival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 1949; 164: 166-79.

[2] Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -296degrees C. *Science*. 1972; 178(59): 411-4.

[3] Schneider V, Maurer RR. Factors affecting survival of frozen – thawed mouse embryos. *Biology of Reprod*. 1983; 29: 121-28.

[4] Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yong YS. 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] Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In vitro Fert Embryo Transf,* 1985; 2(2): 59-64.

[6] Trounson A. Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril*, 1986; 46(1): 1-12.

[7] Shaw JM, Kola I. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J Reprod Fert*, 1991; 91: 9-18.

[8] Singh EL. The disease control potential of embryos. *Theriogenology*. 1987; 27: 9-20.

[9] Whittingham DG, Adams CE. Low temperature preservation of rabbit embryos. *J Reprod Fertil*, 1976; 47(2): 269-74.

[10] Landa V. Protection of non-cellular investme_ nts of rabbit morula stored at -196 degrees C. *Folia Biol (Praha),* 1982; 28(5): 350-8.

[11] Kasai M. Cryopreservation of mammalian embryos. *Mol Biote Chnol*, 1997; 7(2): 173-9.

[12] Eroglu A, Toth TL, Toner M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryop_ reservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril*, 1998; 69(5): 944-57.

[13] Sutcliffe AG, D'Souza SW, Cadman J, Richards B, Mc Kinlay IA, Lieberman B. Minor congenital anomalies, major congenital malformation and development in children conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod,* 1995; 10(12): 3332-7.

[14] Wennerholm UB, Hamberger L, Nilsson L, Wemergren M, Wikland M, Bergh C. Obstetric and perinatal out come of children conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod*, 1997; 12(8): 1819-25.

[15] Laverge H, Van der Elst J, De, Sutter P, Verschra egen-Spae MR, De Paepe A, Dhont M. Fluorescent in-situ hybridization on human embryos showing cleavage arrest after freezing and thawing. *Hum Reprod,* 1998; 13(2): 425-9.

[16] Dyban AP. An improved method for chromosome preparations from preimplantation mammalian embryos, oocytes or isolated blastomeres. *Stain Technol*, 1983; 58(2): 69-72.

[17] Dyban AP. Reliable technique for chromosomal preparations from mammalian oocytes and preimplantation embryos. Preimplantation Genetics, Plenum Press, 1991; pp: 293-8.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:30 +0430 on Monday May 20th 2019

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:30 +0430 on Monday May 20th 2019

[18] ISCN (1995), International System for Human Chromosome Nomenclature, Evans, H.J. and Jacobes P.A. (eds.). Cytogenetics and Cell Genetics, 1995; Karger.

[19] Shee-Uan C, Yih-Ron 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.

[20] Royos AA, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Quick Freezing of mouse two, four and eigth cell embryos with ethylene glycol plus sucrose or lactose: effects of developmental stage and equilibration period on survival in vitro. *Anim Reprod Sci*, 1992; 27: 239-45.

[21] Vander AI, Cornille F, Ongkowidjojor, *et al.* Cryopreservation of pronucleate mouse owa: Slow versus ultrapid freezing. *Hum Rep*, 1990; 5: 619-21.

[22] Miyake T, Kasai M, Zhu SE, et al. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol- based solution simple method. *Theriogenology*. 1993; 19: 121-34.

[23] Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurai T, Machida T. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol- based solution. *J Reprod Fertil,* 1993; 98(1): 139-45.

[24] Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development capacity frozen thawed bovine oocytes cryopreserved after maturation in-vitro and frozen – thawed bovine embryos derived from frozen mature oocytes. *Theriogenology.* 1996; 38: 711-9.

[25] Leibo SP. Techniques for preservation of mammalian germ plasma. *Anim Biotech*, 1992; 3: 139-53.

[26] Rall WF, Mayer TK. Zona fracture damage and avoidance during the cryo-preservation of mammalican embryos. *Theriogenology.* 1989; 31: 683-92.

[27] Kasai M, Ito KEd, Ashinge K. Morphological appearance of cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryo-injury. *Hum Rep,* 2002; 17: 1869-79.

[28] Kasai M. Principles of the cryo-preservation of mammalian embryos by vitrification. Reprod. Biology up date. Assessment of environment toxicity. Myomoto M and Marabe N.Eds. *Shoukadou Book seller company okgoto* Japan, 1998; pp:415-24.

[29] Schneider V, Mazur P. Relative influence of unfrozen fraction and salt concentration on the survival of slowly frozen 8 cell mouse embryos. *Cryobiology*. 1987; 24: 17-41.

[30] Dupuy J, Jal JF, Ferradou C, et al. Controlled nucleation and quiasi – ordered growth of ice crystals from low temperature electrolyte solution. *Nature.* 1982; 296: 138-40.

[31] Ishida GM, Saito H, Ohta N, Takahashi T, Ito MM, Saito T, et al. The optimal equilibration time for mouse embryos frozen by vitrification with trehalose. *Hum Reprod,* 1997; 12(6): 1259-62.

[32] Balakier H, Zenzes M, Wang P, MacLusky NJ, Casper RF. The effect of cryopreservation on developmental of S and G2-phase mouse embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 1991; 8(2): 89-95.

[33] Balakier H, Cabaca O, Bouman D, Shewchuk AB, Laskin C, Squire JA. Spontaneous

[35] Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, *Lee TY*. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing - - a review article. *Mol Cell Endocrinol,* 2003; 202(1-2): 101-7.

blastomer fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism. *Hum Reprod,* 2000; 15 (11): 2404-10.

[34] Khromenkova OB, Zhernoklev GV, Zhegunov GV, Grischenko VI. The incidence of mitotic abnormalities in cryopreserved eight- cell early and compacted mouse embryos. *Cryo Letters*, 2003; 24(1): 27-32.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:30 +0430 on Monday May 20th 2019