The Journal of Qazvin Univ. of Med. Sci.
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
Vol. 10, No. 2, Summer 2006
سال دهم، شماره ۲ (پی‌درپی ۳۹)، تابستان ۱۳۸۵

اثرات ضدیخ‌های مختلف بر میزان زنده ماندن جنین‌های تولید شده به روش آزمایشگاهی

دکتر فرزاد رجایی* پروفسور تاکشیج اتویی**

The influences of cryoprotectants on viability of embryos produced in vitro

F Rajaei✡ T Otoi

✱Abstract

Background: The post-thaw embryo survival has been shown to depend on different factors such as type of cryoprotectant. Ethylene glycol, 1,2 propanediol and glycerol are among the routine cryoprotectants widely used for embryo cryopreservation in different animals and human as well.

Objective: To investigate the effects of different cryoprotectants on viability of blastocysts produced in vitro and also determining a suitable cryoprotectant for embryo cryopreservation.

Methods: A total of 197 porcine blastocysts produced in vitro (at days 6 and 7 post-IVF) were randomly divided into control and cryoprotectant (CP) groups. The CP groups were exposed to 10 % CP solutions (Ethylene glycol, 1,2 propanediol and glycerol) in 3 steps for 1 hr at room temperature (23-25°C). The survival rate was measured as the proportion of recovered embryos following a 24-hr culture in NCSU-37 media. The survival rate was further compared with the data obtained from the control group (cultured in 0.3% BSA in PBS with the same conditions).

Findings: The results showed that the survival rates of blastocysts exposed to PD and GLY were similar to those exposed to EG ($p<0.05$). However, there was no significant difference ($p>0.05$) in survival rates between the EG and control groups.

Conclusion: The data indicated that the exposure of porcine blastocysts to cryoprotectant causes a reduction in survival rate and that the ethylene glycol produced the least detrimental effects.

Keywords: Blastocysts, Pig, Fetus

✱ چکیده

زمینه : میزان زنده ماندن جنین پس از انجماد و ذوب به عوامل مختلفی از جمله نوع ضدیخ مصرفی وابسته است. اتیلن‌گلیکول (EG)، ۱و۲ پروپاندیول (PD) و گلیسرول (GLY) ضدیخ‌هایی هستند که به طور معمول برای انجماد جنین در حیوان و انسان استفاده می‌شوند.

هدف : مطالعه به منظور تعیین اثر ضدیخ‌های متفاوت بر روی میزان زنده ماندن بلاستوسیست‌های تولید شده به روش In vitro و تعیین ضدیخ مناسب برای انجماد جنین انجام شد.

مواد و روش‌ها : تعداد ۱۹۷ بلاستوسیست خوک به روش In vitro تولید و در روز ۶ و۷ بعد از IVF به طور تصادفی به دو گروه شاهد و ضدیخ تقسیم شدند. بلاستوسیست‌های گروه ضدیخ در معرض ۳ نوع محلول ضدیخ ۱۰ درصد (EG، PD وGLY) به مدت یک ساعت در یک روش سه مرحله‌ای در درجه حرارت اتاق (۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت کشت مجدد در محیط NCSU-37، شواهد مورفولوژیک زنده ماندن بلاستوسیست‌ها، بر اساس تشکیل مجدد حفره بلاستوسل با مشاهده استریومیکروسکوپیک(بزرگ‌نمایی۴۰) ارزیابی شد. جنین‌های گروه شاهد در محلول ۰/۳ درصدBSA درPBS و بدون ضدیخ با همان شرایط قرار داشتند. داده‌ها با آزمون آماری آنالیز واریانس و تعقیبی فیشر تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها : میزان زنده ماندن بلاستوسیست‌ها در گروه‌های PD وGLY به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه شاهد بود($p<۰/۰۵$). با این حال، تفاوت معنی‌داری در میزان زنده ماندن در بین گروه‌های شاهد وEG وجود نداشت.

نتیجه‌گیری : نتایج نشان می‌دهد که مواجهه جنین‌های خوک با ضدیخ، میزان زنده ماندن را کاهش می‌دهد وEG کم‌ترین میزان سمیت را دارد.

کلیدواژه‌ها : بلاستوسیست، خوک، جنین

* استادیار گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی قزوین
** استاد بخش تولیدمثل دانشگاه یاماگوچی ژاپن

آدرس مکاتبه : قزوین، دانشگاه علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، آزمایشگاه کشت سلولی، تلفن ۴- ۳۳۳۶۰۰۱
✡Email: frajaei@qums.ac.ir

*** مقدمه :**

کارایی انتقال جنین به میزان زنده ماندن جنین از زمان جمع‌آوری اووسیت تا زمان انتقال وابسته است. تا به امروز بارها گزارش شده است که در حیوان‌های مختلف نوزادان زنده زیادی از جنین‌های منجمد و سپس ذوب شده متولد شده‌اند.[۱] با این وجود در خوک، به دلیل محتوای بالای چربی داخل سلولی و به دنبال آن حساسیت بالا نسبت به انجماد، این میزان تولد زنده پس از استفاده از روش‌های گوناگون کم بوده است.[۲] میزان زنده ماندن جنین پس از ذوب به کیفیت جنین، مرحله تکاملی، گونه، زمان جمع‌آوری تا انجماد، روش انجماد و نوع ضدیخ وابسته است.[۳] مطالعه‌ها نشان داده است که استفاده از ضدیخ‌های مختلف به تنهایی یا طی فرایند انجماد، می‌تواند بر فرا ساختمان سلول تأثیر زیادی داشته باشد.[۴] تاکنون از ضدیخ‌های زیادی برای جلوگیری از تشکیل یخ داخل سلولی هنگام انجماد جنین‌ها در مرحله قبل از لانه‌گزینی استفاده شده است، ولی اتیلن گلیکول (EG)، ۱و۲ پروپاندیول (PD) و گلیسرول (GLY) ضدیخ‌های رایجی هستند که برای انجماد جنین در حیوان‌های گوناگون و انسان استفاده می‌شوند.[۵] محققین نشان داده‌اند که مرگ بلاستومرها بعد از انجماد به دلیل تشکیل یخ در طول انجماد و ذوب پس از آن، تورم اسمزی و سمیت شیمیایی ضدیخ است که سمیت شیمیایی ضدیخ‌ها به دلیل توانایی آنها در نفوذ به داخل سلول‌ها بسیار زیاد است.[۶] در ضمن فشارهای اسموتیک به صورت آب‌دهی و آب‌گیری، در زمان قرار گرفتن در ضدیخ ممکن است باعث آسیب جنین شود.[۷] فشارهای اسموتیک یکی از عوامل مضر شناخته شده برای انواع سلول‌ها مثل اووسیت‌ها و جنین‌هاست.[۸و۹و۱۰و۱۱]

هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثر ضدیخ‌های متفاوت بر روی میزان زنده ماندن جنین‌های تولید شده به روشIn vitro و تعیین ضدیخ مناسب برای انجماد جنین بود.

*** مواد و روش‌ها :**

به دلیل محدودیت‌های موجود در استفاده از جنین انسان و به دلیل شباهت زیاد مراحل تکاملی جنین انسان با جنین خوک، در این مطالعه از جنین خوک استفاده شد.

تخمدان‌های خوک پس از تهیه از کشتارگاه در داخل سالین فیزیولوژیک با حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و بلافاصله به آزمایشگاه جنین‌شناسی و تولیدمثل در دانشگاه یاماگوچی ژاپن منتقل شدند. اووسیت‌ها به وسیله یک سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری با سرسوزن ۱۸ از فولیکول‌های با قطر ۳ تا ۶ میلی‌متر آسپیره شدند و در محلول تغییر یافته PBS (m-PBS; Fukushima, Japan) که به آن۱۰۰ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین G و ۰/۱ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر استرپتومایسین سولفات اضافه شده بود قرار گرفتند. در این تحقیق تنها از اووسیت‌های با اووپلاسم یکنواخت و سلول‌های کومولوس متراکم و برای بلوغ اووسیت‌ها از روش کی کیوچی و همکاران استفاده شد.[۱۲] به طور خلاصه در حدود ۵۰ مجموعه اووسیت- کومولوس به مدت ۲۰ تا ۲۲ ساعت در ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت بلوغ (NCSU)-37 که به آن مواد زیر انجام شده بود قرار گرفتند : ۱۰ درصد مایع فولیکولی خوک(v/v) و ۰/۶ میلی‌مول سیستئین، ۱ میلی‌مول dbcAMP (dibutyryl cyclic AMP)، ۵۰ میکرومول β- مرکاپتواتانل(Wako, Japan)، ۱۰ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر گنادوتروپین کوریونی اسب (Tokyo, Japan)،۱۰ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر گنادوتروپین کوریونی انسانی (Tokyo, Japan) و ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر جنتامایسین. مجموعه اووسیت- کومولوس دوباره در محلول NCSU-37 بدونdbcAMP و هورمون به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. تمام کشت‌ها در ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و در آنکوباتور مرطوب حاوی ۵ درصد گاز دی‌اکسیدکربن انجام شد.

IVF بر اساس روش کی‌کیوچی و همکاران با کمی تغییر انجام شد.[۱۲] اسپرم‌های تهیه شده از خوک که بر اساس روش یوجی و همکاران منجمد شده بودند، ذوب شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای

۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد درمحیط کشت TCM-199 حاوی املاح(Gibco, Earle's, NY, USA) که pH آن در ۷/۸ تنظیم شده بود، نگه‌داری شدند.[۱۳] ۱۰ میکرولیتر از اسپرم‌هایی که قبلاً در محفظه قرار گرفته بودند در ۹۰ میکرولیتر از محیط کشت لقاح که حاوی موارد زیر بود قرار گرفتند : ۹۰ میلی‌مول کلریدسدیم، ۱۲ میلی‌مول کلرید پتاسیم، ۲۵ میلی‌مول بیکربنات سدیم، ۰/۵ میلی‌مول سولفات‌سدیم، ۰/۵ میلی‌مول سولفات‌منیزیم، ۰/۵ میلی‌مول فسفات دی‌هیدروسدیم، ۱۰ میلی‌مول لاکتات سدیم، ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA,Sigma)، ۵ میلی‌مول کافئین (Sigma) و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین. غلظت نهایی اسپرم در حدود ۱×۱۰^{۶} در هر میلی‌لیتر تنظیم شد. اووسیت‌ها همراه با اسپرم‌ها به مدت ۵ ساعت در محفظه قرار گرفتند. سپس سلول‌های کومولوس و اسپرم‌های متصل به اووسیت‌های لقاح یافته به صورت مکانیکی با چند بار پیپت کردن جدا و به محیط کشت منتقل شدند. زایگوت‌های فرضی در محیط کشت NCSU-37 که ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA، ۰/۱۷ میلی‌مول پیروات سدیم، ۲/۷ میلی‌مول لاکتات‌سدیم و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین به آن اضافه شده بود، کشت داده شدند. ۷۲ ساعت پس از لقاح، تمام جنین‌های تقسیم یافته به محیط کشت تازه NCSU-37 که۴میلی‌گرم برمیلی‌لیتر BSA، ۵/۵۵ میلی‌مول D- گلوکز و۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین به آن اضافه شده بود، منتقل شدند. جنین‌های تقسیم یافته به مدت ۴ روز دیگر کشت داده شدند. بلاستوسیست‌های با ظاهر طبیعی در روز ۶ و۷ پس از لقاح انتخاب شدند و به منظور اجتناب از سوگیری در نمونه‌برداری، جنین‌های با اندازه مساوی به طور تصادفی در گروه‌های مورد مطالعه قرار گرفتند.

به منظور بررسی آسیب وارده به بلاستوسیست در طول قرار گرفتن جنین‌ها در معرض ضدیخ، بلاستوسیست‌ها در ۳ نوع محلول ضدیخ متفاوت قرار گرفتند. حلال مورد استفاده برای همه ضدیخ‌های مورد تحقیق، PBS(Gibco) بود که به آن ۰/۳ درصد BSA اضافه شده بود. جنین‌ها در محلول‌های ۱۰ درصد ضدیخ اتیلن گلیکول(v/v)، ۱و۲ پروپاندیول و گلیسرول (Wako, Japan) در یک روش سه مرحله‌ای در درجه حرارت اتاق (۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. به طوری‌که در ابتدا به مدت ۵ دقیقه در محلول ضدیخ ۳/۳ درصد و سپس به مدت ۵ دقیقه در محلول ضدیخ ۶/۶ درصد قرار گرفتند. در نهایت به مدت ۱ ساعت در محلول ضدیخ ۱۰ درصد در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار گرفتند. بعد از قرار گرفتن بلاستوسیست‌ها در غلظت نهایی از هر نوع ضدیخ، دوباره ضدیخ‌ها در یک روش سه مرحله‌ای از بلاستوسیست‌ها در درجه حرارت اتاق خارج شدند، به طوری که در ابتدا به مدت ۵ دقیقه در محلول ضدیخ ۶/۶ درصد و سپس به مدت ۵ دقیقه در محلول ضدیخ ۳/۳ درصد و در نهایت در محلول PBS بدون ضدیخ در درجه حرارت اتاق قرار گرفتند. وقتی بلاستوسیست‌های گروه تجربی در معرض محلول‌های افزایشی، تعادلی و کاهشی ضدیخ قرار می‌گرفتند، بلاستوسیست‌های گروه شاهد فقط در محلول PBS قرار گرفتند. بعد از خارج شدن ضدیخ، جنین‌ها در محیط کشتNCSU-37 که ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیترBSA، ۵/۵۵ میلی‌مول D- گلوکز و۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین به آن اضافه شده بود، در زیر روغن معدنی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت کشت، شواهد ریخت‌شناسی زنده ماندن بلاستوسیست‌ها، بر اساس تشکیل حفره بلاستوسل با مشاهده استریومیکروسکوپیک با بزرگ‌نمایی۴۰ ارزیابی شد.

رنگ آمیزی PI (Propidium Iodide) برای شمارش بلاستومرهای بلاستوسیست‌ها انجام شد.[۱۴] به طوری

که در ابتدا بلاستوسیست‌ها، پس از شستشو با محلول دالبکو بافرفسفات حاوی ۰/۳ درصد پلی‌وینیل الکل (PBS/PVA) در محلول پارافرمالدهید ۳۷ درصد (wako, Japan) درPBS به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت شدند. سپس بعد از شستشو با PBS/PVA، به مدت ۴۰ دقیقه در محلول ۰/۱ درصد تریتون X – ۱۰۰ (Sigma, Germany) به منظور افزایش نفوذپذیری پرده شفاف قرار داده شدند. برای نشانه‌گذاری همه هسته‌ها بلاستوسیست‌ها پس از شستشو با PBS/PVA، با ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محلول PI (Sigma, Germany) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشوی بلاستوسیست‌ها در محلول PBS/PVA با فشار کم لامل در یک قطره ۲۰ میکرولیتری از محلول antibleaching (Oregon, USA) بر روی لام مونتاژ شدند و پس از مهر و موم کردن لبه‌های لام با لاک ناخن، لام‌ها در زیر میکروسکوپ فلوئوروسنت (Olympus,Japan) مورد بررسی قرار گرفتند.

با توجه به محدودیت داده‌های خام به دست آمده، ابتدا از تبدیل Arcsin استفاده شد. سپس داده‌های تبدیل شده با آنالیز واریانس و آزمون تعقیبی فیشر با استفاده از برنامه Statview (Abacus Concepts, Inc, Berkeley, CA) تجزیه و تحلیل شدند. تفاوت‌ها در سطح ۰/۰۵ و کم‌تر از آن معنی‌دار تلقی شد.

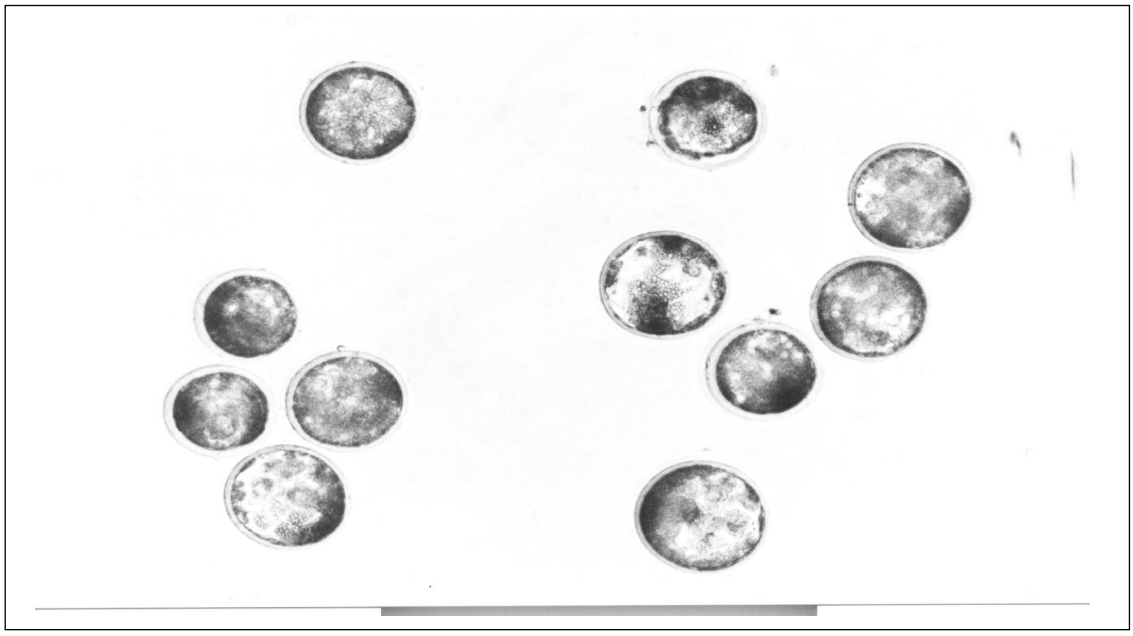
*** یافته‌ها :**

بلاستوسیست‌های زنده، دارای ظاهر طبیعی یعنی دارای بلاستوسل واضح بودند و اثری از ترک خوردگی و پارگی در پرده شفاف دیده نشد(شکل شماره ۱). تعدادی از جنین‌ها، در مدت ۲۴ ساعت کشت، هنوز چروکیده به نظر می‌رسیدند و برخی از جنین‌ها هم دارای شکستگی در پرده شفاف یا فاقد پرده شفاف بودند و در مطالعه حاضر، این بلاستوسیست‌ها، به عنوان جنین‌های مرده تلقی شدند. تعداد کل بلاستومرها در بلاستوسیست‌های گروه شاهد و گروه‌های مختلف ضدیخ تفاوت معنی‌داری نداشت (۱/۲± ۳۴/۴ ، ۱/۳± ۳۶/۴ ، ۱/۵± ۳۶/۴، ۲± ۳۸/۶). میزان زنده ماندن بلاستوسیست هایی که در معرض ضدیخ‌های PD و GLY قرار گرفته بودند و سپس به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند، به طور معنی‌داری(p>۰/۰۵) کم‌تر از بلاستوسیست‌های گروه شاهد بود(۴/۶ ±۴۲، ۸/۴±۳۴/۱ ، ۹/۱±۲۶ در مقابل ۷/۸±۵۹/۴). با این حال، تفاوت معنی‌داری در میزان زنده ماندن در بین گروه‌های شاهد و EG وجود نداشت (جدول شماره ۱).

جدول ۱- میزان زنده ماندن جنین های خوک پس از قرار گرفتن در معرض ضدیخ های مختلف به مدت ۱ ساعت

ضدیخ	تعداد جنین‌های مورد آزمایش	تعداد کل بلاستومرها	تعداد جنین‌های زنده مانده	درصد جنین‌های زنده مانده (خطای استاندارد± میانگین)
EG	۵۲	(۳۴/۴ ±۱/۲) ^{a,b}	۲۱	۴۲ ± ۴/۶
PD	۵۴	(۳۶/۴ ±۱/۳) ^{a}	۱۸	۳۴/۱ ± ۸/۴
GlY	۵۱	(۳۶/۴ ±۱/۵) ^{a}	۱۵	۲۶ ± ۹/۱
شاهد	۴۰	(۳۸/۶ ± ۲) ^{b}	۲۶	۵۹/۴ ± ۷/۸

a-b : مقادیر با حروف مختلف در یک ستون به طور معنی‌داری متفاوت هستند(p<۰/۰۵).



شکل ۱- تصویر بلاستوسیست‌های خوک از گروه شاهد که در آن همه بلاستوسیست‌ها دارای پرده شفاف سالم و دست نخورده بوده و بلاستومرها کاملاً فضای داخل پرده شفاف را اشغال کرده‌اند (بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر)

*** بحث و نتیجه‌گیری :**

این مطالعه نشان داد که مواجهه جنین‌های خوک با ضدیخ، میزان زنده ماندن را کاهش می‌دهد و EG کم‌ترین میزان سمیت را دارد. کاسایی و همکاران پس از قرار دادن جنین‌های مرحله مورولای موش در محلول‌های ۳۰ درصد ضدیخ در PBS (v/v) و بررسی میزان زنده ماندن جنین‌ها با ارزیابی پتانسیل تکامل آنها به بلاستوسیست در محیط کشت، نشان دادند که میزان زنده ماندن جنین‌های در معرض ضدیخ‌های مختلف به طور معنی‌داری کم‌تر از بلاستوسیست‌های گروه شاهد است و همچنین محققین فوق نشان دادند که EG کم‌ترین میزان سمیت را دارد و GLY و PD از نظر میزان سمیت بعد از آن قرار می‌گیرند.[۱۵]

در مطالعه حاضر میزان زنده ماندن جنین‌ها در گروه‌های PD و GLY به طور معنی‌داری کم‌تر از بلاستوسیست‌های گروه شاهد بود. با این حال تفاوت معنی‌داری از نظر میزان زنده ماندن در بین بلاستوسیست‌های گروه‌های شاهد و EG وجود نداشت. تاکاگی و همکاران نشان داده‌اند که قرار گرفتن بلاستوسیست‌های گاو (تولید شده به روش IVF) در معرض محلول‌های ۱۰ درصد ضدیخ‌های مختلف (EG، GLY و PD)، برای تکامل جنین‌ها مضر نیست.[۱۶] علت تفاوت نتایج محققین فوق با مطالعه حاضر از نظر میزان زنده ماندن جنین‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع جنین و غلظت محلول‌های ضدیخ باشد. طبق گزارش محققین، حساسیت جنین‌های خوک به دلیل دارا بودن میزان زیاد چربی، بیش‌تر از جنین گونه‌های دیگر است.[۲]

بررسی تأثیر انجماد شیشه‌ای بر روی میزان آپوپتوز و زنده ماندن جنین توسط نگارنده و همکاران نشان داد که وقتی بلاستوسیست‌های موش پس از فلاش شدن از لوله رحم بلافاصله به طریق انجماد شیشه ای با محلول EFS40 (اتیلن

گلیکول ۴۰ درصد، فایکل ۱۸ درصد و ساکارز ۰/۵مول) منجمد شده و به مدت یک ماه در محفظه حاوی نیتروژن مایع نگه‌داری و سپس ذوب شدند، پس از ۲ ساعت کشت در محیط M16، میزان زنده ماندن بلاستوسیست‌ها ۷۴/۱ درصد بود (در مقابل ۱۰۰ درصد در گروه شاهد).[۱۷] تفاوت در میزان زنده ماندن در تجربه قبلی نسبت به تجربه حاضر می تواند به دلیل تفاوت در نوع حیوان تحت تجربه، تفاوت درمدت زمان در معرض قرار گرفتن در ماده ضدیخ (۶۰ دقیقه در مقابل ۵ دقیقه) و بالاخره کیفیت بلاستوسیست باشد که در تجربه حاضر بلاستوسیست به روش Invitro تولید شده است. بر اساس گزارش محققین، کیفیت بلاستوسیست‌های تولید شده به روش Invitro به دلیل اثرات زیان‌بار محیط کشت بر روی جنین و فقدان ترشحات پاراکرینی مترشحه از اویداکت، پایین‌تر از کیفیت بلاستوسیست‌های تولید شده به روش Invivo است. بنابراین میزان زنده ماندن در بلاستوسیست‌های تولید شده به روش Invitro کم‌تر است.[۱۸] در ضمن تغییرات شدید برودتی و حرارتی نیز به دلیل اثرات نامطلوب بر فراساختمان سلول می‌تواند باعث کاهش میزان زنده ماندن سلول شود.[۱۹]

تحقیقات نشان داده است که استفاده از ضدیخ‌های مختلف به تنهایی یا طی فرایند انجماد، هرکدام می‌تواند تأثیرات زیادی را بر فراساختار سلول داشته باشد، اسکلت سلول، میتوکندری و پرده شفاف، حساس‌ترین ساختارها نسبت به غلظت‌های مختلف ضدیخ هستند.[۲۰] از آنجا که بسیاری از فعالیت‌های مهم سلول از جمله حرکت کروموزوم‌ها طی تقسیم و ستیوکنیزیس وابسته به عناصر اسکلت سلول هستند، هرگونه آشفتگی در آن می‌تواند تأثیر زیادی بر تکوین و تکامل تخمک و جنین داشته باشد.[۲۱] باتیستوتا معتقد است که پس از ذوب جنین و ورود آن به محیط کشت، ضدیخ‌هایی که هنوز از داخل جنین خارج نشده‌اند، می‌توانند از آن خارج و وارد محیط کشت شده و تعادل آن را بر هم بزنند. برهم خوردن تعادل محیط کشت و اثرات سمی ضدیخ موجود در آن می‌تواند سبب آسیب‌های جدی در جنین شود.[۲۲] لذا می‌توان گفت که در تجربه حاضر کاهش در میزان زنده ماندن جنین‌های خوک که در معرض ضدیخ‌های مختلف قرار گرفته بودند می‌تواند هم به دلیل اثر سمی ماده ضدیخ و هم به دلیل فشارهای اسموتیک باشد. به طوری که یافته‌های این مطالعه نشان داد که قرار گرفتن جنین‌های خوک در معرض ضدیخ‌های مختلف، به کاهش در میزان زنده ماندن پس از ۲۴ ساعت کشت خارج رحمی بدون توجه به نوع ضدیخ منجر می‌شود و EG کم‌ترین میزان سمیت را دارد.

* سپاسگزاری :

بدین وسیله از پروفسور سوزوکی استاد بخش تولیدمثل دانشگاه یاماگوچی ژاپن و اداره بازرسی گوشت شهر کیتاکیوشی ژاپن برای در اختیار گذاشتن تخمدان‌های خوک تشکر می‌شود.

* مراجع :

1. Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. Biol Reprod 1997; 56: 1088-96

2. Dobrinsky JR. Cryopreservation of pig embryos. J Reprod Fertil 1997; 52(Suppl): 301-3

3. Niemann H, Lucas-Hahn A, Stoffregen C. Cryopreservation of bovine oocytes and

embryos following microsurgical operations.
4. Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. Fertil Steril 1988; 49: 743-64
5. Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. Hum Reprod 2000 Apr; 15(4): 905-10
6. Bernard A, Fuller BJ. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. Hum Reprod Update 1996 May-Jun; 2(3): 193-207 (Review)
7. Kasai M. Cryopreservation of mamalion embryos. Mol Biotechnol. 1997 Apr, 7(2): 173-9
8. Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. Mol Reprod Dev 2003; 64: 245-50
9. Oda K, Gibbons WE, Leibo SP. Osmotic shock of fertilized mouse ova. J Reprod Fertil 1992; 95: 737-47
10. Pedro PB, Zhu SE, Makino N, Sakurai T, Edashige K, Kasai M. Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. Cryobiology 1997; 35: 150-8
11. Hochachka PW.Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science 1986; 231: 234-41
12. Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M, Kaneko H. Developmental competence, after transfer to

Mol Reprod Dev 1993 Oct; 36(2): 232-5
recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured in vitro. Biol Reprod 1999; 60:336-40
13. Yuge M, Otoi T, Nii M, Murakami M, Karja NW, Rajaei F, Agung B, Wongsrikeao P, Suzuki T. Effects of cooling ovaries before oocyte aspiration on meiotic competence of porcine oocytes and of exposing in vitro matured oocytes to ambient temperature on in vitro fertilization and development of the oocytes. Cryobiology 2003; 47(2): 102-8
14. Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. Biol Reprod 1997; 56: 1088-96
15. Kasai M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. Anim Reprod Sci 1996; 42: 67-75
16. Takagi M, Sakonju L, Otoi T, Hamana K, Suzuki T. Post-thaw viability of the inner cell mass of in vitro-matured/in vitro-fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants. Cryobiology 1994; 31: 398-405
۱۷. رجایی ف، سلیمانی‌راد ج، نیک‌نفس ب، غفاری م. اثرات انجماد شیشه‌ای بر میزان آپوپتوز در مرحله بلاستوسیست. فصلنامه پزشکی باروری و ناباروری، زمستان ۱۳۸۲، سال پنجم، ۱، ۲۲-۱۴
18. Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. Mol Hum Reprod 1997; 3: 919-92
19. Brison DR, Schultz RM. Increased incidence of apoptosis in transforming

20. Kasai M, Ito K, Edashige K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. Hum Reprod 2002 Jul; 17(7): 1863-74

22. Bautista JA, Kanagawa H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. Jpn J Vet Res 1998; 45(4): 183-91

21. Bernard A, Fuller BJ. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. Hum Reprod Update 1996 May-Jun; 2(3): 193-207 (Review)

growth factor alpha-deficient mouse blastocysts. Biol Reprod 1998; 59: 136-44