فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول - مقدمه ۶

فصل دوم - کلیات ۸

۲-۱- علم زیست شناسی انجماد ۸
۲-۲- اساس سرد کردن و نگهداری در شرایط انجماد ۸
۲-۳- انواع روش های انجماد ۹
۲-۳-۱- انجماد آهسته ۹
۲-۳-۱-۱- اساس انجماد آهسته ۹
۲-۲-۲- انجماد سریع ۱۰
۲-۳-۳- انجماد شیشه ای ۱۰
۲-۳-۳-۱- انجماد شیشه ای در طبیعت ۱۱
۲-۴- عوامل تکنیکی موثر در انجماد شیشه ای ۱۱
۲-۴-۱- زمان تعادل و آبگیری ۱۱
۲-۴-۲- سرعت سرد کردن ۱۲
۲-۴-۳- سرعت گرم کردن ۱۳
۲-۴-۴- ترکیب مناسب محلول انجماد ۱۳
۲-۴-۴-۱- نقش ضدیخ ها ۱۳
۲-۴-۴-۲- اجزای محلول انجماد ۱۴
۲-۴-۵- ظرف حامل جهت انجماد شیشه‌ای ۱۸
۲-۵- انجماد تخمک ۱۸
۲-۵-۱- گذشته و آینده انجماد تخمک ۱۸
۲-۵-۲- کاربرد انجماد تخمک ۱۹
۲-۵-۳- چه عواملی تخمک را به عنوان یک تیپ سلولی مشکل جهت انجماد معرفی می‌کند؟ ۲۰
۲-۵-۴- اثرات انجماد روی تخمک ۲۱
۲-۵-۴-۱- اثر روی میکروتوبول‌ها، سیتواسکلت و آرایش کروموزم‌ها ۲۱
۲-۵-۴-۲- فعال سازی پارتنوژنیک تخمک ۲۲
۲-۵-۴-۳ - اثر روی گرانول‌های کورتیکال و سختی زونا پلوسیدا (Zona hardening) ۲۲
۲-۵-۴-۴- آسیب به ساختار غشای پلاسمایی تخمک ۲۳
۲-۵-۴-۵- آسیب در طول ذخیره در دماهای پایین و ذوب ۲۴
۲-۶- انجماد تخمک در مراحل مختلف تکاملی ۲۴
۲-۷- انجماد تخمک، آزمون‌ها و نتایج ۲۶
۲-۸- تولید جنین در شرایط *In vitro* ۲۶
۲-۸-۱- بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) ۲۷
۲-۸-۲- ظرفیت پذیری اسپرم ۲۹

۲-۸-۳- لقاح آزمایشگاهی (IVF)..... ۳۰
۲-۸-۴- کشت رویان در آزمایشگاه (IVC)..... ۳۱
۲-۹- چگونگی بیان ژن در رویان..... ۳۲
۲-۹-۱- ژن HMGN3a..... ۳۳
۲-۹-۲- ژن SMARCAL..... ۳۳
۲- ۱۰- واکنش زنجیره ای پلیمراز..... ۳۴
۲-۱۰-۲- الکتروفورز..... ۳۵
۲-۱۱- Real time PCR..... ۳۶
۲-۱۱-۱- منبع نور..... ۳۶
۲-۱۱-۱-۱- لیزر یون آرگون..... ۳۶
۲-۱۱-۱-۲- لیزر LED..... ۳۷
۲-۱۱-۱-۳- لامپ کوارتز– هالوژن- تنگستن..... ۳۷
۲-۱۱-۱-۴- لامپ گزنون..... ۳۷
۲-۱۱-۲- نرم افزار دستگاه Real time PCR..... ۳۸
۲-۱۱-۳- رنگ اینترکاله..... ۳۸

فصل سوم - مواد و روش کار..... ۳۹

۳-۱- تولید آزمایشگاهی جنین گوسفند (IVP)..... ۳۹
۳-۱-۱- جمع‌آوری تخمدان‌ها از کشتارگاه..... ۳۹
۳-۱-۲- آسپیره کردن فولیکول‌ها و استحصال تخمک‌ها..... ۳۹
۳-۱-۳- بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها(IVM)..... ۴۰
۳-۱-۴- آماده سازی اسپرم و لقاح داخل آزمایشگاهی(IVF)..... ۴۰
۳-۱-۴-۱- استفاده از شیب غلظت پرکل (Swim down)..... ۴۰
۳-۱-۵- آماده سازی تخمک‌ها به منظور انجام IVF..... ۴۲
۳-۱-۶- لقاح داخل آزمایشگاهی(IVF)..... ۴۲
۳-۱-۷- کشت داخل آزمایشگاهی رویان‌های حاصل ازIVF..... ۴۳
۳-۲- انجماد تخمک..... ۴۳
۳-۲-۱- تهیه محلول‌های انجمادی..... ۴۴
۳-۲-۱-۱- محیط پایه..... ۴۴
۳-۲-۱-۲- محیط‌های انجماد..... ۴۴
۳-۲-۱-۳- محیط‌های ذوب..... ۴۴
۳-۲-۲- انجماد تخمک در مرحله تکاملی MII..... ۴۴
۳-۲-۳- ذوب تخمک‌های منجمد شده..... ۴۵
۳-۲-۴- هم‌کشتی رویان‌ها..... ۴۵
۳-۳- اندازه گیری بیان ژن..... ۴۵
۳-۳-۱- استخراج و خالص سازی total RNA رویان..... ۴۵

۳-۳-۲- Real Time PCR ۴۶
۳-۳-۲-۱- طراحی و توالی پرایمرهای مورد استفاده ۴۸
۳-۳-۲-۲- تنظیم و بهینه سازی غلظت پرایمرها ۴۸
۳-۳-۳- پرایمر دایمر ۴۸
۳-۳-۴- آنالیز داده‌های کمی ۴۹
۳-۳-۴-۱- ارزیابی نسبی داده‌ها ۴۹
۳-۳-۴-۲- آنالیز کمی نسبی داده‌ها ۴۹
۳-۳-۴-۳- منحنی تکثیر ۵۰

فصل چهارم - نتایج ۵۲

۴-۱- منحنی تفکیک (منحنی ذوب) ۵۲
۴-۲- تعیین میزان بیان ژن در نمونه‌ها ۵۳

فصل پنجم - بحث ۵۷

منابع ۶۲

فهرست شکل ها

عنوان **شماره صفحه**

شکل ۲-۱ اتیلن گلیکول ۱۵
شکل ۲-۲ گلیسرول ۱۵
شکل ۲-۳ دی متیل سولفوکسید ۱۶
شکل ۲-۴ پروفایل یک سیکل حرارتی سه مرحله‌ای ۳۵
شکل ۳-۱ باند های HMGN3a، SMARCAL1 و GAPDH در ژل الکتروفورز ۴۷
شکل ۳-۲ مقایسه منحنی پرایمر دایمر و محصولات تکثیر یافته ۴۹
شکل ۳-۳- فازهای منحنی تکثیر ۵۰
شکل ۴-۱ منحنی تفکیک ژن GAPDH ۵۲
شکل ۴-۲منحنی تفکیک ژن HMGN3a ۵۳
شکل ۴-۳ منحنی تفکیک ژن SMARCAL1 ۵۳
شکل ۴-۴ منحنی تکثیر ژن GAPDH در نمونه‌ها ۵۳
شکل ۴-۵ منحنی تکثیر ژن HMGN3a ۵۴
شکل ۴-۶- منحنی تکثیر SMARCAL1 ۵۴
شکل ۴-۷ باندهای HMGN3a, GAPDH و SMARCAL1 حاصل ازالکتروفورز ۵۴
شکل ۴-۸ میزان بیان نسبی HMGN3a در رویان های حاصل از تخمک منجمد شده و تازه ۵۵
شکل ۴-۹ میزان بیان نسبی SMARCAL1 در رویان های حاصل از تخمک منجمد شده و تازه ۵۶

فهرست جدول ها

عنوان **شماره صفحه**

جدول ۲-۱ خصوصیات شیمیایی اتیلن گلیکول و گلیسرول در مقایسه با آب ۱۶
جدول ۲-۲ فاکتور های مؤثر بر حساسیت نسبت به آسیب های حاصل از انجماد ۲۵
جدول ۲-۳ اولین زایش های حاصل از رویان های منجمد شده ی تخمک پستانداران ۲۶
جدول ۳-۱ ترکیبات محیطیHEPES buffered M199 ۴۰
جدول ۳-۲ ترکیبات محیطیBicarbonate buffered M199 ۴۰
جدول ۳-۳ ترکیبات محیطی Medium A ۴۱
جدول ۳-۴ ترکیبات محیط S-TALP ۴۱
جدول۳-۵ ترکیبات محیطیH-SOF ۴۲
جدول۳-۶ IVF medium “Fert. TALP ۴۲
جدول ۳-۷ ترکیبات محیطIVC- SOF ۴۳
جدول ۳-۸ توالی پرایمر های طراحی شده ۴۸
جدول ۴-۱ میزان بیان نسبی HMGN3a در رویان های حاصل از تخمک منجمد شده و تازه ۵۵
جدول ۴-۲ میزان بیان نسبی SMARCAL1 در رویان های حاصل از تخمک منجمد شده و تازه ۵۶

فصل اول

مقدمه

با توجه به پیشرفت‌های چشمگیری که در علم زیست شناسی انجماد (Cryobiology) صورت گرفته بشر توانسته است از روش‌های متنوعی در نگهداری سلول‌های جنسی و جنین بهره ببرد [۴۴، ۲۲]. نگهداری از تخمک و بافت تخمدان یکی از اهداف طولانی مدت محققان بوده است. نگهداری و ذخیره موفق اجزای تولید مثلی در جنس ماده اهمیت بالایی در فناوری مرتبط با ارتقاء تولید مثل (Assisted Reproductive Technology) داشته است و به زنانی که به علت جراحی و یا دیگر روشهای شیمی درمانی دچار اختلال در عملکرد غدد جنسی می‌گردند کمک می‌کند تا پتانسیل تولید مثل خود را حفظ نموده و از طرفی کاربرد این روش در زمینه ی تولید مثل انسان به دلیل فشارهای قانونی و اختلافاتی که در مورد انجماد جنین مطرح است، بسیار مورد توجه قرارگرفته است [۱۷۵].

پیشرفت در زمینه نگهداری و انجماد تخمک و تخمدان موجبات حفظ بهتر گونه های جانوران آزمایشگاهی و حیوانات اهلی را فراهم نموده و باعث پیشرفت حفاظت از تنوع زیستی، که گونه های در معرض انقراض را نیز شامل می شود، گردیده است نگهداری تخمک این گونه های کمیاب در شرایط انجماد اجازه می دهد تا تخمک‌های آن ها را تا زمان ارتقای تکنیک‌های تولید مثل (ART) حفظ نمود [۵۳].

خوشبختانه امروزه انجماد جنین کمک شایانی به افراد نابارور می کند. اما موفقیت در انجماد تخمک با توجه به شرایط خاص سلول و حساسیت بیش از حد آن نسبت به شوک های حرارتی و برودتی بسیار پایین بوده است و تا کنون گزارشات کمی در ارتباط با انجماد موفق تخمک انسان به دست آمده است [۶۲]. معنای لغوی انجماد شیشه‌ای، انجماد یک محلول در دمای پایین بدون ایجاد کریستال یخ است. این پدیده می‌تواند به دلیل افزایش بسیار زیاد چسبندگی محیط و سرعت انجماد بسیار بالا (طبق محاسبات تئوری در شرایط افت درجه حرارتی در حدود ۱۰۷ درجه سانتی‌گراد در ثانیه هر آب خالصی دچار انجماد شیشه‌ای می‌شود) و یا استفاده از محلول ضد یخی که در دمای پایین ایجاد کریستال یخ را کاهش داده و چسبندگی را زیاد می‌نماید، رخ دهد [۱۳۱]. به عبارتی دیگر می‌توان گفت روندی که در آن یک محلول یا نمونه برای تشکیل یک محیط شبیه شیشه بدون تشکیل هیچگونه کریستال یخ در طول سرد کردن منجمد شده و نیز در طول گرم کردن در این وضعیت بماند را روند انجماد شیشه‌ای گویند [۱۴۰].

مطالعات انجام شده توسط Succu و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در خصوص بررسی تاثیر انجماد شیشه ای تخمک های بالغ شده گوسفندی در شرایط آزمایشگاهی بر روی ظرفیت تکاملی تخمک و رویان های حاصله و

نیز الگوی بیان و فراوانی نسبی رونوشت ژن های مسئول در بلوغ تخمک و تکامل رویان، مؤید تاثیرات منفی روند انجماد شیشه ای و ذوب بر روی الگوی بیان ژن ها در رویان و تخمک می باشد. [۱۴۶].

باتوجه به اثرات منفی انجماد بر محتوای رونویس‌های مرتبط به فعالیت های حیاتی و توانایی تکاملی سلول ها و عدم کارایی روش های مطرح در خصوص انجماد تخمک پستانداران بویژه درگونه گوسفند، هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر فرایند انجماد- ذوب (Vitrification-Warming) در بیان برخی از عوامل پروتئینی دخیل در بازآرایی (Remodeling) کروماتین در جنین های حاصل از تخمک های منجمدشده (با استفاده از روش انجماد شیشه ای) گوسفندی می باشد. [۱۴۷].

در این پژوهش میزان بیان ژن‌های HMGN3a وSMARCAL1 در مراحل مختلف رویانی در رویان‌های حاصل از تخمک منجمد و تخمک تازه با استفاده از دستگاه Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ژن HMGN3a در Remodelling و باز نمودن ساختار متراکم کروماتین ایفای نقش نموده و از این طریق باعث افزایش دسترسی عوامل رونوشت برداری به نوکلئوزوم و تقویت نسخه برداری می شود. انجام این رخداد در رشد و نمو اولیه رویان ضروری می باشد [۱۶۸، ۱۶۶، ۱۵۱، ۱۱۵، ۴۲، ۳۴]. این ژن، در شروع و ادامه ی روند رونویسی ونسخه برداری نیزموثر می باشد [۱۴۲]. نقش عمده HMGN3a، بازآرایی DNA، باز نمودن کروماتین، تقویت رونویسی و نسخه برداری، تنظیم بیان ژن، تکثیر و تمایز سلولی در طی مرحله ی نمو رویانی است [۱۶۸، ۱۲]. ژن SMARCAL1 نیز مشابه HMGN3a در بازآرایی کروماتین موثر بوده و با تغییر در فشردگی نوکلئوزوم باعث اصلاح DNA و باز شدن کروماتین و ترغیب رونویسی می شود [۱۶۷]. این ژن در تکثیر و تمایز سلولی نیز نقش دارد [۱۸۲]. SMARCAL1 یک جزء پاسخگو در برابر آسیب ها ی DNA بوده و در برابر این آسیب ها فسفریله می شود. به نظر می رسد اختلال در فرایند رونویسی و نسخه برداری در غیاب این ژن محتمل تر است [۱۴۶].

فصل دوم

کلیات

۲-۱- علم زیست شناسی انجماد:

زیست شناسی انجماد، مطالعه تأثیر دمای پایین بر زندگی ارگانیسم‌ها است. مردم تا مدت‌ها تصور می‌کردند که دمای خیلی پایین تنها تأثیر منفی بر سلول‌ها و بافت‌ها دارد. آن‌ها نمی‌توانستند تصور کنند که چنین پیشرفت‌هایی در زیست شناسی انجماد حاصل شود و امکان نگهداری سلول‌ها در شرایط انجماد (Cryopreservation)، همه اندام‌ها نظیر کلیه، قلب و کبد جهت انجام پیوندهای بعدی، نگهداری قرنیه و سایر بافت‌های ظریف با حداقل آسیب و امکان انتقال آن به همه جای دنیا فراهم شود.

تاریخچه زیست شناسی انجماد به اواخر قرن ۱۶ باز می‌گردد. Power یک جام از مارماهی سرکه را در آب نمک منجمد کرد و بعد از ذوب متوجه شد که هنوز مانند قبل از انجماد فعال است. Power اولین کسی بود که این نظریه را ارائه کرد که سرما برخلاف آن چه که گفته می‌شود، مرگ آور نیست. Boyle رساله‌ای تحت عنوان "تجربه و مشاهده جدید تأثیر سرما" در سال ۱۶۸۳ نوشت که در آن تأثیر انجماد بر روی حیوانات زنده تشریح شد. از دیگر پیشگامان در زیست شناسی انجماد Spallanzani بود که مطالعات ارزشمند بسیاری را در مورد بافت‌های گونه‌های مختلف و واکنش آن‌ها در برابر دمای پایین در اواخر قرن ۱۷ انجام داد. در سال ۱۹۴۰ Father، Luyet و Gehenio کتابی با نام زندگی و مرگ در دمای پایین" منتشر کردند که در آن اساس مطالعات زیست شناسی انجماد را پایه‌ریزی کردند [۸۷].

۲-۲- اساس سرد کردن و نگهداری در شرایط انجماد:

نگهداری در شرایط انجماد شامل پنج مرحله حیاتی است:

الف. در معرض ضد یخ قرار دادن سلول و یا بافت‌ها

ب. سرد کردن نمونه تا دمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد

ج. ذخیره در دمای شیشه‌ای شدن آب در زیر ۱۳۰- درجه سانتی گراد

د. گرم و ذوب کردن و رقیق‌سازی و حذف ضد یخ [۹۷، ۸۸، ۸۱، ۸۰].

۲-۳- انواع روش های انجماد:

سه روش متفاوت جهت انجماد سلول‌های پستانداران وجود دارند: روش متداول انجماد آهسته، سریع و روش انجماد شیشه‌ای. اگر چه این روش ها تفاوت هایی با یکدیگر دارند، لیکن هر کدام می توانند نتایج موفقیت‌آمیزی در انجماد سلول‌های پستانداران داشته باشند. موفقیت در انجماد به انتخاب روش مطلوب‌تر برای هر نوع سلول بستگی دارد. در هر روش انجمادی مسلماً مزایا و معایبی هست اما جهت ارزیابی آن‌ها باید مکانیسم هر کدام از این روش‌ها را درک کرد.

۲-۳-۱- انجماد آهسته:

انجماد آهسته شامل استفاده از غلظت‌های پایین ضد یخ (۲-۱ مول) افزوده شده به محیط کشت سلول و سرعت نسبتاً پایین سرد کردن (۱-۰/۱ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه) است. سلول‌ها در طول روند انجماد آهسته آبگیری می‌شوند. آسیب‌های سلولی نیز ممکن است در طول انجام کار در اثر شوک اسمزی، تشکیل کریستال یخ و یا سمیت ضدیخ‌ها رخ دهند. این روش به طور وسیعی جهت انجماد تخمک و جنین‌های موش، گاو و انسان استفاده می‌شود. تخمک یا جنین ابتدا در ۲-۱ مول ضد یخ حل شده در محلول فیزیولوژیک که غالباً این محیط(Phosphate Buffered Saline (PBS تعدیل شده است، در دمای اتاق قرار گرفته سپس به نمونه جهت نفوذ کامل ضد یخ و خروج آب از داخل آن فرصت کافی داده می‌شود، پس از آن جنین یا تخمک در نی‌های مخصوص انجماد و یا کرایوتیوب‌های (Cryotube) مخصوص این کار قرار می‌گیرند. در دمای حدود ۵- درجه سانتی‌گراد تشکیل یخ القا می‌شود و نمونه به آهستگی (۰/۵-۰/۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه) تا دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد سرد و پس از آن در نیتروژن مایع ذخیره می‌شود. مرحله سرد کردن آهسته در جلوگیری از تشکیل یخ داخل سلولی ضروری به نظر می‌رسد. در نیتروژن مایع سیتوپلاسم در یک وضعیت فراسرما شیشه‌ای می‌شود. از آن‌جایی‌که محلول فراسرما شده می‌تواند در طول مرحله ذوب و در دماهای بین۴۰- و ۹۰- درجه سانتی‌گراد دوباره شیشه‌ای شود، نمونه ها باید خیلی سریع در این محدوده دمایی گرم شوند. نمونه گرم شده توسط یک محلول هیپرتونیک (hypertonic) محتوی ساکارید نفوذناپذیر (معمولاً ساکاروز) قبل از این که در یک محلول فیزویولوژیک قرار گیرد، رقیق شود [۱۳۲].

۲-۳-۱-۱- اساس انجماد آهسته:

مهمترین فاکتور محدود کننده در انجماد آهسته سرعت است که در آن آب و ضد یخ فرصت عبور از غشای سلول را می یابند. این مسأله خود به ترکیبات غشای سلول، نفوذ پذیری وابسته به دمای غشای سلول به آب و ضد یخ و نسبت سطح به حجم نمونه وابسته است [۵۳].

مراحل انجماد آهسته عبارتند از:

الف. آب گیری تخمک و یا جنین با استفاده از ترکیب حاوی ضد یخ و به تعادل رساندن آن

ب. سردکردن نمونه تا برودت زیر صفر درجه سانتی گراد

ج. القای یخ زدگی در برودت نزدیک ۷- درجه سانتیگراد و تشکیل یخ خارج سلولی

د. نگهداری در نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتیگراد)

ذ. ذوب نمونه و رقیق کردن محیط به منظور خارج ساختن ضد یخ از سلول

در مراحل انجماد و ذوب ساختمان سلولی نمونه باید حفظ شود و صدمات وارد شده به سلول در اثر تشکیل کریستال های یخ داخل سلولی به حداقل برسد. بنابراین پیش از انجماد و یا در مرحله سرد شدن نمونه، باید آب داخل سلولی را خارج کرد و میزان آن را به حداقل رسانید. آب داخل سلولی را می توان به چند روش خارج کرد:

الف. با استفاده از محلول غلیظ ضد یخ

ب. با القای یخ زدگی که باعث تشکیل کریستال های یخ خارج سلولی می شود در این حالت به علت کم شدن مقدار زیادی از آب خارج سلول در اثر تشکیل کریستال یخ، محیط اطراف نمونه غلیظ تر شده و غلظت نمک ها و املاح افزایش می یابد که خود کمک موثری به خروج آب از سلول می کند. در اغلب روش های انجماد آهسته، جهت القای یخ زدگی محلولی را که نمونه در آن قرار گرفته، به طور دستی در دمای حدود ۵- تا ۷- درجه سانتیگراد وادار به یخ زدن می کنند. به این منظور بخشی از محلول را به شدت سرد می کنند به طوری که آب در آن نقطه یخ زده و سپس به کندی به سایر نقاط سرایت می کند. متداول ترین روش، استفاده از گیره فلزی است که از پیش در دمای ۱۹۶- درجه سانتیگراد سرد شده است. با نزدیک کردن چنین گیره ای به نی انجماد حاوی نمونه، یخ زدن در آن القا می شود [۱۵۲].

۲-۲-۲- انجماد سریع (Ultrarapid freezing):

در مقایسه با روش انجماد شیشه ای در این روش کریستال یخ داخل و خارج سلولی تشکیل می شود. یکی از ضروریات انجماد سریع موفق حضور یک ضد یخ نفوذ پذیر نظیر گلیسرول ویک ضد یخ نفوذ ناپذیر در ترکیب با آن همچون ساکاروز می باشد. غلظت مطلوب این مواد بین ۲ و ۳/۵ مول برای گلیسرول و ۰/۲۵ تا ۰/۵ مول ساکاروز است. به نظر می رسد که همانند انجماد شیشه ای، تعدیل کردن جنین ها در محیط حاوی غلظت‌های بالای ضد یخ ها اهمیتی حیاتی برای حفظ قابلیت بقای جنین دارد.

امروزه روش‌هایی برای انجام روند انجماد سریع به کار گرفته می‌شود که می‌توان از آن‌ها به عنوان روش‌های انجماد شیشه‌ای فوق سریع نام برد در انجماد شیشه‌ای فوق سریع ضرورتاً جنین‌ها توسط یک روند مشابه روش متداول انجماد شیشه‌ای منجمد می‌شوند. در این روش حجم محیط انجماد شیشه‌ای با به‌کارگیری ابزارهای مختلف به حداقل کاهش می‌یابد. به عنوان مثال جنین‌ها بر روی یک توری میکروسکوپ الکترونی، کرایولوپ (Cryolope)، OPS (Open pulled straw) و ... قرار می‌گیرند و یا بدون هیچگونه ظرف حاملی (به صورت یک قطره بسیار کوچک) منجمد می‌شوند. هدف از این رهیافت، سرد و گرم کردن جنین‌ها در چند لحظه با به حداقل رسانیدن حجم مورد نیاز محلول انجماد شیشه‌ای است. این رهیافت جدید خصوصاً برای جنین‌هایی که نفوذ پذیری پایینی داشته و در نتیجه ممانعت از تشکیل یخ داخل سلولی در آن‌ها آسان نیست، مؤثر است [۵۳].

۲-۳-۳- انجماد شیشه ای:

در سال ۱۹۳۷Luyet استفاده از روش انجماد شیشه‌ای را در انجماد بافت‌ها شرح داد [۸۷].

روش انجماد شیشه‌ای شامل استفاده از غلظت بالای ضد یخ (۷-۵ مول) و سرعت خیلی بالای سرد کردن (۲۵۰۰۰-۲۰۰۰ درجه سانتی گراد بر دقیقه) است. Rall آورده است که هر آبی در سرعت سرد کردن ۱۰۷

درجه سانتیگراد بر دقیقه می تواند شیشه ای شود. سلول ها زمانی که در معرض غلظت بالای ضد یخ قرار می‌گیرند آبگیری می‌شوند. سلول های معلق در ضد یخ زمانی که مستقیماً در نیتروژن مایع غوطه ور می‌شوند یک محیط شبیه شیشه را تشکیل می دهند. این تکنیک یخ داخل سلولی را کاملاً حذف می کند. با این وجود سلول ها ممکن است در اثر مجاورت با غلظت خیلی بالای ضد یخ آسیب ببینند [۱۲۷].
استراتژی انجماد شیشه‌ای حذف کلی تشکیل یخ و سپس تلاش برای کاهش سمیت و تغییرات اسمزی است. روند فیزیکی انجماد شیشه‌ای را می توان به صورت انجماد سازی شبیه شیشه محلول‌ها در دمای پایین بدون تشکیل یخ تعریف کرد. این پدیده می‌تواند با افزایش غلظت و یا افزایش سرعت انجماد و ذوب به دست آید. فاکتورهای دیگر تسهیل کننده انجماد شیشه‌ای کاهش حجم محلول‌ها و افزایش فشار هیدروستاتیک می‌باشند. هر چند مورد آخر اهمیت عملی خیلی کمی در جنین شناسی دارد.
در سال ۱۹۸۵ انجماد جنین موش بدون تشکیل کریستال یخ دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد با روش انجماد شیشه‌ای گزارش شد. تقریباً ۸ سال بعد انجماد شیشه‌ای موفق جنین موش به اثبات رسید. در سال ۱۹۹۶ Martino و همکاران نشان دادند که در استفاده از سرعت بالای انجماد، تخمک گاو بعد از انجماد شیشه‌ای هنوز توانایی رشد و تکامل تا مرحله بلاستوسیست را دارد. با معرفی OPS در سال ۱۹۹۷ انجماد شیشه‌ای موفق جنین های تولید شده در شرایط آزمایشگاهی گاو در مراحل اولیه جنینی گزارش شد [۱۳۰، ۹۳].

۲-۳-۳-۱- انجماد شیشه ای در طبیعت:

از آن جایی که ارگانیسم های زنده حاوی مقدار زیادی آب هستند، وجود ضد یخ در این ارگانیسم ها در زمان انجماد اجتناب ناپذیر است. تعدادی از دوزیستان و حشرات توانایی تحمل انجماد را دارند هرچند میزان تحمل آن ها متفاوت است. کرم ابریشم پرزدار ممکن است ده ماه از سال را که دما ممکن است تا ۵۰- درجه سانتی‌گراد کاهش یابد، به صورت منجمد سپری کند. گونه هایی از دوزیستان قادرند روزها و یا هفته هایی را با تبدیل ۶۵ درصد آب کل بدن به یخ، بگذرانند. بعضی از دوزیستان از خود با گلیسرول تولید شده در کبدشان محافظت می کنند. گلیسرول ضد یخی است که تشکیل یخ را کاهش داده و نقطه انجماد را پایین می آورد. قند گلوکز هم یک ضد یخ است به طوری که قورباغه قطبی نوعی انسولین دارد که آزاد سازی گلوکز و جذب داخل سلولی آن را در دمای نزدیک به انجماد تسریع می کند. در گیاهان نیز مشخص شده است که فرایند انجماد شیشه‌ای جهت حفاظت در مقابل سرما در بعضی گیاهان قطب شمال رخ می‌دهد. به هر حال انجماد شیشه ای به دلیل ارزان تر بودن، عدم نیاز به تجهیزات انجماد و سریع و آسان تر بودن نسبت به روش انجماد آهسته سودمند تر است [۱۰۹، ۵۷].

۲-۴- عوامل تکنیکی موثر در انجماد شیشه ای:

۲-۴-۱- زمان تعادل و آبگیری:

آبگیری سلول‌ها در انجماد بسیار مهم است. آسیب‌های احتمالی سلول اغلب در دمای بین ۱۵- و ۹۰- درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهند. اگر سلول کاملاً آبگیری نشود زمانی‌که دما به پایین تر از صفر درجه سانتی‌گراد برسد؛ یخ داخل سلولی تشکیل می‌گردد [۱۳۵].

زمان مطلوب تعادل و آب‌گیری وابسته به دماست. نفوذپذیری و سمیت هر دو در دماهای بالا افزایش می‌یابند. به‌طور کلی در فرایند انجماد شیشه‌ای تماس کوتاه مدت نمونه با محلول انجماد مطلوب‌تر است و بر خلاف انجماد آهسته هر نی انجماد به تنهایی سرد می‌شود [۱۵۶]. همچنین زمان تعادل وابسته به خصوصیات نفوذپذیری سلول‌های مورد مطالعه است. نفوذپذیری جنین به ضد یخ در طی مراحل تکامل، به‌طور قابل ملاحظه‌ای تغییر می‌کند. نشان داده شده است که میزان حیات مراحل مختلف تکاملی نمونه با محلول یکسان، متفاوت است [۳۷]. برای اجتناب از سمیت محلول انجماد شیشه‌ای بایستی زمان تعادل جنین با محلول کوتاه باشد. باید توجه داشت اگر این مدت زمان خیلی کوتاه باشد نفوذپذیری ضد یخ کافی نبوده و یخ داخل سلولی تشکیل می‌شود، حتی اگر یخ خارج سلولی وجود نداشته باشد. بنابراین زمان مطلوب تعادل بایستی به گونه‌ای باشد که از یک طرف مانع آسیب ناشی از اثرات سمی به علت طولانی شدن زمان تعادل و از طرف دیگر مانع تشکیل یخ داخل سلولی شود. همچنین زمان تعادل وابسته به نوع و غلظت محلولی است که مورد استفاده قرار گرفته است. هر چه نفوذپذیری محلول بیشتر باشد زمان لازم برای تعادل کوتاه تر خواهد بود [۶۵].

۲-۴-۲- سرعت سرد کردن:

سرعت انجماد یکی از معیارهای اصلی بقای سلول در زمان انجماد است. سرعت انجماد خیلی آهسته ممکن است سلول‌ها را به خاطر مواجهه طولانی مدت با یک محلول غلیظ از بین ببرد. به‌علاوه سرمادهی خیلی آهسته می‌تواند باعث مرگ سلولی با تشکیل کریستال یخ شود. Mazur معتقد است که ارتباط بقای سلول و سرعت انجماد می تواند به صورت منحنی زنگی شکل باشد. اساساً بقای سلول در سرمادهی با سرعت کم، پایین است، در میزان کمی بالاتر از حد متوسط افزایش می‌یابد و نهایتاً در سرمادهی با سرعت بالا کاهش می‌یابد. نفوذ پذیری ضد یخ‌ها نیز با تغییر دما، تغییر می‌یابد [۹۷، ۹۶، ۷۷].

زمانی‌که سلول‌ها در محلولی تا دمای زیر صفر درجه سرد می‌شوند کریستال‌های یخ ابتدا در محلول خارج سلولی شکل گرفته و سیتوپلاسم سلول دچار فرا سرما (Supercooling) می‌شود. چنانچه سیتوپلاسم سلول تا دمای پایین‌تر سرد شود (زیر ۱۰- یا ۱۵- درجه سانتی‌گراد) کریستال‌های یخ ممکن است به طور ناگهانی در خود سیتوپلاسم تشکیل شوند. این رخداد اغلب و نه مطلقاً برای سلول مرگ‌آور است. اگر سلول‌هایی که داخل آن‌ها منجمد شده‌است خیلی گرم شدند سلول ممکن است از آسیب رهایی یابد. در مقابل در انجماد شیشه‌ای سلول‌ها، در غلظت بالای محلول ضد یخ سرد می شوند و تحت سرعت انجماد بالا قرار می‌گیرند که باعث می‌شود کریستال یخ داخل سلولی تشکیل نشود [۹۷].

انجماد شیشه ای آب اطراف سلول می تواند به دو روش به دست آید: الف- افزایش سرعت انجماد ب- افزایش غلظت ضد یخ که در مجموع با استفاده از حجم پایین یک محلول حاوی ضد یخ غلیظ، این سرعت انجماد خیلی بالا که از ۱۵۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ درجه سانتیگراد بر دقیقه است، به دست می آید ($\Delta T = -196\ ^{o}c$ - 25 ^{o}c = 221 ^{o}c/0.5 sec = 26520 ^{o}c/min).

از آن جایی که دو فاکتور خیلی مهم برای انجام انجماد شیشه ای موفق سرعت انجماد بالا و غلظت بالای ضد یخ می باشند، بنابراین ایجاد توازن بین به حداکثر رسانیدن سرعت انجماد و به حداقل رسانیدن غلظت ضد یخ، از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. سرعت ایده آل برای انجماد شیشه ای سرعتی است که به آب

داخل سلولی فرصت خارج شدن به منظور انجماد و یا شیشه ای شدن در خارج سلول را می دهد. بنابراین استراتژی اولیه هر دستورالعمل انجماد شیشه ای موفقی باید گذر سریع از دمای بحرانی که بین ۱۵ تا ۵- درجه سانتی گراد است و در آن احتمال ایجاد آسیب های برودت بالا می رود، باشد. این امر خصوصاً زمانی که نمونه حساسیت بالایی دارد نظیر ساختارهای غنی از چربی (مانند جنین خوک)، تخمک ها و جنین های در مرحله قبل از تراکم اهمیت پیدا می‌کند.

۲-۴-۳- سرعت گرم کردن:

سرعت ذوب نیز برای نگهداری سلول‌های پستانداران در شرایط انجماد خیلی مهم است. سرعت متوسط ذوب برای یک نوع مشخص سلول کاملا به سرعت متوسط انجماد وابسته‌است. در ابتدا تحقیقات نشان دادند که گرم کردن سریع سلول‌های پستانداران بعد از انجماد همیشه بهتر است چرا که سلول‌ها زمان کوتاه‌تری برای دوباره کریستاله شدن داشته و کمتر در معرض ضد یخ قرار می‌گیرند. اما اولین تحقیق بر روی انجماد جنین موش توسط Whittingham و همکاران نشان داد که استثنائاتی در این قانون وجود دارد. مطالعه آن‌ها نشان داد که جنین‌هایی که به روش آهسته منجمد می‌شوند زمانی‌که به آهستگی ذوب می‌شوند بقای بعد از ذوب بیشتری خواهند داشت. در حقیقت آن‌ها گزارش دادند که بقای جنین به گرم کردن با سرعت پایین وابسته است. آن‌ها نتیجه گرفتند که میزان بقای ضعیف در اثر سریع گرم کردن احتمالاً به خاطر تأثیرات اسمزی رخ می‌دهد .عمومی‌ترین روش گرم کردن تخمک و جنین‌ها بعد از انجماد شیشه‌ای روش سریع و مستقیم است. معمولاً تخمک و جنین‌ها به محلول ۳۷-۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌شوند. بعد از گرم کردن باید آب‌دهی شده و ضدیخ استفاده شده در امر انجماد شیشه‌ای حذف گردد. این امر باید سریع صورت گیرد اما در مورد رقیق کردن چند مرحله‌ای هنوز بحث وجود دارد [۱۷۰].

۲-۴-۴- ترکیب مناسب محلول انجماد:

زمانی‌که سلول‌های پستانداران در یک محلول رقیق نمکی سرد و منجمد شوند، کاملاً آسیب دیده و از بین می‌روند. با توضیح بالا باید گفت که زنده ماندن اسپرماتوزوئیدهای طیور زمانی‌که در یک محلول حاوی ۱۰ درصد گلیسرول به اضافه آلبومین منجمد شوند، در سال ۱۹۴۹ به صورت کاملاً تصادفی مشخص شد. بعد از آن گوساله حاصل از تلقیح مصنوعی اسپرم منجمد- ذوب شده به دنیا آمد. این موارد اولین مطالعات روشنی بود که نشان دادند سلول‌های پستانداران می‌توانند با افزودن یک مکمل به محیط کشت با موفقیت منجمد شوند [۱۲۵، ۱۲۴].

۲-۴-۴-۱- نقش ضدیخ ها:

برای دستیابی به سرعت‌های بالای سرد کردن استفاده از غلظت‌های بالای محلول ضدیخ که باعث کاهش میزان تشکیل کریستال‌های یخ گردد، لازم است.

ضد یخ ها با حضور در محلول های انجمادی تأثیرات خود را به اشکال زیر اعمال می کنند:

الف. پایین آوردن نقطه انجماد: افزودن ضدیخ به محلول انجماد باعث کاهش جزیی نقطه انجماد می شود.

ب. کاهش اثر سمی سایر ترکیبات محلول: ضد یخ با اتصال به ملکول‌های آب باعث کاهش اثر سمی دیگر ترکیبات محلول می شود. این حالت را تحت عنوان ویژگی انعقادی می‌شناسند.

ج. عدم تشکیل کریستال یخ: در زمان استفاده از غلظت بالای ضد یخ (انجماد شیشه‌ای) کریستال یخ تشکیل نمی شود.

د. محافظت از نمونه با افزایش سطح نمک: زمانی که نمونه آب زیادی از دست می‌دهد ضد یخ از طریق افزایش سطح نمک باعث محافظت از نمونه می‌شود. این ویژگی را با عنوان Salt buffering می‌شناسند.

۲-۴-۴-۲- اجزای محلول انجماد:

خیلی از ترکیبات جهت محافظت از سلول در برابر آسیب‌های سلولی مانند ضد یخ‌ها عمل می‌کنند. به طور کلی می توان گفت: ضد یخ‌ها معمولاً به دو دسته داخل سلولی یا نفوذ پذیر و خارج سلولی یا نفوذ ناپذیر تقسیم می‌شوند.

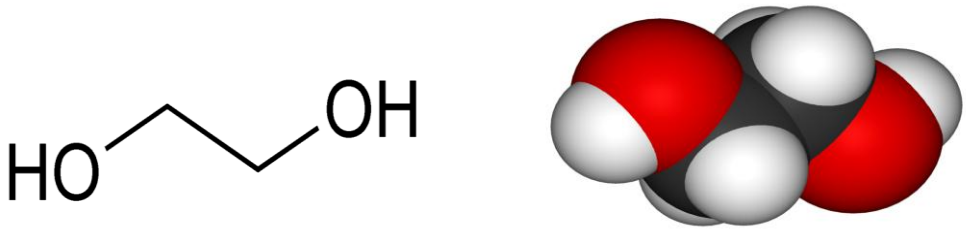
الف- ضد یخ‌های داخل سلولی یا نفوذ پذیر:

ضد یخ‌های داخل سلولی آن دسته از ضد یخ‌ها هستند که وزن ملکولی پایینی دارند. نمونه‌هایی از این ضدیخ‌ها عبارتند از: متانول (Methanol)، اتیلن‌گلیکول (Ethylene Glycol)، دی‌متیل‌سولفوکسید (dimethylsulfoxide)، پروپیلن‌گلیکول (Propylene Glycol) یا ۱ و۲ پروپاندیول (1-2, Propanediol)، استامید (Acetamide) و گلیسرول (Glycerol).

از آن‌جایی که رایج‌ترین و پرکاربردترین ضدیخ‌هایی که برای فرآیند انجماد شیشه‌ای به کار برده می‌شوند EG و DMSO هستند و در این مطالعه از اتیلن گلیکول و دی متیل سولفوکسید به عنوان ترکیبات ضد یخ جهت انجماد تخمک استفاده شد به توضیحاتی درباره این دو ترکیب اکتفا می شود.

*** اتیلن گلیکول:**

اتیلن گلیکول یک ترکیب شیمیایی با فرمول HOCH2CH2OH یا $C_2H_4(OH)_2$ است این ترکیب در فرم خالص خود مایعی شربت مانند، بی رنگ، بی بو و شیرین می باشد. این ماده سمیت نسبتاً پایینی داشته هرچند در صورت خوردن تصادفی آن ضرورت مراقبت های پزشکی احساس می شود. نام شیمیایی این ترکیب ۱ و ۲- اتان دیول است. مهمترین کاربرد اتیلن گلیکول استفاده آن به عنوان ضد یخ اتومبیل است. همچنین این ترکیب در صنعت پلاستیک سازی جهت تولید فیبرهای پلی استری و رزین ها نظیر پلی اتیلن ترفتالات که جهت ساخت بطری های پلاستیکی استفاده می شود اهمیت به سزایی دارد. قابلیت ضد یخی اتیلن گلیکول، از آن یک ترکیب بسیار مهم در امر انجماد شیشه ای بافت های بیولوژیکی، اندام ها ، تخمک و جنین ساخته است. اتیلن گلیکول دو گروه هیدروکسیل دارد که نشان دهنده آب دوستی آن است. شکل ۲-۱ ساختار اتیلن گلیکول را نشان می دهد.

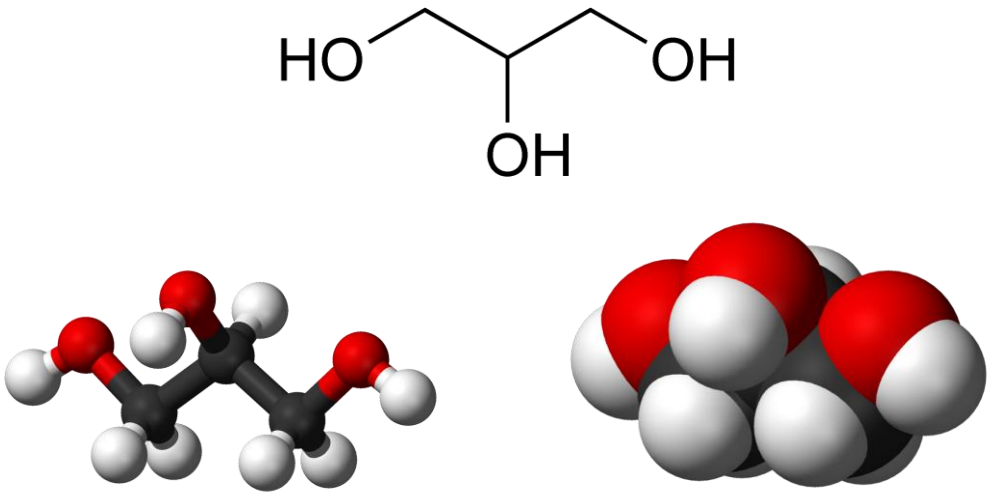


شکل ۲-۱ اتیلن گلیکول [۹۷]

*** گلیسرول:**

گلیسرول یک ترکیب شیمیایی با فرمول HOCH2CH(OH)CH2OH یا C3H5(OH)3 است. این ترکیب، مایعی چسبناک، بی رنگ و بی بو بوده که به طور وسیعی در ساخت ترکیبات دارویی استفاده می شود. نام شیمیایی آن "پروپان ۳،۲،۱- تری اول"(Propane-1,2,3-triol) بوده و اسامی دیگری نظیر گلیسرین (Glycerine)، ۳،۲،۱- پروپانتریول (1,2,3-propanetriol)، ۳،۲،۱- تری هیدروکسی پروپان (1,2,3-trihydroxypropane)،گلیسریتول (Glyceritol) و گلیسیل الکل (Glyceritol) دارد. شکل ۲-۲ ساختار گلیسرول را نشان می دهد. گلیسرول یک الکل قندی با مزه بسیار شیرین و سمیت نسبتاً پایین است. سه گروه آب دوست هیدروکسیل دارد که خود دلیلی بر حلالیت پذیری در آب و رطوبت دوستی آن است [۹۷].

جدول ۲-۱ خصوصیات شیمیایی اتیلن گلیکول و گلیسرول در مقایسه با آب نشان می دهد.



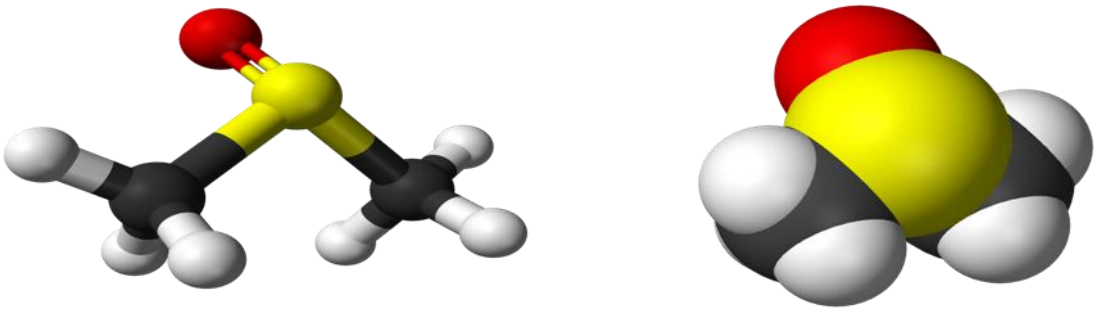
شکل ۲-۲ گلیسرول [۹۷]

جدول ۲-۱: خصوصیات شیمیایی اتیلن گلیکول و گلیسرول در مقایسه با آب [۹۷]

خواص	آب	اتیلن گلیکول	گلیسرول
وزن مولکولی	۱۸/۰۱۶	۶۲/۰۷	۹۲/۰۹
وزن مخصوص	۱	۰/۱۱۵۵	۰/۲۶۳۶
نقطه انجماد خالص(^oc)	۰	-۱۳/۳	۱۷
نقطه انجماد (محلول ۵۰٪حجمی)(^oc)	-	-۳۶/۶	-۲۲
نقطه جوش(^oc)	۱۰۰	۱۹۷/۳	۲۹۰
نقطه اشتعال(^oc)	-	۱۱۵/۶	۱۷۶/۷
گرمای ویژه (J/Kg)	۴/۱۷۴۳	۲/۴۰	۲/۴۱
چگالی(g/cm^3)	۱	۱/۱۱۳۲	۱/۲۶۱

*** دی متیل سولفوکسید(DMSO)**:

دی متیل سولفوکسید ترکیبی شیمیایی با فرمول $(CH3)_2SO$ است که اولین بار در سال ۱۸۶۶توسط دانشمندان روسی ساخته شد. این ترکیب مایعی بی رنگ و یک حلال آپروتیک(Aprotic)، (حلالی که دارای یک اتم هیدروژن باند شده به اکسیژن در گروه هیدروکسیل یا یک اتم نیتروژن در گروه آمین باشد) است که هم در ترکیبات قطبی و هم غیر قطبی حل می‌شود و قابل حل در محدوده وسیعی از حلال‌های آلی همچون آب است. شکل ۲-۳، ساختار دی متیل سولفوکسید را نشان می دهد. تا قبل از آن از گلیسرول به طور گسترده استفاده می‌شد. بدون استفاده از DMSO تا ۹۰ درصد سلول‌های منجمد شده غیر فعال خواهند شد. این ترکیب به طور ویژه در انجماد و نگهداری طولانی مدت سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی خون‌ساز کاربرد دارد. در زمینه انجماد تخمک و جنین نیز استفاده این ترکیب به همراه اتیلن گلیکول و گلیسرول بسیار رایج است. [۹۷]



شکل ۲-۳ دی متیل سولفوکسید [۹۷]

ب- ضد یخ‌های خارج سلولی یا نفوذ ناپذیر:

ضد یخ‌های خارج سلولی در محیط ترکیباتی هستند در اندازه‌های مختلف که خود نمی‌توانند از سلول در برابر آسیب‌های حاصل از انجماد محافظت کنند. دسته‌های مختلفی از این ترکیبات وجود دارد که به عنوان مکمل‌های ضد یخ در محیط استفاده می‌شوند شامل: ساکاریدها، ترکیبات با وزن مولکولی بالا و پروتئین‌ها.

*** ساکاریدها:**

ساکاریدهای مختلفی به عنوان مکمل استفاده می‌شوند که شامل مونوساکاریدها، دی‌ساکاریدها و تری‌ساکاریدها هستند. وزن مولکولی این ترکیبات تقریباً ۱۸۰ تا ۵۴۰ می‌باشد. نمونه‌هایی از این ترکیبات در زیر به اجمال آمده است.

مونوساکاریدها: فروکتوز، گلوکز و گالاکتوز

دی‌ساکاریدها: ساکاروز (Sucrose) ، ترهالوز (Trehalose) و لاکتوز (Lactose)

تری‌ساکاریدها: رافینوز (Raffinose)

ترهالوز به عنوان یک مکمل خیلی موثر جهت انجماد شیشه‌ای تخمک‌ها در گروه‌های مختلف گزارش شده‌است [۴۳، ۱۳]. Arav و همکاران نشان دادند که تخمک‌ها در معرض ترهالوز میزان بقای بالاتری نسبت به زمانی‌که در معرض ساکاروز هستند، دارند و نیز میزان خیلی بالای باروری (۷۰ درصد) بعد از مجاورت تخمک‌ها با ۰/۲۵ مول ترهالوز را گزارش کردند.

نفوذ ناپذیری ساکاروز همچنین به عنوان یک بافر اسمزی می تواند در کاهش شوک اسمزی که ممکن است در نتیجه رقیق سازی و حذف ضد یخ از نمونه در حین فرایند ذوب ایجاد شود، ایفای نقش نماید. البته نباید تأثیرات سمی ساکاروز را نادیده گرفت [۹].

*** ماکروملکول ها:**

ترکیباتی با وزن مولکولی بالا نیز وجود دارند که اغلب به محلول ضد یخ به عنوان مکمل افزوده می شوند که از این دسته می‌توان به ترکیباتی نظیر فایکول (Ficol)، پرکل (Percol)، پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP) و پلی‌اتیلن‌گلیکول اشاره کرد. گزارش‌های مختلف نشان می دهد که PVP برای انجماد جنین مطلوب نیست و سمیت بالایی دارد. پلی‌اتیلن‌گلیکول نیزدر مطالعاتی به عنوان مکمل ضدیخ استفاده شده‌است [۱۳۰].

*** پروتئین‌ها:**

پروتئین‌های بزرگ نیز می‌توانند به‌عنوان مکمل‌های ضدیخ استفاده شوند. نمونه‌هایی نظیر آلبومین سرم‌گاو Bovine serum albumin (BSA) یا سرم‌جنین‌گاو Fetal bovine serum (FBS) و به طور خیلی محدودتر Thermal hysteresis proteins (THPs) را می‌توان در این دسته قرار داد. ماهی شمال در آب‌های یخ زده قطب و در دمای ۱/۸- درجه سانتی‌گراد زندگی می‌کند [۸].

در انجماد جنین، BSA یا سرم که ممکن است حاوی رنج وسیعی از پروتئین های نامشخص باشند معمولاً به محیط های انجماد افزوده می شوند. دیده شده است که پروتئین های زیستی ممکن است نقش سودمندی در انجماد جنین داشته باشند [۸۰]. Rall مشاهده کرد که احتمال تشکیل یخ در محیط حاوی گلیسرول با

افزایش غلظت BSA کاهش می یابد. تأثیرات مطلوبی بر میزان بقای بعد از انجماد جنین های موش در مطالعات Shaw زمانی که از BSA در محیط انجماد حاوی ۴/۵ مول دی متیل سولفوکسید نسبت به ۳ مول آن استفاده کردند، مشاهده شد. این نتایج نشان می دهد که تأثیرات مثبت پروتئین ها بر میزان بقای جنین ممکن است با غلظت ضدیخ به کار رفته مرتبط باشد [۱۴۰].

۲-۴-۵- ظرف حامل جهت انجماد شیشه‌ای:

تنوعی از تکنیک‌های جدید و انواع مختلفی از ابزار و نگهدارنده‌ها به منظور بهبود بقای تخمک و جنین بعد از انجماد امتحان شده است. در ابتدا از آمپول های شیشه ای جهت انجماد و نگهداری جنین های گاو استفاده می‌شد. در دهه ۱۹۸۰ استفاده از نی های پلاستیکی به عنوان حامل و ظرف انجماد شیشه ای و ذخیره جنین آغاز شد. طی دو دهه گذشته چندین سیستم حامل باز و بسته (open and close carrier system) جهت انجماد شیشه‌ای تخمک توسعه یافته است. که تاکنون نی‌های پلاستیکی تلقیح استاندارد ۰/۲۵ میلی متری تقریباً به طور گسترده جهت انجماد تخمک و جنین با سرعت سرد کردن حدود 2500° C/min استفاده شده‌اند که مستقیماً داخل تانک ازت فرو می‌روند [۱۱۲].

به جهت بهبود شرایط نمونه های سرد شده با نیتروژن مایع اندازه نمونه باید به حداقل برسد چرا که پوشش بخار کاهش یافته و سرعت انجماد افزایش می یابد. بنابراین برای تسهیل در انجماد شیشه ای با ایجاد سرعت بالای انجماد بالا، کاهش حجم محلول انجماد ضروری به نظر می رسد. به همین منظور حمل کننده های ویژه ای برای انجام روند انجماد شیشه ای به کار گرفته شده است که می توان به موارد زیر اشاره کرد:

Open Pulled Straw (OPS) [۹۷ ،۱۰۶].

Flexipet-Denuding Pipette (FDP). [۸۳]

Microdrops [۱۱۴].

Electron Microscopic (EM) Copper Grids [۳۰].

Hemistraw System [۷۳ ،۸۳].

Small Nylon Coils [۷۲].

Nylon Mesh [۹۴].

Cryoloop [۷۴ ،۸۳ ،۱۰۶].

Cryotop [۷۲].

۲-۵- انجماد تخمک:

۲-۵-۱- گذشته و آینده انجماد تخمک:

polge و همکاران در سال ۱۹۴۹با گزارش موفقیت استفاده از گلیسرول جهت انجماد اسپرم پرندگان دریچه تازه‌ای به سوی کنترل تولیدمثل باز کردند [۱۲۴]. قدرت بقای تخمک موش بعد از طی فرآیند انجماد و ذوب در سال۱۹۵۸ منتشر شد [۱۴۱]. اما حدود بیست سال دیگر لازم بود تا در سال ۱۹۷۷ اولین حاملگی حاصل از تخمک منجمد- ذوب شده گزارش شود [۱۷۷]. اولین نوزاد انسانی حاصل از تخمک‌های فریز- ذوب شده،

به دنبال گزارشات قبلی در سال۱۹۸۶ متولد شد و گزارشات دیگر مبنی بر تولد نوزاد انسانی تنها مدت‌کوتاهی بعد انتشار یافت [۲۸، ۵]. امروزه انجماد موفق جنین بیش از بیست گونه از پستانداران و انجماد تخمک با موفقیت کمتر در موش و چندین گونه دیگر شامل گاو، خرگوش، گربه، خوک و انسان گزارش شده است. که تعداد آن‌ها رو به افزایش است. اگر چه گروه‌های زیادی تولد حاصل از تخمک منجمدشده را گزارش کرده‌اند اما میزان موفقیت در این زمینه به اندازه موفقیت‌های حاصله برای اسپرم و جنین قابل قبول نیست. علاوه برآن در زمینه تولیدمثل انسان از انجماد تخمک به طور معمول استفاده نمی‌شود چراکه هنوز بیم زیادی در ارتباط با انحرافات ژنتیکی در تخمک‌های منجمد شده وجود دارد اگرچه گزارشاتی مبنی بر تولد جنین‌های نرمال حاصل از این تخمک‌ها وجود دارد. با این وجود انجماد تخمک پستانداران با همه دشواری‌هایش پیشرفت‌های خوبی کرده‌است. تلاش‌های اولیه در مورد تخمک موش با در نظر گرفتن دستورالعمل متداول انجماد جنین به عنوان الگوی کار صورت پذیرفت، اما فقط ۱۴-۶ درصد این تخمک‌ها تا مرحله جنینی یا زایش بعد از لقاح آزمایشگاهی رشد می‌کردند [۱۷۱، ۱۱۶]. تخمک‌های منجمد شده به روش انجماد آهسته میزان باروری بعد از لقاح آزمایشگاهی پایین و رشد تا مرحله جنین دو سلولی کمتر از ۱۳٪ را نشان دادند [۸۴]. به‌هرحال بچه‌زایی در مورد تخمک‌های منجمد شده موش [۱۷۱، ۱۱۶]، خرگوش [۵]، گاو [۱۱۰] و انسان [۲۸] با موفقیت انجام شده‌است.

انجماد به روش مرسوم نتایج قابل قبولی برای جنین داشته است اما برای تخمک چنین نتایجی حاصل نشده است. برخی ویژگی‌های منحصربه فرد و اجزای ساختمانی باعث می‌شوند تا تخمک نسبت به سرمای زیر دمای فیزیولوژیک حساس تر باشد. تخمک‌ها بزرگترین سلول‌های پستانداران هستند، بنابراین بیشتر در معرض آسیب‌های ایجادشده توسط کریستال‌های یخ و شکست ناشی از تغییرات ترمودینامیک محلول قرار می‌گیرند. برای جلوگیری از اثرات مخرب کریستال‌های یخ انجماد شیشه‌ای که به معنای یک حالت انجمادی شبیه شیشه یک محلول در حرارت‌های پایین بدون تشکیل کریستال یخ است، معرفی شد. بطوری که اولین جنین موش با استفاده از این روش منجمد شد [۱۳۰].

۲-۵-۲- کاربرد انجماد تخمک:

ناتوانی در انجماد تخمک مطمئناً یکی از مشکلات اصلی در زمینه زیست شناسی گامت و جنین در گونه‌های حیوانات اهلی است. اگرچه آبستنی کامل و تولد گوساله زنده توسط تخمک‌های تولید شده در شرایط آزمایشگاهی (*In Vitro*) که به روش انجماد آهسته در دمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد منجمد شده‌اند، تجربه شده است، میزان رشد این تخمک‌ها تا مرحله بلاستوسیست پایین و در حدود کمتر از ۵ درصد تخمک‌های منجمد نشده‌است. توانایی در انجماد تخمک مطمئناً با حل مسائل پشتیبانی مرتبط با جمع‌آوری تخمدان‌ها از کشتارگاه و استحصال آن‌ها از تخمدان‌های جمع آوری شده و قرار دادن آن‌ها در شرایط بلوغ و لقاح، در مدت زمانی نسبتاً کوتاه، بهتر خواهد شد. انجماد تخمک سبب گسترش پتانسیل تلقیح در شرایط آزمایشگاهی *In Vitro* Fertilization (IVF) می‌شود [۱۵۸، ۱۱۷، ۵۸].

گذشته از این ذخیره طولانی مدت تخمک‌ها به طور قابل توجهی محدودیت زمانی روند انتقال هسته سلول‌های سوماتیک Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) را کم می‌کند از این رو می‌توان تخمک را در نیتروژن مایع نگهداری، سپس جهت استفاده در زمان مورد نیاز تا دمای فیزیولوژیک گرم کرد.

در صورت بهینه‌شدن شرایط، نگهداری در شرایط انجماد تخمک‌ها کاربردهای گوناگونی خواهد داشت. در دام‌های اهلی، تولید کننده‌ها توانستند ذخیره ی ژنتیکی ارزشمند ماده‌ها را نگهداری کرده و تخمک‌های آن‌ها را بیش از جنین‌های آن‌ها که اجدادشان قبلاً انتخاب شده بودند بفروشند. گونه‌های در خطر انقراض نیز توانستند از نگهداری در شرایط انجماد با حفظ مواد ژنی ماده این گونه‌های آسیب پذیر بهره ببرند. معمولاً اطلاعات ناکافی در مورد زیست‌شناسی انجماد در گونه‌های در خطر انقراض وجود دارد. نگهداری در شرایط انجماد تخمک این گونه‌های نادر این اجازه را خواهد داد تا تخمک تا زمانی که فناوری‌های تولید مثلی جهت استفاده مهیا شود حفظ گردد. از این گذشته نگهداری در شرایط انجماد به تولید و افزایش طول عمر لاین‌های حیوانات تراریخته کمک می‌کند. موش‌های تراریخته قابلیت تولید مثلی ضعیفی داشته و تولید این لاین‌ها یک روند طولانی و هزینه‌بر است. تخمک‌های حیوانات آزمایشگاهی نظیر نژادهای ارزشمند تراریخته موش نیز می‌توانند در شرایط انجماد نگهداری شوند [۲۶].

نگهداری در شرایط انجماد تخمک در زمینه تولید مثل انسان به دلیل وجود فشارهای قانونی و اخلاقی که در مورد انجماد جنین وجود دارد، بسیار بیشتر استفاده می‌شود. این تکنیک همچنین می‌تواند برای زنانی که درخواست نگهداری در انجماد مواد ژنتیکی خود را جهت استفاده‌های بعدی دارند و نیز در مورد زنانی که تحت رادیوتراپی و یا شیمی‌درمانی جهت درمان انواع سرطان قرار می‌گیرند، مفید باشد.

۲-۵-۳- چه عواملی تخمک را به عنوان یک تیپ سلولی مشکل جهت انجماد معرفی می‌کند؟

دانش پایه از ویژگی‌های زیست انجمادی هر نوع تیپ سلولی جهت دسترسی به یک دستورالعمل کارآمد، لازم است [۳۵]. تخمک به عنوان یک سلول منفرد احتمالاً نسبت به جنین چند سلولی در مراحل قبل از لانه گزینی، در برابر چالش‌های محیطی حساس‌تر است پس هر مرحله از فرآیند انجماد تخمک با توجه به روش به کار گرفته شده جهت انجماد به تنهایی یا به همراه دیگر عوامل می‌تواند سبب کاهش پتانسیل تکاملی تخمک منجمد شده گردد [۱۱۷]. از آنجایی که تخمک‌ها سلول‌های خاصی دارای Zona Pellucida (ZP) هستند، غشای آن‌ها نسبت به آب و ضدیخ‌ها نفوذپذیری کمتری دارند. نسبت پایین سطح به حجم تخمک در مقایسه با سایر سلول‌ها کار را برای حرکت آب و ضدیخ‌ها از غشای پلاسمایی سلول مشکل می‌کند [۷۹]. که این امر احتمال تشکیل یخ داخل سلولی در طول فرآیند انجماد را افزایش می‌دهد. تخمک به حفظ تمامیت چند ترکیب ساختاری منحصر به فرد جهت لقاح و طی مراحل تکاملی بعدی نیاز دارد. مسئله دیگر در مورد انجماد تخمک پستانداران در رابطه با اندامک ها و سطوح زیر سلولی است که توسط دماهای پایین تحت تأثیر قرار می‌گیرند و شامل غشای پلاسمایی، ZP، گرانول‌های قشری، دوک میوزی، میکروفیلامنت‌ها (Microfilament) و کروموزم‌های متراکم است. تخمک بسیار به سرما حساس بوده و حتی در دمای اتاق آسیب پذیر است که این مسئله تا حدودی به علت ظرافت وشکنندگی دستگاه دوکی و محتوای لیپیدی بالای آن است. یکی دیگر از ویژگی‌های منحصر به فرد تخمک معلق بودن محتوای DNA آن در سیتوپلاسم روی دوک میوزی و عدم حفاظت آن در محدوده غشای هسته‌ای است. آسیب به DNA و یا میکروتوبول‌ها (Microtubule) می‌تواند یکی از علل موفقیت محدود در انجماد تخمک باشد. چنانکه مشاهده شد زمانی که تخمک‌های گاو تا دمای اتاق سرد می‌شوند بقای آن‌ها به طور قابل توجهی کاهش یافته و دستگاه دوکی در اتصال به کروموزم‌ها دچار