وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه دامغان
دانشکده زیست شناسی

پایان‌نامه کارشناسي ارشد زیست شناسی (بافت شناسی و جنین شناسی)

عنوان پایان نامه

بررسی میزان بیان ژن‌های مهارکننده‌ی بافتی ماتریکس متالوپروتئیناز 1و2 فولیکول‌های پره آنترال جدا شده از تخمدان انجمادی موش سوری

توسط:
رضا اسدزاده

اساتید راهنما:
دکتر سعید زواره
دکتر سید حسن پای لاخی

اساتید مشاور:
دکتر محمدتقی قربانیان
دکتر سید رضا محبی

بهمن 1392

ازپدربزرگوار و مادر گرامیم به جهت پشتیبانی های کم نظیرشان تشکر و قدردانی می نمایم.

مراتب امتنان خود را نسبت به استاد گرانقدر خود جناب **آقای دکتر سعید زواره** در مقام استاد راهنما ابراز می دارم. به یقین اگر مساعدت ها، راهنمای ها و توجه های ایشان وجود نمی داشت انجام این فرایند چه در موارد نظری، نگارش و چه در مراحل عملی آن امکان پذیر نبود.

از جناب **آقای دکتر سید حسن پای لاخی** به جهت حمایت های علمی بی دریغ و ایجاد روحیه اعتماد به نفس در طی مراحل علمی این مطالعه صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

از اساتید ارزنده خود جناب **آقای دکتر قربانیان** و جناب **آقای دکتر سید رضا مجی** که زحمت مشاوره در این مطالعه را قبول نمودند صمیمانه قدر دانی می نمایم.

از دوستان خوبم که لحظات شیرینی در کنارشان داشتم و نیز از کمک های خانم ها **ناهید رازقی، مرضیه داودی و نرگس باقری پورو شیما خسروی** نیز در طی این مطالعه صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

چکیده

بررسی بیان ژن‌های مهارکننده ماتریکس متالوپروتئیناز 1و2 فولیکول های پره آنترال جدا شده از تخمدان انجمادی موش سوری

به وسیله‌ی:
رضا اسدزاده

انجماد بافت تخمدان، نویدی برای حفظ باروری زنان به خصوص پس از پروتکل‌های شیمی درمانی و یا پرتو درمانی در آینده است. مهارکننده بافتی ماتریکس متالوپروتئینازها (TIMPs) در بازسازی ماتریکس خارج سلولی (ECM) مرتبط با تکوین فولیکولی نقش حیاتی ایفا می‌کنند. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن های TIMP1-2 در فولیکول های پره آنترال مشتق شده از بافت تخمدان منجمد شده موش بود. تخمدان موش‌های 14 تا 16 روزه نژاد NMRI به طور تصادفی دردو گروه آزمایشی قرار گرفتند: آزمایش I: مقایسه نسبت رشد و تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان منجمد شده با فولیکول‌های پره آنترال تازه. فولیکول‌های پره‌آنترال انجمادی و غیرانجمادی در محیط α- MEM حاوی 5 درصد FBS، 100میلی واحد در میلی لیتر rFSH، 1 درصد ITS و10 نانوگرم در میلی لیتر EGF کشت داده شدند. تخمک گذاری با اضافه نمودن 1/5 واحد در میلی لیتر hCG در روز 12 دوره کشت القاء گردید و سپس میانگین رشد و نسبت‌های بقاء، تشکیل حفره آنتروم فولیکول‌ها و مراحل تکوینی تخمک‌های آزاد شده (GV، GVBD و MII) مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش II: ارزیابی بیان ژن های TIMP1-2 فولیکول های پره آنترال جدا شده بافت تخمدان منجمد در مقایسه با فولیکول های پره آنترال تازه با روش Real time PCR .: نتایج مرحله اول آزمایش‌ها نشان داد که نرخ بقاء، تشکیل حفره آنتروم و تخمک های MII فولیکول-های پره‌آنترال تازه به طور معنی‌داری بیشتر از فولیکول‌های پره آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده بود. نتایج آزمایش دوم نشان دادکه mRNA TIMP1-2 در همه نمونه های مشاهده شد. به هر حال تفاوت معنی داری بین بیان ژن TIMP1 فولیکول‌های پره آنترال جدا شده از تخمدان منجمد شده و تازه وجود نداشت در حالی‌که بیان ژن TIMP2 فولیکول های پره آنترال جدا شده از تخمدان منجمد شده به طور معنی داری کمتر از فولیکول های پره آنترال تازه بود.
نتیجه گیری: انجماد شیشه ای اثر سرکوبگرانه در بیان TIMP-1 فولیکول های پره آنترال دارد .

کلمات کلیدی: انجماد شیشه ای، تخمدان، فولیکول پره آنترال و TIMP1-2

فهرست مطالب

عنوان
صفحه

فصل اول----------
1.----------
1-1 مقدمه
.....
.....
.....
2
2-1 اقسام
انجماد.....
.....
.....3
1-2-1 انجماد
آهسته.....
.....
.....5
2-2-1 انجماد شیشه ای
.....
.....
.....6
3-2-1 انجماد شیشه ای بافت
تخمدان.....
.....
.....7
1-3-2-1 متغییرهای انجماد شیشه
ای.....
.....
7.....
1-3-2-1 سرعت سرد
کردن.....
.....
.....7
2-3-2-1 سرعت گرم
کردن.....

8
1-2-3-3 غلظت و نوع ضد یخ
8
1-2-3-4 ابزارهای حامل
9
1-4 کشت وبلوغ آزمایشگاهی فولیکول
9
1-5 مهارکننده های بافتی ماتریکس متالوپروتئینازها
10
1-5-1 خانواده ماتریکس متالوپروتئیناز
11
1-6 برخی از عملکردهای TIMPs:
12
1-7 TIMP و ماتریکس متالوپروتئینازها در فرایند تخمک گذاری
13
1-8 متالوپروتئینازها و فرآیند های تخمدانی
14
1-9 TIMPها و فرآیندهای تخمدانی
14
1-10 نقشTIMPها در طول رشد فولیکول
15
1-11 ماتریکس متالوپروتئینازها و TIMPها در تکوین فولیکولی
18
1-12 TIMPها و ماتریکس متالوپروتئینازها در فرایند تخمک گذاری
18

1-13 TIMPها در طی دوره لوتئال..... 19
1-14 ماتریکس متالوپروتئیناز و TIMP در پاتوفیزیولوژی تخمدان..... 20
1-15 بیان مسئله..... 21
1-16 فرضیه..... 21.
1-17 هدف تحقیق..... 21
فصل دوم مواد و روش ها..... 22
2-1 تهیه و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی..... 23.....
2-2 مراحل تحقیق..... 23
2-2-1 نمونه برداری..... 23
2-2-1-1 جداسازی تخمدان..... 23
2-2-1-2 جداسازی فولیکولها..... 24
2-2-1-3 اندازه گیری قطر فولیکول..... 25.....

2-2-1-4 کشت فولیکول های پره آنترال.....25....
2-2-1-5 ارزیابی تغییرات مورفولوژیک و بقای فولیکولها.....25
2-2-1-6 القای تخمک گذاری.....26
2-2-2 مرحله اول: انجماد شیشه ای بافت تخمدان.....26
2-2-2-1 انجماد شیشه ای بافت تخمدان.....26....
2-2-2-2 مرحله ذوب نمونه های منجمد شده.....28
2-2-3 تکنیک های Real Time PCR.....29.....
2-2-3-1 استخراج RNA.....29
2-2-3-2سنتز cDNA.....30
2-2-3 واکنش Real time PCR.....32.....
2-2-3-3-1 نحوه انجام Real Time PCR.....33
2-2-3-3-2 ارزیابی کیفیت و صحت واکنش Real Time PCR.....34.....
2-2-4 آنالیز آماری داده-ها.....

34

فصل سوم نتایج

35

3-1 بررسی مورفولوژی فولیکولهای پره آنترال در طی دوره کشت

36

3-2 تغییرات قطر فولیکولهای پره آنترال غیرانجمادی و فولیکولهای پره آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده در روزهای دوم و چهارم کشت

36

3-2-1 میزان بقاء و تکوین فولیکولهای پرهآنترال غیرانجمادی و فولیکولهای پره آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده

37

3-3 کیفیت سنجی RNA استخراج شده

38

3-3-1 اسپکتوفتومتری

38

3-3-2 الکتروفورز

39

3-4 Real Time PCR

40

فصل چهارم بحث و نتیجه گیری

46

4-1 مقایسه رشد و تکوین فولیکول های پره آنترال جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده با فولیکول های غیرانجمادی

47

4-2 TIMP ها و فرآیندهای تخمدانی

. . . . . .
49. . . . . .

3-4 نتیجه
گیری. . . . . .
. . . . . .
51. . . . . .

4-4
پیشنهادات. . . . . .
. . . . . .
. . . . . .
51. . . . . .

فصل پنجم
منابع. . . . . .
. . . . . .
52. . . . . .

فهرست شکل ها

شکل 1-1: سیستم ماتریکس متالوپروتئیناز در پروسه ی تخمک گذاری..... 14

شکل3-1: سنجش کیفیت RNA با ژل الکتروفورز..... 39

فهرست جداول

جدول2-1 ساخت 100 میلی لیتر محیط پایه α-MEM..... 24

جدول 2-2 تهیه 1000 میلی لیتر محیط DPBS..... 27

جدول 2-3 روش ساخت 10 میلی لیتر محلول تعادلی..... 27

جدول 2-4 ساخت 10 میلی لیتر محلول انجماد شیشه-ای..... 27

جدول 2-5 ساخت Master Mix cDNA..... 31

جدول3-1: متوسط قطر فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در گروه های انجمادی و غیر انجمادی..... 37

جدول 3-2: رشد و تکوین فولیکول‌های پره آنترال کشت شده در گروه های انجمادی و غیر انجمادی..... 38

جدول 3-3 : مراحل تکوین تخمک‌های استحصال شده از فولیکول‌های پره آنترال در گروه های انجمادی و غیر انجمادی..... 38

جدول3-4: جذب نوری RNAهای استخراج شده در اسپکتروفتومتری.....39

جدول 3-5 داده های چرخه نرمال آستانه CT.....44

جدول3-6 بیانگر تغییرات بیان ژن با احتساب معنی داری 5%.....45

فهرست نمودار ها

نمودار 3-1 گراف Real Time PCR ژن TIMP1.....41

نمودار 3-2 منحنی ذوب ژن TIMP1.....41

نمودار 3-3 گراف Real Time PCR ژن TIMP2.....42

نمودار 3-4 منحنی ذوب ژن TIMP2.....42

نمودار3-5 گراف Real Time PCR ژن Actin.....43

نمودار 3-6 منحنی ذوب ژن Actin.....43

فصل اول

مقدمه و مروری بر کارهای گذشته

1-1مقدمه

کرایوبیولوژی علمی است که به مطالعه اثرات دماهای پایین بر روی ارگانیسم‌های زنده می-پردازد. این دماها ساختارهای فیزیکی و فرایندهای حیاتی ارگانیسم زنده را تحت تأثیر قرار می‌دهند. پیش‌ترها اعتقاد بر این بود که این دماها تنها دارای اثرات کشنده برای بافت‌ها و سلول‌های زنده هستند. تاریخچه این دانش زمانی بود که Power توانست بعد از انجماد نوعی مار ماهی در آب نمک مجددا آن را بعد از ذوب زنده دریابد و به این ترتیب فرضیه‌ی کشنده نبودن دماهای پایین را بنیان نهاد. سرما و دماهای زیرصفر و شرایط انجمادی طبیعی، حاکی از وجود توانمندی‌هایی هستند که برای حفظ گونه‌های موجود در زیست گاه‌های سرد اندیشیده شده اند، Henry Power در مطالعات گسترده‌ای که بر روی این گونه ها داشت، توانست به وجود این مکانیسم ها پی ببرد و سایر محققان نیز با استناد بر این اصل طبیعی دانش جدیدی موسوم به کرایو بیولوژی را توصیف نمودند. با استفاده از این دانش سیستم‌های زنده را می توان بدون آسیب جدی به ساختارشان در دماهای پایین سرد نمود و برای مدت‌های طولانی ذخیره کرد [1]. تا به حال محققان توانستند بسیاری از سیستم‌های پستانداران از جمله، گلبول-های قرمز، لنفوسیت‌ها، گامت‌ها، جنین، هپاتوسیت، سلول‌های بنیادی مغز استخوان، قرنیه، بافت پانکراس و پوست را با موفقیت منجمد کنند [2]. امروزه نیز محققان از این دانش برای حفظ بیشتر سیستم های زیستی مانند تخمک، جنین و اخیرا نیز فولیکول های پره آنترال و بافت تخمدان پستانداران در جهت پیشبرد تکنیک‌های کمک تولیدمثلی سود می برند. این تکنیک ها نه تنها به یاری بیمارانی که به دلیل استفاده از شیمی درمانی و یا رادیوتراپی و غیره در معرض خطر ناباروری قرار گرفته اند، آمده است، بلکه برای حفظ گونه‌های در حال انقراض و اصلاح نژاد حیوانات و تولیدات دامی نیز کاربرد دارند [3]. امروزه تکنیک های کمک تولید مثلی(ART)[1] در درمان ناباروری، خدمات شایانی را فراهم کرده اند. لقاح

[1] Associated Reproduction Techniques

مصنوعی (IVF)[1]، تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)[2]، بلوغ آزمایشگاهی[3] فولیکول و تخمک، انتقال جنین، انجماد گامت، اووسیت، جنین و فولیکول و اخیراً نیز انجماد تخمدان و ... از جملهٔ این تکنیک‌ها هستند. تکنیک‌های کمک تولید مثلی، نه تنها کمکی برای افراد نابارور بوده است، بلکه بیماراني که طی فرایندهای درمانی از جمله شیمی درمانی و غیره در معرض ناباروری هستند را نیز از این خطر نجات می‌دهند، بلکه براي حفظ و اصلاح نژاد حیوانات و تولیدات دامي نیز کاربرد دارند.

مهارکننده بافتی ماتریکس متالوپروتئینازها (TIMPs)[4] در بازسازی ماتریکس خارج سلولی مرتبط با تکوین فولیکول‌های تخمدانی نقش حیاتی بازی می‌کنند. در این مطالعه به بررسی اثرات انجماد بر میزان بیان ژن‌های مهارکننده ماتریکس متالوپروتئیناز به وسیله‌ی روش Real Time PCR پرداخته شده است، چرا که اگر این تغییرات بر روی ژن های مهمی از جمله ژن مذکور تاثیر داشته، می تواند بر سرعت تکوین و رشد پس از انجماد نیز اثر گذار باشد. ماتریکس متالوپروتئینازها فاکتورهای ضروری فرایندهای تکوینی هستند و نقش مهمی در مهاجرت سلول اندوتلیالی، رگ زایی و پیشرفت تومور ایفا می‌کنند. لذا کاهش و یا افزایش در میزان بیان این ژن ها با توجه به نقش کلیدی که در بقا، رشد و تخمک گذاری دارند حائز اهمیت است.

2-1 اقسام انجماد

تکنیک‌های انجمادی روش‌های مفیدی برای ذخیره بافت تخمدان و فولیکول‌های پره‌آنترال به منظور اجتناب از رسیدن سلول سرطانی به بافت تخمدان تا زمان اطمینان از بهبودی کامل بیماری بشمار می‌آیند. این روش می‌تواند فرصت مناسبی برای ذخیره بافت و به دنبال آن بلوغ آزمایشگاهی فولیکول برای بیمارانی که با خطر متاستاز به بافت‌های دیگر مواجه‌اند، فراهم آورد [3].

[1] In vitro Fertilization
[2] Intra Cytoplasmic Sperm Injection
[3] *In vitro maturation*
[4] Tissue Inhibitor matrix metallo proteinase (TIMP)

بافت تخمدان از انواع سلول های مختلف تشکیل شده است که نیازمندی های متفاوتی برای بقا دارند. از این بین فولیکول های پره آنترال تحمل بیشتری به صدمات انجماد و ذوب در مقایسه با دیگر مراحل تکوین فولیکولی نشان می دهند. با انجماد فولیکول های پره آنترال به علت ساختار فیزیولوژیکی و مرحله‌ی تکوینی مناسب دیگر نگرانی برای مشکلاتی مانند خطر آنیوپلوئیدی، سخت شدن زونا و عدم نفوذ اسپرم که در انجماد تخمک متافازی مطرح است، وجود نخواهد داشت. پیشرفت در زمینه‌ی این تکنولوژی می تواند برای حفظ قدرت باروری زنان جوان مبتلا به سرطان که به دلیل استفاده از رادیوتراپی و شیمی درمانی در معرض خطر ناباروری هستند، کمک شایانی نماید، از این رو این تکنیک ها امروزه توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است [4].

تا به امروز تنها روش استاندارد برای انجماد بافت تخمدان انسان انجماد آهسته بوده است، که از محیط حاوی آلبومین سرم انسانی، پروپاندیول، دی متیل سولفوکساید یا اتیلن گلیکول به عنوان ضد یخ و در ترکیب با و یا بدون ساکاروز استفاده می شده است که به دلیل نتایج ضعیف کمتر مورد استفاده می باشد. تشکیل کریستال های یخ داخل سلول و غلظت های بالای مواد محلول دلایل اصلی موفق نبودن روش های انجمادی استفاده شده در این مطالعات می باشد[5].

از این رو استفاده از روشی که بر این مشکلات فائق آید منطقی به نظر می رسد و یکی از این راه های موثر، اجتناب از تشکیل کریستال های یخ، استفاده از پروتکل های انجماد شیشه ای است که به عنوان جایگزینی مناسب برای روش های انجماد آهسته و ذوب سریع مطرح می باشد. انجماد شیشه ای به عنوان تکنیک سرد کردن فوق سریع بر اساس تماس مستقیم بین محلول های ضد یخ و نیتروژن مایع مطرح است. سرد کردن فوق سریع ارگان های زنده از این نظر که می تواند تشکیل کریستال های یخ را حذف کند و در عوض یک حالت شیشه ای را ایجاد کند، بسیار مورد توجه قرار گرفته است . متغیرهای فراوانی در انجماد شیشه ای وجود دارند که از آنها می توان به حامل ها اشاره کرد. Lin و همکارانش در سال 2008 فولیکول های پره آنترال را با استفاده از لوله شیشه ای

منجمد کردند و به میزان بلوغ 55% دست یافتند که به طور معنی داری از گروه غیرانجمادی کمتر بود [6]. از طرف دیگر Sugimoto برای انجماد موش از لوله های شیشه ای با قطر 10 میلی‌متر به عنوان حامل استفاده کرد و مشاهده کرد که در تخمدان های شیشه ای پیوند شده نسبت به تخمدان های پیوندی غیرمنجمد شده جمعیت فولیکولی کمتری وجود دارد [7]. نوع دیگر حامل های مورد استفاده برای انجماد شیشه ای، کرایوتاپ می باشد که با توجه به نتایج مطلوب حاصل از انجماد سلول های مختلف، به نظر می آید در انجماد شیشه ای فولیکول های پره آنترال و بافت تخمدان نیز کارامد باشد. از این رو در مطالعه حاضر نیز از کرایوتاپ به عنوان حامل انجماد شیشه ای استفاده شد. همچنین به منظور بهبود اثر انجماد، روش تاثیر مستقیم نیتروژن مایع مورد استفاده قرار گرفت. در این روش به منظور کم کردن اثر سمی غلظت های ضد یخ ها برای انجماد بافت و فولیکول ها استفاده شده و برای به حداکثر رساندن سرعت سرد کردن، بافت تخمدان و فولیکول ها به طور مستقیم درون نیتروژن مایع فرو می روند، استفاده از این روش فرایند انجماد شیشه ای با فت و فولیکول های تخمدان را تسهیل کرده و مانع صدمات ناشی از تشکیل کریستال های یخ خواهد شد [8].

به منظور دستیابی به تخمک های آماده لقاح پس از انجام مراحل انجماد و ذوب، فولیکول ها باید مراحل رشد و تکوین را تحت شرایط آزمایشگاهی طی کنند، پس فراهم آوردن شرایطی مشابه با تخمدان ضروری به نظر می رسد. روش های کشت بر اساس مراحل مختلف تکوین تخمک و فولیکول پیچیده تر می گردند، زیرا ماهیت محیط کشت در مراحل مختلف تکوین با یکدیگر تفاوت اساسی دارند [8].

در پروتکل‌های انجماد تعادلی یا آهسته، انجماد مشتمل بر تشکیل کریستال یخ با پیامد جداشدن آب از مواد محلول است. تشکیل یخ داخل سلول و غلظت‌های بالای مواد محلول به عنوان مشکلات عمده انجماد مطرح هستند. از این رو کاهش زمان سرد کردن جهت برقراری تعادلی ظریف بین فاکتورهایی که منجر به آسیب می‌شوند، ضروری به نظر می‌رسد. کریستال‌های یخ از جمله دلایل اصلی این آسیب‌ها بشمار می‌روند، اما جراحات سرما و

فشار اسموتیک، را نیز می‌توان از دیگر آسیب‌ها برشمرد. امروزه به منظور جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ استفاده از پروتکل‌های انجماد شیشه‌ای بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است[9].

1-2-1 انجماد آهسته

انجماد آهسته تحت شرایط متعادل انجام می‌گیرد و در زمان سرد کردن میان سرعت خروج آب از سلول و سرعتی که آب برای رشد و تشکیل کریستال‌های یخ خارج سلولی تجمع می‌یابند، تعادلی پایدار برقرار می‌گردد. تشکیل یخ درون سلولی با جراحات سلولی کشنده همراه است، از این رو در طی انجماد آهسته آب از سلول و یا بافت به منظور تشکیل کریستال-های یخ خارج سلولی رانده می‌شود [5, 9].

تا مدت‌ها تنها روش استاندارد برای انجماد بافت تخمدان انسان انجماد آهسته بوده است، که از محیط حاوی آلبومین سرم انسانی، پروپاندیول، دی متیل سولفوکساید یا اتیلن گلیکول به عنوان ضدیخ و در ترکیب با ساکاروز یا بدون آن استفاده می-شده است که به دلیل نتایج ضعیف کمتر مورد توجه می باشد. از طرفی روش انجماد آهسته برای فولیکول‌های پره‌آنترال با نتایج بسیار ضعیفی همراه بود [5].

تشکیل کریستال یخ داخل سلول و غلظت‌های بالای مواد محلول از دلایل اصلی موفق نبودن، پروتکل‌های انجمادی استفاده شده در این مطالعات می‌باشد. از این رو استفاده از روشی که این مشکل را حل کند لازم به نظر می رسید. اما در زمینه‌ی انجماد فولیکول و بافت تخمدان با توجه به نتایج ضعیف حاصله، روش مناسبی محسوب نمی‌شود، از طرف دیگر استفاده از تجهیزات گران قیمت و زمان‌بر بودن این روش، باعث شده است تا انجماد شیشه‌ای و روش-های سریع و کم هزینه‌تر بیشتر مورد توجه قرار گیرند [5].

برای انواع سلول ها سرعت سرد کردن بهینه ای وجود دارد به نحوی که مولکول های آب خارج شده به هسته های یخ زده پیوسته و رشد بلورهای خارج سلولی را سبب شوند. ذوب سلول ها نیز به طور عمده با سرعت های بالای گرم کردن انجام می گیرد که مانع کریستاله شدن مجدد یخ و تشکیل کریستال

های کوچک درون سلولی می گردد. در طی انجماد آهسته از غلظت های کم ضد یخ استفاده می شود و به منظور کنترل آسیب های ناشی از سمیت ضد یخ ها و شوک اسموتیک توجه به انتخاب ضد یخ مناسب و همچنین زمان، دما و تعداد دفعات اضافه و حذف آنها ضروری است [10].

2-2-1 انجماد شیشه ای

یکی از راه‌های موثر اجتناب از تشکیل یخ، استفاده از پروتکل‌های انجماد شیشه‌ای است که به عنوان جایگزینی مناسب برای روش‌های انجماد آهسته و ذوب سریع مطرح می‌باشد.

انجماد شیشه‌ای با مفهوم انجماد بدون تشکیل کریستال‌های یخ نخستین بار توسط Rall و همکارانش در سال 1985 معرفی گردید. انجماد شیشه‌ای، فرآیندی انجمادی همراه با افزایش بی نهایت در ویسکوزیته محلول در حین سرد کردن و بدون ایجاد کریستال یخ در دمای بسیار پایین می باشد [11]. با افزایش هر چه بیشتر ویسکوزیته، محلول دیگر مایع نبوده و بیشتر خصوصیات جامدات را نشان می-دهد که حاصل سرد کردن سریع نمونه همراه با غلظت بالای ضدیخ‌ها است. در مقابل پروتکل‌های انجماد آهسته، در طی انجماد شیشه‌ای محلول به طور کامل بدون تغییر حفظ شده و آب از سایر مواد جدا نمی-گردد و کریستال‌های یخ نیز مجالی برای تشکیل نخواهند داشت [11].

این ویژگی منحصر به‌فرد انجماد شیشه‌ای، دلیل اقبال بیشتر آن نسبت به سایر روش‌های انجمادی است. یک مایع شیشه‌ای اساسا مایعی است که از لحاظ ملکولی در حال سکون باشد، به این مفهوم که در طی سرد کردن، آب درون بافت باقی مانده و در نهایت مرحله توقف مایع که فرم شیشه‌ای نیز خوانده می‌شود، حاصل گردد، در حقیقت این روند اساس فیزیکی انجماد شیشه‌ای محسوب می‌شود [12].

در روش انجماد شیشه‌ای به عنوان تکنیک سرد کردن فوق سریع بر اساس تماس مستقیم بین محلول‌های ضدیخ و نیتروژن مایع مطرح است. سرد کردن فوق سریع ارگان‌های زنده از این نظر که می تواند تشکیل یخ را حذف کند و در عوض یک حالت شیشه‌ای را ایجاد کند بسیار مورد توجه قرار گرفته است [12].

هنگامی که از مزایای انجماد شیشه ای صحبت می شود، حذف منبع اصلی صدمات یعنی کریستال های یخ مورد توجه قرار می گیرد. در محلول های انجماد شیشه ای هم سرعت سرد کردن و هم غلظت ضد یخ افزایش یافته است، به طوری که سرعت های بالای سرد کردن نیاز به غلظت بالای ضد یخ را منتفی می کند، هر چند که با غلظت بالای ضد یخ و سرعت های متعادل تغییر دمائی می توان به انجماد شیشه ای موفق دست یافت، اما نمونه ها با جراحات اسموتیک و توکسیسیتی روبرو خواهند شد. در انجماد شیشه ای صدمات توکسیک-اسموتیک باید حداقل باشند در حالی که سرعت های سرد و گرم کردن مورد نیاز نیز تأمین شوند [12].

برای انجام انجماد شیشه ای ترکیبات محلول و فاکتور های مهمی مانند سرعت سرد و گرم کردن مورد توجه قرار می گیرند. بنابراین یک محلول ممکن است با یک پروتکل شیشه اي شده در حالیکه تحت شرایطی دیگر در آن کریستال های یخ ایجاد شود و حتی ممکن است این کریستال ها فقط در طی ذوب کردن و یا در هر دو مرحله سرد و گرم کردن تشکیل شوند، پس به دلیل واکنش میان تشکیل یخ و شرایط سرد و گرم کردن این احتمال وجود دارد که در یک محلول نواحی یخی و شیشه اي به طور همزمان وجود داشته باشند. در صورتی که یک محلول با ترکیبات مشخص اما با سرعت های متفاوت سرد و گرم شود و یا محلولی با شرایطی بر عکس این حالت مورد آزمایش قرار گیرند، می توانند به طور کامل به حالت شفاف و شیشه ای در آیند. اما مقداری کریستال های یخ میکروسکوپی نیز در آنها دیده شود، که نقاط حاوی کریستال های یخ کاملاً تیره هستند، البته محلول شفاف نیز ممکن است دارای هسته های یخی و کریستال های یخی باشد، زیرا این کریستال ها زمانی که از امواج نوری کوچکتر باشند قابل دیدن نیستند. تجهیزات حساسی قادرند میزان انرژی آزاد و جذب شده همراه با تشکیل و ذوب کریستال های یخ را اندازه گیری کند، اما حتی با این تجهیزات نیز تشخیص تفاوت میان حالت شیشه اي بدون یخ کامل و حالت نزدیک به شیشه اي که حاوی مقداری کریستال های یخی کوچک است، مشکل می باشد. اگر نمونه ای به طور یکنواخت سرد نشود و یا محلول قبل از سرد کردن کاملاً مخلوط نشده