

اثر انجماد شیشه ای بر تعداد و حیات توده سلول داخلی بلاستوسیت های گاوی رشد یافته در آزمایشگاه

حجت . . . کریمی جشني (Ph.D.)* محمدحسین نصر اصفهانی (Ph.D.)* حسین ایانی
 ** (Ph.D.) حسین بهاروند (M.Sc.)* محمد مردانی (Ph.D.)*

چکیده

سابقه و هدف: از کشت توده سلول داخلی بلاستوسیت در محیط مناسب، سلول های بنیادی جنینی به دست می آید. از این سلول ها به عنوان یک ابزار تحقیقاتی در تولید حیوانات ترانس ژنیک و مطالعه تکوین جنین استفاده می شود. با روش انجماد شیشه ای می توان بلاستوسیت های تولید شده را برای استفاده های بعدی نگهداری کرد. هدف از این مطالعه بررسی تعداد و میزان حیات سلول های توده داخلی بلاستوسیت های منجمد شده به روش انجماد شیشه ای است. به امید این که بتوان از جنین های منجمد شده نیز جهت تولید سلول های بنیادی استفاده نمود.

مواد و روش ها: پس از بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک های نابالغ گاو، جنین ها در محیط Ham's F₁₀ بر لایه سلول های vero به مدت ۷ روز در دمای ۳۹° C، ۵٪ CO₂ کشت داده شد. ۵۰۰ عدد بلاستوسیت انتخاب و به دو گروه تقسیم گردید. یک گروه به عنوان شاهد و گروه دیگر به روش انجماد شیشه ای (۴۰ درصد اتیلن گلیکول، ۱۸ درصد فایکل، ۰/۳ مولار ساکارز) منجمد شد. پس از ذوب، جنین ها به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و جنین های متسع شده، انتخاب و همراه با گروه شاهد با روش Immunosurgery توده سلولی داخلی آن ها جدا شد. برای بررسی حیات سلول ها از رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده گردید.

یافته ها: درصد حیات توده سلول داخلی بلاستوسیت های روز هفتم در گروه شاهد و انجماد به ترتیب ۹۶ درصد و ۸۵ درصد و میانگین تعداد سلول ها به ترتیب $17/4 \pm 3$ و 14 ± 2 بود. درصد حیات توده سلول داخلی بلاستوسیت های روز هشتم در گروه شاهد و انجماد به ترتیب ۹۵ درصد و ۸۲ درصد و میانگین تعداد سلول ها به ترتیب $18/6 \pm 3$ و 15 ± 2 بود.

استنتاج: درصد حیات و تعداد سلول های توده داخلی بلاستوسیت های گروه شاهد و انجماد در روز هفتم و هشتم دارای اختلاف معنی داری است. به روش انجماد شیشه ای درصد حیات و تعداد سلول ها به طور معنی داری کاهش می یابد. لذا بهتر است که جهت تولید سلول های بنیادی از بلاستوسیت های منجمد نشده استفاده شود.

واژه های کلیدی: بلاستوسیت، عفونت بلاستوسیتی، توده سلولی داخلی

* گروه جنین شناسی، پژوهشکده رویان، تهران
 ** متخصص آناتومی و عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) *** متخصص آناتومی و عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
 تاریخ دریافت: ۸۲/۸/۳۰ تاریخ تصویب: ۸۲/۱۱/۲۹

مقدمه

امروزه به دلیل پاسخگویی به نیازهای غذایی جمعیت روزافزون، مسئولین صنایع دامداری با هدایت تحقیقات پایه به سمت افزایش تولید دام، تولیدگونه‌های مقاوم به بیماری و توان شیردهی بالا و تولید پروتئین‌های خاص که می‌توان از آن‌ها به عنوان دارو استفاده کرد، مبادرت به سرمایه‌گذاری جهت تولید دام‌های ترانس ژنیک نموده‌اند (۱). یکی از راه‌های تولید دام ترانس ژنیک استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی است. سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های تمام ظرفیتی هستند که از سلول‌های توده داخلی بلاستوسیست‌ها به دست می‌آیند (۲،۱). در آزمایشگاه، توده سلولی داخلی را به روش ایمونوسرجری از بلاستوسیست جدا می‌کنند و در محیط مناسب کشت می‌دهند ولی اجازه تمایز به آن‌ها داده نمی‌شود (۳،۴). این روش اولین بار جهت استخراج توده سلول داخلی در جنین موش استفاده گردید (۴). سپس این روش در سایر پستانداران از جمله گاو به کار گرفته شد. Sims و First (۱۹۹۳) با استفاده از روش ایمونوسرجری توده سلولی داخلی جنین گاو را استخراج نمودند و پس از کشت در محیط مناسب از آن‌ها سلول‌های شبه بنیادی جنینی تولید کردند و با انتقال این سلول‌ها به اووسیت بدون هسته، اقدام به تولید گاو نمودند (۳).

در ایمونوسرجری ابتدا جنین‌ها در معرض آنتی‌بادی با رقت مشخص قرار می‌گیرند و سپس به طور جداگانه در مجاورت کامپلمان قرار داده می‌شوند و در نتیجه سلول‌های تروفوبلاست تخریب می‌شوند. ولی سلول‌های توده داخلی سالم باقی می‌مانند. از مزایای روش ایمونوسرجری این است که در یک دوره زمانی نسبتاً کوتاه می‌توان تعداد زیادی توده سلول داخلی خالص جهت تحقیقات به دست آورد (۴). از سلول‌های بنیادی به عنوان ابزار تحقیقاتی در شبیه‌سازی-درتولید حیوانات ترانس ژنیک و کایمر و در مطالعه تکوین جنین استفاده می‌شود (۳ تا ۱۳).

برای تولید سلول‌های بنیادی نیاز به مقدماتی شامل تهیه سلول‌های تغذیه کننده؛ متوقف کردن رشد میتوزی سلول‌های فیروپلاست و هماهنگی نمودن، جهت داشتن بلاستوسیست با کیفیت مناسب می‌باشد (۲). لذا ایجاد مقدمات فوق می‌تواند استفاده به موقع از بلاستوسیست‌های تازه را محدود سازد. جهت تسهیل و ساده‌تر نمودن مراحل فوق و همچنین صرفه‌جویی در وقت و هزینه در این روند استفاده از جنین‌های منجمد شده پیشنهاد شده است.

از آنجایی که انجماد جنین گاو به دلایل علمی و اقتصادی دارای اهمیت بالایی است، تحقیقات در زمینه انجماد، بیش‌تر روی گونه گاو متمرکز شده است. معمولی‌ترین روش جهت نگهداری جنین‌های گاو، روش انجماد شیشه‌ای است. محققین با استفاده از این روش و محلول انجمادی اتیلین گلیکول، فایکل، ساکارز میزان حیات جنین‌های گاو را بالاتر از انجماد آهسته گزارش نموده‌اند. برخلاف روش انجماد آهسته در این روش، شانس تشکیل بلورهای یخ کاهش می‌یابد، اما جنین با تغییرات اسموتیک بسیارشدیدی روبرو می‌شود. همچنین در این روش به علت استفاده از غلظت بالای ضدیخ، جنین با مسمومیت سلولی مواجه می‌گردد (۵،۶).

تحقیقات نشان داده است که در طی انجماد جنین گاو، تعداد سلول‌های توده داخلی در بلاستوسیست کاهش یافته و شانس بقاء آن‌ها نیز تحت تأثیر روش انجمادی قرار می‌گیرد (۷،۸).

لذا هدف این مقاله تعیین تعداد و میزان حیات سلول‌های توده داخلی بلاستوسیست‌های تولید شده در آزمایشگاه پس از انجماد شیشه‌ای متعاقب ایمونوسرجری می‌باشد به امید این که بتوان از توده سلولی جدا شده در تولید سلول‌های بنیادی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

همه محیط‌ها و موادی که در این تحقیق مصرف شده‌اند از شرکت Sigma تهیه شده‌اند؛ مگر مواردی که به آن‌ها اشاره خواهد شد. محیط‌هایی که در این تحقیق ساخته و از آن‌ها استفاده شده عبارتند از:

۱- محیط بلوغ: HEPES - TCM 199. از این محیط به عنوان محیط بلوغ استفاده شد و به هر میلی‌لیتر از این محیط ۲۲ میکروگرم سدیم پیرووات، ۱ میکروگرم استرادیول، ۱ واحد HMG، ۲/۲ میلی‌گرم سدیم بیکربنات، ۰/۵ میلی‌گرم استرپتوماسین، ۰/۵ میلی‌گرم پنی‌سیلین و ۱۰٪ FCS اضافه شد.

۲- محیط شست و شوی تخمک‌ها و جنین: HEPES - TCM 199، که مشابه محیط بلوغ است ولی فاقد هورمون می‌باشد.

۳- محیط لقاح: TALP، که شامل ۱۱۴ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۳/۱۵ میلی‌مولار کلرید پتاسیم، ۰/۳۹ میلی‌مولار فسفات سدیم، ۳/۱۳ میلی‌مولار لاکتات سدیم، ۲ میلی‌مولار کلرید کلسیم، ۰/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۲۵ میلی‌مولار بی‌کربنات سدیم، ۰/۲ میلی‌مولار پیرووات سدیم که به هر میلی‌لیتر از این محیط ۱ میکرومولار اپی‌نفرین، ۱۰ میکرومولار هیپوتورین، ۲۰ میکرومولار پنی‌سیلین، ۱۰ میکروگرم هپارین، ۶ میلی‌گرم BSA، ۰/۲۵ میلی‌گرم استرپتوماسین، ۰/۲۵ میلی‌گرم پنی‌سیلین اضافه شد.

۴- محیط کشت جنین: Ham's F₁₀ + 10٪ FCS که به هر میلی‌لیتر از آن ۲/۱ میلی‌گرم بیکربنات سدیم و ۰/۲۵ میلی‌گرم لاکتات کلسیم و ۰/۰۶ میلی‌گرم پنی‌سیلین و ۰/۰۶ میلی‌گرم استرپتوماسین اضافه شد.

۵- محلول بافر نمکی: PBS که به هر میلی‌لیتر آن ۰/۱ میلی‌گرم فسفات پتاسیم و ۰/۱ میلی‌گرم کلرید

کلسیم و ۸ میلی‌گرم کلرید سدیم و ۲/۶ میلی‌گرم فسفات سدیم اضافه شد.

۶- محلول پایه برای تهیه محلول انجماد و ذوب: PB₁. که شامل PBS - ۵/۵ مولار گلوکز، ۳/۳ میلی‌مولار پیرووات سدیم - ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین - ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA می‌باشد.

۷- محلول انجمادی: EFS (۰/۴٪ اتیلین گلیکول + ۱۸٪ فایکال + ۰/۳ مولار ساکارز در محلول پایه)

۸- محیط شست و شوی بلاستوسیست‌ها در ایمونوسرجری: SOF_{aa} که شامل ۱۰۸ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۷/۲ میلی‌مولار کلرید پتاسیم، ۰/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۱/۲ میلی‌مولار فسفات پتاسیم، ۳/۳ میلی‌مولار لاکتات سدیم، ۲۵ میلی‌مولار بیکربنات سدیم، ۱/۷ میلی‌مولار کلرید کلسیم، ۰/۳۳ میلی‌مولار پیرووات سدیم، ۱/۵ میلی‌مولار گلوکز، ۱ میلی‌مولار گلوتامین، ۱٪ اسید آمینه غیر ضروری، ۲٪ اسید آمینه ضروری می‌باشد که به هر میلی‌لیتر آن ۱ میلی‌گرم پلی‌ونیل‌الکل ۱ میلی‌گرم پلی‌ونیل‌پیرولیدون، ۰/۲۵ میلی‌گرم پنی‌سیلین، ۰/۲۵ میلی‌گرم استرپتوماسین اضافه گردید.

بالغ نمودن اووسیت‌ها در آزمایشگاه:

تخمندان‌های گاو از کشتارگاه جمع‌آوری و در سالین ۹ درصد و دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. مایع فولیکولی، فولیکول‌های ۲-۸ میلی‌متری توسط سوزن شماره ۱۸ کشیده شد و در لوله‌های مخروطی جمع‌آوری و پس از گذشت ۱۵-۱۰ دقیقه ته‌نشین حاصل به دیش‌های بزرگ انتقال داده شد و در زیر استریومیکروسکوپ توده تخمک، کومولوس‌هایی [Cumulus-oocyte complex(COC)]

کشت جنین در آزمایشگاه:

پس از گذشت ۲۴-۱۸ ساعت از زمان تلقیح، جهت جدا سازی جنین‌ها از سلول‌های کومولوس اطراف به مدت ۲ دقیقه در محیط شست و شو ورتکس شدند. جنین‌ها پس از انتخاب دوبار در محیط کشت شسته شدند و در گروه‌های ۲۰-۱۰ عددی در هر قطره ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت در زیر روغن بر روی تک لایه سلول‌های Vero شدند و در شرایط ۳۹ درجه سانتی گراد ۵٪ CO₂ و حداکثر رطوبت به مدت ۷ روز کشت داده شدند.

گروه‌های آزمایشی:

به منظور بررسی اثر انجماد بر روی تعداد و حیات سلول‌های توده داخلی، تعداد ۵۰۰ عدد بلاستوسیست تولید شده در آزمایشگاه در روز هفتم و هشتم پس از لقاح، انتخاب شدند و به دو گروه تقسیم گردیدند: ۱- گروه شاهد ۲- گروهی که انجماد روی آنها انجام گرفت. توده سلولی داخلی هر دو گروه به روش ایمونوسرجری به شرح زیر جدا شد و با استفاده از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو، توان زیستی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

روش انجماد شیشه‌ای:

در این تحقیق از روش انجماد شیشه‌ای بر طبق پروتکل kasai که توسط Zhn و همکارانش (۱۹۹۳) تغییر داده شده استفاده گردید (۹). ابتدا دو تا سه عدد جنین در محلول ۲۰ درصد اتیلن گلیکول (تهیه شده در محلول پایه) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس جنین‌ها به محلول انجمادی منتقل شدند و پس از گذشت ۴۵-۳۰ ثانیه به نی‌فریز منتقل شدند و نی‌فریز به صورت افقی به مدت ۲ دقیقه روی بخار نیتروژن نگه داشته شد و سپس درون نیتروژن مایع غوطه‌ور گردید.

که حداقل سه لایه سلول کومولوس در اطراف خود داشتند انتخاب شدند و ۳ بار در محیط شست و شو و دوبار در محیط بلوغ شسته شدند و ۱۰-۵ عدد COC به قطره ۵۰ میکرولیتری از محیط بلوغ در زیر روغن منتقل شدند و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ و حداکثر رطوبت به مدت ۲۴-۲۲ ساعت کشت داده شدند.

لقاح آزمایشگاهی:

COC ها دوبار در محیط لقاح شسته شدند و در گروه‌های ۱۰ عددی به قطره‌های ۵۰ میکرولیتری از همین محیط در زیر روغن منتقل شدند. سمن تازه گاو از مرکز اصلاح نژاد دام اصفهان تهیه گردید. جهت تهیه اسپرم‌های متحرک از لایه‌های پرکول (Serono - Germany) ۴۵ درصد و ۹۰ درصد که در محیط لقاح رقیق شده بود، استفاده شد. ته‌نشین حاصل دوبار در محیط لقاح شسته شد و پس از تعیین غلظت (۵ میلیون در میلی‌لیتر) توسط سمپلر ۱۰ میکرولیتر از اسپرم به COC ها اضافه گردید. به این ترتیب غلظت نهایی اسپرم‌ها در قطرات حاوی COC به ۱ میلیون در میلی‌لیتر رسید. COC‌های تلقیح‌شده برای مدت ۲۴-۱۸ ساعت در شرایط ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ و حداکثر رطوبت کشت داده شدند.

تهیه تک لایه سلول‌های Vero:

سلول‌های زنده Vero پس از ذوب در محیط کشت، به داخل فلاسک ۵۰ میلی‌لیتری برای استفاده بیش‌تر کشت داده شدند. سلول‌های انکوبه شده تحت تأثیر تریپسین ۰/۵٪ در PBS جدا شدند. سوسپانسیون سلولی دوبار شسته شد و سپس غلظت سلول‌ها به 1×10^5 در میلی‌لیتر رسانده شد و از آن‌ها جهت تولید لایه تک سلولی Confluent در زیر روغن استفاده گردید.

روش ذوب:

پس از خارج کردن نی فریز حاوی جنین از درون نیتروژن مایع و نگه داشتن آن در هوا به مدت ۵-۶ ثانیه، نی به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه در آب با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس محتویات آن به درون دیش تخلیه شد. جنین‌ها به محلول ۰/۵ مولار ساکارز منتقل شدند و پس از گذشت ۵ دقیقه جنین‌ها دوبار شسته شدند و به محیط کشت روی تکه لایه سلول‌های Vero منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO₂ و حداکثر رطوبت کشت داده شدند.

روش ایمونوسرجری:

برای جداسازی توده سلولی داخلی از روش Michelle (۱۹۹۳) استفاده شد (۳). پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت مجدد بلاستوسیت‌های ذوب شده، بلاستوسیت‌های متسع شده انتخاب شدند. برای برداشتن زونا از پروناز ۰/۵ درصد به مدت ۱-۳ دقیقه استفاده شد. سپس جنین‌ها در قطره‌های ۵۰ میکرولیتری از محیط شست و شو، ۴ تا ۵ بار شسته شدند و به قطره Rabbit-antibovine Antibody (sigma B 8270) که به نسبت ۱:۱۰ رقیق شده بود منتقل و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس جنین‌ها شسته شدند و به قطره Guinea pig Complement (Sigma - 1639) که به نسبت ۱:۵ رقیق شده بود منتقل و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. در زیر استریومیکروسکوپ با استفاده از پیپت پاستور توده سلول داخلی از سلول‌های تروفوبلاست لیز شده جدا شد. توده سلولی جدا شده به قطره تریپسین روی لام منتقل شد و با استفاده از پیپت پاستور سلول‌ها، از هم جدا شدند پس از گذشت سه دقیقه محیط حاوی FCS به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید. سپس قطره رنگ

تریپان بلو ۰/۴ درصد به سوسپانسیون سلولی اضافه شد و بلافاصله در زیر میکروسکوپ نوری شمارش سلولی انجام گرفت. سلول‌های مرده به رنگ آبی و سلول‌های زنده بدون رنگ بودند. جهت تجزیه و تحلیل آماری از روش Student t-tests و نرم افزار spss استفاده شد.

یافته‌ها

تولید جنین آزمایشگاهی گاو، شامل مراحل بلوغ آزمایشگاهی، لقاح آزمایشگاهی و کشت آزمایشگاهی جنین است. در این مطالعه برای دست‌یابی به بلاستوسیت، ابتدا مراحل سه گانه فوق انجام شد. بدین منظور در طی ۲۰۰ تکرار و با استفاده از حدود ۱۴۵۰۰ عدد اووسیت کشیده شده از تخمدان گاو، مراحل فوق‌الذکر راه‌اندازی گردید. سپس طی ۵۰ تکرار ۳۵۰۰ عدد اووسیت انتخاب و کشت داده شد و پس از بلوغ، با اسپرم تلقیح شده و به مدت ۷ و ۸ روز در محیط آزمایشگاه کشت داده شدند. حدود ۲۰ درصد از اووسیت‌های تلقیح شده به مرحله بلاستوسیت رسیدند. ۲۵۰ عدد بلاستوسیت روز هفتم و ۲۵۰ عدد بلاستوسیت روز هشتم که از نظر ساختمانی دارای کیفیت بهتری بودند انتخاب و به دو گروه شاهد و انجماد تقسیم گردیدند. ۱۵۰ عدد بلاستوسیت مربوط به هر روز منجمد - ذوب شد و پس از کشت مجدد حدوداً ۷۰ درصد از آنها متسع شدند که همراه با گروه شاهد با روش ایمونوسرجری، توده سلولی داخلی آن‌ها جدا گردید و با روش تریپان بلو رنگ شدند. سلول‌های مرده به رنگ آبی در آمدند. برای انجام ایمونوسرجری می‌بایستی زونا پلوسیدا توسط پروناز برداشته شود. در این مطالعه ۲/۵ درصد از بلاستوسیت‌های گروه انجماد با وجود این که برای مدت ۱۵ دقیقه هم در پروناز قرار گرفتند، زونا برداشته نشد. این زونا پلوسیداها ضخیم‌تر و تیره‌تر به نظر می‌رسیدند.

معنی‌دار می‌باشد. ($P < 0.01$). همچنین درصد حیات سلول‌های توده داخلی در جنین‌های گروه انجماد، پایین‌تر از گروه شاهد است و از نظر آماری تفاوت بین آنها معنی‌دار است. ($P < 0.01$ و $\chi^2 = 59.6$).

جدول شماره ۲: میانگین تعداد و درصد حیات سلول‌های توده داخلی در گروه شاهد و انجماد در روز هشتم.

درصد حیات سلول‌ها	میانگین تعداد سلول‌ها	گروه‌های آزمایشی
۹۵٪	18.6 ± 3	کنترل
۸۲٪	15 ± 2	انجماد

بحث

جنین در طی فرآیند انجماد - ذوب به وسیله عوامل مختلفی در معرض آسیب قرار می‌گیرد. این عوامل عبارتند از: ۱- مسمومیت ناشی از ضد یخ‌ها ۲- آسیب ناشی از حساسیت در برابر سرما ۳- آسیب فیزیکی ناشی از یخ خارج سلول ۴- مسمومیت ناشی از الکترولیت‌های تغلیظ شده ۵- تشکیل و رشد یخ داخل سلولی ۶- آسیب ناشی از شکست روناپلوسید ۷- تورم سلولی ۸- درهم ریختگی اندام‌های داخل سلولی، سیتوسکلتون و اتصال سلول به سلول (۱۰ تا ۱۴). لازم به ذکر است که در طی انجماد شیشه‌ای، بلاستوسیت‌ها چروکیده شده و بلاستوسل آنها روی هم می‌خوابد که پس از ذوب و کشت مجدد تعدادی از آنها زنده مانده و حفره بلاستوسل آنها مجدداً متسع می‌شود (۱۵).

در این مطالعه ۷۰ درصد از بلاستوسیت‌ها پس از کشت مجدد متسع شدند. محقق دیگر این میزان را بین ۵۷ درصد تا ۹۵ درصد گزارش کرده‌اند (۱۶، ۱۳ تا ۱۹). تفاوت در میزان حیات بلاستوسیت‌ها پس از ذوب را به کیفیت جنین‌ها و روش انجمادی نسبت داده‌اند (۲۰-۲۱).

۱۰ درصد از بلاستوسیت‌های گروه انجماد پس از انجام ایمونوسرجی تمام سلول‌هایشان تخریب شدند؛ در صورتی که در گروه شاهد موردی مشاهده نشد. در برخی از نمونه‌های گروه انجماد پس از برداشتن زونا ریزش بقایای سلول‌های تخریب شده از اطراف جنین مشاهده گردید. پس از جدا سازی سلول‌های توده داخلی از یکدیگر، سلول‌های شکسته شده و تغییر شکل داده در بعضی از نمونه‌های گروه انجماد مشاهده شد. در برخی از نمونه‌های گروه شاهد و انجماد، شمارش توده سلول داخلی به علت پایین بودن کیفیت جنین انجام نگرفت و از فهرست آمار حذف گردید.

جدول شماره ۱: میانگین تعداد و درصد حیات سلول‌های توده داخلی در گروه شاهد و گروه انجماد در روز هفتم را نشان می‌دهد. تعداد سلول‌های توده داخلی در جنین‌های گروه انجماد کم‌تر از گروه شاهد است و از نظر آماری تفاوت بین آنها معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.01$). همچنین درصد حیات سلول‌های توده داخلی کم‌تر از جنین‌های گروه شاهد است ($P < 0.01$).

جدول شماره ۱: میانگین تعداد و درصد حیات سلول‌های توده داخلی در گروه شاهد و گروه انجماد در روز هفتم.

درصد حیات سلول‌ها	میانگین تعداد سلول‌ها	گروه‌های آزمایشی
۹۶٪	17.4 ± 3	کنترل
۸۵٪	14 ± 2	انجماد

جدول شماره ۲، میانگین تعداد و درصد حیات سلول‌های توده داخلی در گروه شاهد و گروه انجماد در روز هشتم را نشان می‌دهد. تعداد سلول‌های توده داخلی در جنین‌های گروه انجماد کم‌تر از جنین‌های گروه شاهد است. تفاوت بین آنها از نظر آماری

در ضمن تعداد سلول‌های توده داخلی و سلول‌های تروفوبلاست، ملاک معتبری برای توان زیستی و کیفیت جنین پستانداران است (۲۳، ۲۲). نتایج تحقیق حاضر میانگین تعداد سلول‌های توده داخلی در گروه شاهد و گروه انجماد روز هفتم را به ترتیب ۱۷/۵ و ۱۴ عدد و روز هشتم را ۱۸/۶ و ۱۵ عدد نشان می‌دهد (جدول شماره ۱ و جدول شماره ۲). در مطالعات انجام گرفته در این زمینه تعداد سلول‌های توده داخلی بین ۱۱ تا ۸۴ عدد گزارش شده است (۲۴ تا ۸، ۲۲).

لازم به ذکر است که میزان حیات بلاستوسیست‌های تولید شده در موجود زنده پس از ذوب و کشت مجدد نسبت به بلاستوسیست‌های آزمایشگاهی بیش‌تر است و همچنین تعداد کل سلول‌ها و تعداد سلول‌های توده داخلی نیز بیش‌تر از تعداد سلول‌های جنین آزمایشگاهی است (۲۵، ۲۶). این تفاوت می‌تواند ناشی از بلوغ آزمایشگاهی و تأثیرات محیط کشت باشد. تحقیقات توسط Galli (۲۰۰۳) و Hiroyohi (۲۰۰۳) نشان داد که وجود سرم باعث تجمع غیر طبیعی قطرات چربی در سیتوبلاسم سلول جنین می‌شود و این امر میزان حیات بلاستوسیست‌ها بعد از انجماد را کاهش می‌دهد (۲۸، ۲۷).

در این مطالعه تمام سلول‌ها در برخی از بلاستوسیست‌های گروه انجماد پس از ایمونوسرجری تخریب شدند که احتمالاً علت آن می‌تواند آسیب اتصال بین سلول‌های تروفوبلاست در اثر انجماد باشد. این امر باعث عبور آنتی بادی از بین این سلول‌ها شده و به سلول‌های توده داخلی می‌رسد که پس از افزودن کامپلمان، سلول‌های توده داخلی نیز تخریب می‌شوند. همچنین مشاهده بقایای سلول‌های تخریب شده پس از برداشت زونا و شکسته شدن و تغییر شکل سلول‌های توده داخلی در گروه انجماد ناشی از آسیب سلول‌ها در طی انجماد - ذوب می‌باشد.

آسیب ناشی از انجماد شیشه‌ای شامل کاهش تعداد میکروویلی‌ها در سلول‌های تروفوبلاست، آسیب تمامیت غشاء پلاسمایی، تغییرات میتوکندری، تورم شبکه آندوپلاسمیک خشن و تشکیل وزیکول‌های کوچک است، ظاهراً بعضی از این تغییرات قابل برگشت هستند. اما مرگ سلولی نیز روی می‌دهد که باعث کاهش تعداد سلول‌ها می‌شود (۲۹، ۳۰).

تحقیقات نشان داده است که پس از ذوب جنین‌های گاوی تولید شده در آزمایشگاه، تعداد کل سلول‌ها کاهش می‌یابد و مرگ سلول‌های توده داخلی نیز اتفاق می‌افتد (۲۲). همچنین در طی فرآیند انجماد - ذوب میزان نکروزیس و آپیتوزیس در سلول‌های جنینی گاو افزایش می‌یابد که این امر هم موجب کاهش تعداد کل سلول‌ها و هم باعث مرگ سلولی در توده داخلی بلاستوسیست می‌شود (۳۱). تحقیق حاضر درصد حیات سلول‌های توده داخلی را برای گروه شاهد در روز هفتم و هشتم به ترتیب ۹۶ درصد و ۹۵ درصد و برای گروه انجماد به ترتیب ۸۵ درصد و ۸۲ درصد نشان می‌دهد. محققین دیگر این میزان را در گروه انجماد بسته به نوع ضدیخ بکار برده شده بین ۶۷ درصد تا ۷۷ درصد و برای گروه شاهد ۸۴ درصد گزارش کرده‌اند. افزایش درصد حیات در این تحقیق نسبت به دیگران می‌تواند ناشی از تفاوت در سیستم کشت، روش انجماد، مراحل تکاملی جنین یا تفاوت در کیفیت جنین باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که بین تعداد و درصد حیات سلول‌های توده داخلی جدا شده به روش ایمونوسرجری از بلاستوسیست‌های منجمد شده در روز هفتم و هشتم با گروه شاهد تفاوت وجود دارد و بهتر است از بلاستوسیست‌های منجمد نشده برای تولید سلول‌های بنیادی استفاده گردد.

شاهوردی مسئولین و کارکنان مرکز باروری و نابوری اصفهان و مسئولین کشتارگاه صنعتی اصفهان و مسئولین محترم اصلاح نژاد دام اداره جهاد کشاورزی اصفهان تشکر و قدردانی نمایند.

سپاسگزار
این مطالعه بخشی از طرح «کلونینگ گاو» مصوب شورای علمی پژوهشکده رویان و دفتر جهاد دانشگاهی (کد طرح ۵۹۴-۲۱) است. بدین وسیله نویسندگان بر خود واجب می‌دانند که از همکاری بی دریغ آقای دکتر سعید کاظمی آشتیانی، آقای دکتر وثوق، آقای عبدالحسین

فهرست منابع

1. Wheeler M.B, walters E.M. Transgenic Technology and Applications in Swine. *Theriogenology* 2001; 56: 1345-1369.
2. Strelchenko. N. Bovine pluripotent stem cells. *Theriogenology* 1996; 45:131-140.
3. Sime M and First. N.L. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cel mass cells. *Proc. Natl. Acad. Sci* USA 1993; 90: 6143-6147.
4. Solter D, Knowles B. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Immunology* 1975; 72(12): 3189-3192.
5. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple Method for mouse embryo. Cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod fertile* 1990; 89: 91-97.
6. Kuwayama M, Fujikalua S, Nagai T .Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in gly 1.2 propanediol using 2 and 16 step procedures *Cryobiology* 1994;31:415-422.
7. Takagi M, Sakonju I, Otoi T, Hamana K, Suzuki T. Postthow viability of the inner cell mass of in vitro matured/in vitro-fertilized bovine embryo frozen in various cryoprotectants. *Cryobiology*; 1994; 31: 398-405.
8. Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I. Effect of conventional controlled – rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocyst produced in vitro. *Biology of Reproduction*; 2001; 65: 1127-1134.
9. Zhn SE, Kasai M, Otagi H, Sakurai T, Machida T. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solution. *J Reprod and fertile*; 1993; 98: 139-145.
10. Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopresrvion of embryos. *Theriogenology*; 1996; 45:17-26.
11. Kasai M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Theriogenology*; 1996; 42: 67-75.
12. Vagta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Repro sei* 2000; 60-61: 357-364.

13. Saha D, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. Viability of bovine blastocysts obtained after 7,8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology*; 1996; 46:331-343.
14. Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos implication for their cryopreservation. *Human Reprod*; 1995; 10: 3004-3011.
15. Mtango NR, Varisanga MD, Dong Y.J, Rajamahendran R, Suzuki T. Growth factors and growth hormon enhance in vitro emhryo production and post thaw survival of vitrified bovine blastocysts. *Theiogenology* 2003; 59: 1393-1402.
16. Martines AG, de Matos DG, Furnus CC, Brogliatii GM. In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*; 1998; 50: 757-767.
17. Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT, Dekruif A. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two step addition of cryoprotectant and dilution on embryonic survival. *J Reprod Fertil* 1995; 103: 33-39.
18. Papaioannov V.E, Ebert. K.M. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectrderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. *Development* 1988; 102: 793-803.
19. Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology* 1996; 45:683-689.
20. Kaidi S, Donnay I, Vanlangendonck A, Dessy, Massip A. Camparison of two co-culture system to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification. *Anim Reprod sci*; 1998; 52: 39-50.
21. Rizos D, ward F, Boland MP, Lonergan P. Effect of culture system on the yield and guality of bovine blastosysts as assessed by survival offer vitrification. *Theriogenology* 2001; 56: 1-16.
22. Iwasaki S, yoshikane Y, Lix, Wtanabe S, Nakara T. Effects of freezing of bovine preimplantation embryos derived from oocytes fertilzed in vitro on survival of their inner cell mass cells. *Mol Reprod*. 1994; 37: 272-275.
23. Stojkovic M, Buttner M, Zakhartchenko V, Brem G, wolf E. A reliable procedure for differential staining of in vitro produced bovine blastocysts:Comparison of tissue culture medium 199 and Menezo's B₂ medium. *Animal Reprod sci* 1998; 50: 1-9.
24. Takagi M, Sakonju I, Suzuki T. Effects of cryopreservation on DNA synthesis in

- the inner cell mass of in vitro matured / in vitro fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectant, *J vet Med sci* 1996; 58: 1237-1238.
25. Du F, Looney C.R, Yangx. Evaluation of bovine embryos produced in vitro vs. in vivo by differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells. *Theriogenology* 1996.
 26. Enright BP, Lanergon P, Dinnyes A, Fair T, Ward F.A, Yang X, Boland MP. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo implication for early embryo development and quality. *Theriogenology* 2000;54:659-673.
 27. Galli C, Duchi R, crotti G, Turini P, ponderato N, collooni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 2003; 59: 599-616.
 28. Hiroyoshi Hoshi. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 2003; 59: 675-685.
 29. Vajta G, Hyttel P, Callesen H. Morphological changes of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification in- straw direct rehydration and culture, *Mol Reprod* 1997; 48: 9-17.
 30. Kaidi S, Van langendonekt A, Massip A, Dessy F, Donnay I. Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for vitrification of in vitro Produced bovine embryos. *Theriogenology* 1999; 52: 515-525.
 31. Baguisi A, Lanergon P, Overs trom EW, Boland MP. Vitrification of bovine embryos: incidence of necrosis and apoptosis. *Theriogenology* 1999; 51: 162.