BRIEF REPORT

Effect of Equilibration Time in Vitrification Solution on Post-Thawed Survival Rate and Development of Mouse Two Cell Embryos

Nasibeh Ghandi[1],
Abbas Ali Karimpour Malekshah[2],
Amir Esmaeilnezhad Moghadam[3]

[1] MSc in Anatomy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 23, 2013 ; Accepted January 28, 2014)

Abstract

Background and purpose: To assess the effect of equilibration time on the vitrified-warmed two cell mouse embryos.

Material and Methods: Two cell embryos were obtained from oviducts of super ovulated female NMRI mice. The embryos were randomly allocated in four groups and vitrified using cryotop and two-step mediaprotocol. The experimental groups were: 1) embryos were equilibrated in vitrification solution (v1) (7.5% EG, 7.5% DMSO, 20% BSA, Ham's F10) for 5 min (n=122), 2) 10 min (n=102), 3), 15 min (n=105), 4), 20 min (n=140). After two weeks, the vitrified embryos were thawed. The survived embryos were cultured in Ham, s F10 medium for 72 hours and the cleavage, blastocyst formation and hatching rates were assessed.

Results: The results demonstrated that survival, cleavage, blastocyst formation and hatching rates did not show any significant differences among the embryos in different groups which exposed in first vitrification solution for periods of 5 to 20 minutes.

Conclusion: The range of 5 to 20 minutes for equilibration of mouse embryos in the first vitrification solution can be used in the two-step media plus cryotop method for embryo vitrification.

Keywords: Vitrification, Cryotop, Mouse Embryos Development

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(Supple 1): 254-259 (Persian).

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۲ (۲۵۹-۲۵۴)

تأثیر زمان متعادل سازی جنین های دو سلولی موش در محلول انجمادی، در روش انجماد شیشه ای، بر میزان بقاء و تکوین آن ها پس از خارج کردن از انجماد

نسیبه قندی[۱]
عباسعلی کریم پور ملکشاه[۲]
امیر اسماعیل نژاد مقدم[۳]

چکیده

سابقه و هدف: این مطالعه به منظور مقایسه تأثیر زمان متعادل‌سازی در محلول انجمادی بر میزان بقاء جنین‌های مرحله دو سلولی موش انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده که در آن از لوله رحمی موش‌های گونه NMRI که تحریک تخمدانی شده بودند، جنین‌های دو سلولی به دست آمد. جهت انجماد، این جنین‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم و در محلول انجمادی (۷/۵ درصد اتیلن گلیکول، ۷/۵ درصد دی متیل سولفوکساید، ۲۰ درصد سرم آلبومین گاوی و محیط کشت Ham's F10) در زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و جنین‌های منجمد شده پس از گذشت چهارده روز از حالت انجماد خارج شدند. میزان بقاء پس از انجماد و مراحل تکوین این جنین‌ها تا رسیدن به مرحله بلاستوسیست و هچینگ بررسی و ثبت شد. این تحقیق بر اساس روش انجماد شیشه‌ای (Vitrification) دو مرحله‌ای انجام شد و ابزار مورد استفاده برای انجماد، کرایو تاپ بود.

یافته‌ها: میزان بقاء پس از خارج کردن از انجماد، میزان کلیواژ، میزان تشکیل بلاستوسیست و رسیدن به مرحله هچینگ در بین چهار گروه، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

استنتاج: بر اساس یافته‌های این مطالعه، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که زمان متعادل سازی جنین‌های دو سلولی در محلول انجمادی (با غلظت و ترکیبات مشابه) در فاصله زمانی ۵ تا ۲۰ دقیقه برای جنین قابل تحمل بوده و در میزان بقاء و مرا حل تکوین قبل از لانه گزینی تفاوتی ایجاد نمی‌کند.

واژه های کلیدی: انجماد شیشه‌ای، کرایو تاپ، تکوین جنین موش

مقدمه

از زمانی که اولین مطالعات، قابلیت تکنیک انجماد شیشه‌ای برای نگهداری جنین‌های پستانداران را نشان داد، سال‌ها طول کشید تا این روش به کلینیک‌های درمان ناباروری (ART) راه یافت. با توجه به کارآمدی، آسان بودن وصرفه‌جویی در وقت و هزینه در مقایسه با روش متداول (Slow Freezing)، این روش خیلی زود در

مولف مسئول: عباسعلی کریمپور ملکشاه- ساری:کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: amalekshah@gmail.com
۱. کارشناس ارشد آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۸/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۱۰/۲۶ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۱۱/۸

کلینیک‌های ART مرسوم شد(۱). اساس انجماد شیشه‌ای بر سرعت زیاد سرد کردن (در حدود ۲۳۰۰۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه) و استفاده از غلظت زیاد مواد محافظ انجمادی (Cryoprotectant) قرار دارد(۳،۲). از موانع اصلی و کشنده برای جنین در فرآیند انجماد، تشکیل کریستال‌های یخ است که سبب آسیب رساندن به جنین وحتی مرگ آن‌ها می‌شود. در انجماد شیشه‌ای، با افزایش سرعت سرد کردن و با استفاده از مواد محافظ انجمادی، احتمال این آسیب به حداقل رسانده شد. پیش از این در انجماد آهسته با سرد کردن تدریجی نیاز به غلظت بالای مواد محافظ انجمادی نبود اما در روش انجماد شیشه‌ای جهت سرعت بالای سردکردن در جریان انجماد و نیز در هنگام ذوب جنین‌ها و جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ در داخل سیتوپلاسم بلاستومرهای جنین این مواد با غلظت زیاد می‌شوند.

با توجه به سمیت مواد محافظ انجمادی(۴) و استفاده از غلظت زیادی از آن در فرآیند انجماد شیشه‌ای، برای کاهش اثرات مضر، معمولاً جنین به تدریج و حداقل در دو مرحله در معرض این مواد قرار داده می‌شود. به این ترتیب در اکثر آزمایشگاه‌هایART روش دو مرحله‌ای انجماد شیشه ای به کار گرفته می‌شود(۵). از طرف دیگر زمان مواجهه جنین با مواد محافظ انجمادی بسیار تعیین کننده و حیاتی می‌باشد. مدت زمان تماس جنین، بر زنده ماندن آن‌ها بعد از ذوب تأثیر می‌گذارد. در حقیقت زمان تعادل در محلول محافظ انجمادی نه می‌بایست کوتاه باشد (به منظور آب‌گیری مناسب سلول) و نه باید خیلی طولانی بشود (به منظور جلوگیری از اثرات سمی روی جنین‌ها)(۴).

مطالعات معدود انجام شده در این زمینه نتایج متفاوتی را در رابطه با زمان مطلوب متعادل‌سازی در محلول‌های انجمادی و اثرات آن در تکوین پس از ذوب جنین‌های اولیه پستانداران ذکر کردند(۴،۹-۶). با توجه به معدود بودن مطالعات انجام شده و نتایج متناقض ارائه شده، این مطالعه به منظور بررسی زمان متعادل‌سازی جنین‌های موش در محلول انجمادی اول (V1) در فرآیند انجماد شیشه‌ای دو مرحله‌ای انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

برای تحریک تخمک گذاری و جمع آوری جنین به موش‌های سوری ماده، نژاد NMRL با سن ۶ تا ۱۲ هفته به روش داخل صفاقی، ۷/۵ واحد PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) (Hypra، Spain) و ۴۸ ساعت بعد، ۷/۵ واحد HCG (Human Chorionic Gonadotropin) (LG life sciences، Korea) تزریق شد. سپس هر موش ماده با یک موش نر جفت‌گذاری شد. صبح روز بعد با کنترل پلاک واژنی موش‌هایی که جفت‌گیری داشتند از بقیه موش ها جدا شدند. برای به دست آوردن جنین‌های دو سلولی، ۴۸ ساعت بعد از تزریق HCG، موش ها با قطع نخاع گردنی کشته شدند. لوله‌های رحمی آن‌ها جدا و به قطره ای از محیط کشت شامل Ham's F10 With Hepes (Sigma) به همراه ۲۰ درصد سرم آلبومین گاوی (Sigma) انتقال داده شد. جنین‌های دو سلولی به روش فلاشینگ از لوله‌های رحمی خارج و پس از شست و شو به قطره دیگری از محیط کشت حاوی T6 (رویان، ایران) به همراه ۱۰ درصد سرم آلبومین منتقل شدند. این محیط ۲۴ ساعت قبل از کشتن حیوانات، قطره‌گذاری شده و روی آن با روغن معدنی (Sigma) پوشیده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با جریان ۶ درصد CO2 نگهداری شده بود.

انجماد شیشه‌ای (Vitrification)

انجماد جنین‌ها به صورت دو مرحله‌ای انجام شد. در مرحله اول جنین‌ها در ۴ گروه به مدت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه در محیط انجمادی اول (V1) با ترکیب ۷/۵ درصد اتیلن گلیکول (sigma) و ۷/۵ درصد دی متیل سولفوکساید DMSO (sigma) و ۲۰ درصد سرم آلبومین انسانی در محیط کشت T6 قرار گرفتند. سپس به محیط انجمادی دوم (V2) با ترکیب ۱۵ درصد اتیلن گلیکول (EG) و ۱۵ درصد DMSO، ساکارز (sigma) ۰/۵ مولار و ۲۰ درصد سرم آلبومین انسانی در محیط کشت T6

منتقل شدند و پس از ۱ دقیقه به سرعت با حداقل محیط کشت V2 بر روی کرایوتاپ (Kitazato، Japan) قرار داده شد و بلافاصله وارد نیتروژن مایع شدند(۱).

گروه‌های مورد آزمایش

جنین های دو سلولی با مورفولوژی نرمال، به صورت تصادفی در ۴ گروه تقسیم و به ترتیب به مدت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه در محلول انجمادی اول (V1) قرار داده شدند. زمان توقف در محلول انجمادی دوم برای تمام گروه‌ها مساوی بوده است (۱ دقیقه).

ذوب (Thowing)

ذوب جنین ها ۵ روز پس از انجماد انجام شد. کرایوتاپ حاوی جنین از نیتروژن مایع خارج و به سرعت به محیط ذوب اول (T1) شامل محیط کشت T6 به همراه ساکارز ۱ مولار و ۲۰ درصد سرم آلبومین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. پس از یک دقیقه به سرعت در محیط ذوب دوم (T2) حاوی محیط T6 به همراه ساکارز ۰/۵ مولار و ۲۰ درصد سرم آلبومین گاوی قرار گرفتند و پس از ۳ دقیقه توقف، در ۳ قطره از محیط کشت (Ham's F10 With Hepes) با ۲۰ درصد سرم آلبومین به مدت ۵ دقیقه شستشو و سپس به محیط کشت اصلی شامل T6 و ۱۰ درصد سرم آلبومین منتقل شده و برای ادامه کشت به انکوباتور انتقال داده شدند(۱).

دو ساعت پس از ذوب، جنین هایی که دارای اندازه و مرفولوژی نرمال، رنگ روشن، زونا و بلاستومرهای سالم و فاصله بلاستومرها از زونا طبیعی بودند، به عنوان جنین‌های زنده و بقیه که رنگی تیره، مایل به قهوه‌ای داشته یا دارای شکل و اندازه های غیر طبیعی و بلاستومرهای چروکیده بودند و یا بلاستومرها از قشر زونای شفاف فاصله گرفتند، به عنوان جنین‌های غیر زنده ثبت شدند. کشت جنین‌های ذوب شده تا مرحله هچینگ بلاستوسیست (بلاستوسیست‌هایی که شروع به خارج شدن از پرده زونا کردند) پیگیری شد و تعداد جنین‌هایی که تقسیم شدند و به مرحله بلاستوسیست و هچینگ رسیدند، ثبت شد. میزان زنده ماندن پس از ذوب، میزان کلیواژ (تقسیمات سلولی)، نسبت بلاستوسیست و نسبت هچینگ، شاخص هایی بودند که ثبت و بین گروه‌ها مقایسه شدند.

برای مقایسه شاخص های یاد شده بین گروه‌ها از آزمون ANOVA و آزمون Post Hoc، tuky استفاده شد.

یافته ها و بحث

در این مطالعه زمان متعادل‌سازی جنین در محلول انجمادی قبل از انجماد شیشه‌ای، مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت زنده ماندن پس ازذوب، نسبت کلیواژ، نسبت تشکیل بلاستوسیست و هچینگ از آن، ثبت شده و در بین گروه‌ها مقایسه شدند (جدول شماره ۱). بر اساس این یافته‌ها مواجهه با محلول انجمادی اول در بین گروه‌ها (در مدت زمان مواجهه ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ دقیقه) در شاخص‌های ذکر شده اختلاف معنی‌داری از نظر آماری نشان نداد.

جدول شماره ۱: نسبت بقاء و سیرتکاملی جنین‌ها پس از انجماد شیشه‌ای در زمان های مختلف مواجهه با محلول متعادل سازی اول (V1)

گروه آزمایش	تعداد کل جنین	نسبت بقاء (درصد)	نسبت کلیواژ (درصد)	نسبت تشکیل بلاستوسیست (درصد)	نسبت هچینگ (درصد)
۵ دقیقه	۱۲۲	۸۰/۸۱	۷۳/۹۱	۷۹/۹۱	۴۱/۴۷
۱۰ دقیقه	۱۰۲	۸۶/۱۲	۸۴/۶۵	۷۸/۹۳	۳۹/۵۰
۱۵ دقیقه	۱۰۵	۹۰/۶۷	۸۳/۹۴	۷۷/۳۰	۴۷/۶۸
۲۰ دقیقه	۱۴۰	۸۸/۲۱	۸۰/۷۷	۸۳/۱۱	۴۵/۱۴

*اختلاف بین گروه ها معنی دار نبود (P>۰/۰۵)

در مطالعات معدودی که بر روی جنین‌های مراحل پرونوکلئار، ۸ سلولی، مورولا و بلاستوسیست موش انجام شده نتایج گزارش شده در رده‌های مختلف سلولی متناقض بوده است(۹- ۴).

در مطالعه Valdez و همکارانش که زمان متعادل سازی را بر روی ۳ مرحله جنینی ۸ سلولی، مورولا و بلاستوسیست موش در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه در محلول انجمادی (۱۰ درصد Glycerol، ۲۰ درصد Propylene Glycol، PBS، ۱۰ درصد Calf Serum) بررسی کردند، جنین‌های هر ۳ مرحله در زمان ۱۰ دقیقه بالاترین میزان بقاء را نشان دادند(۸). در تحقیق دیگری که توسط Ishida و همکارانش بر روی جنین‌های ۸ سلولی موش در زمان‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ دقیقه متعادل‌سازی در محلول انجمادی (۴۰ درصد EG، ۱۸ درصد Ficoll، ۰/۳ مولار ساکارز، PBS) انجام شد، پایین‌ترین نسبت تشکیل بلاستوسیست و هچینگ در زمان‌های ۱ و ۲ دقیقه بوده است. ولی در زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه اختلاف چشم‌گیری مشاهده نشد(۴). در مطالعه Bagis و همکارانش که زمان متعادل‌سازی زیگوت موش در مدت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه مواجهه با محلول انجمادی (۴ درصد EG، BSA ۴ mg/ml) با استفاده از دو ابزار SSV و Straw بررسی شد، بالاترین سیر تکاملی تا دو سلولی و تشکیل بلاستوسیست و هچینگ با استفاده از Straw در زمان ۱۵ دقیقه و با استفاده از SSV، سیر تکاملی تا دو سلولی در همه گروه‌ها یکسان بوده اما نسبت تشکیل بلاستوسیست و هچینگ در زمان ۱۵ دقیقه مواجهه بالاتر از سایر گروه‌ها گزارش شده است(۶).

در پژوهش Kader و همکارانش، زمان متعادل سازی بلاستوسیست های اولیه و ثانویه موش در مدت ۴، ۸ و ۱۵ دقیقه در محلول انجمادی (۷/۵ درصد DMSO، ۷/۵ درصد EG، ۲۰ درصد SSS) بررسی شد. به طور مشخص بلاستوسیست‌های اولیه در زمان ۸ و ۱۵ دقیقه بالاترین میزان بقاء و کم‌ترین آسیب DNA را داشتند و بلاستوسیست‌های ثانویه در زمان ۸ دقیقه، بالاترین میزان بقاء را نشان دادند(۷). اختلاف نتایج بین مطالعه حاضر و تعدادی از گزارش‌های گذشته ممکن است بنا بر علل مختلف از جمله نوع، ترکیب و غلظت ماده محافظ انجمادی، ابزارهای مختلف انجماد شیشه‌ای به کار رفته، نژاد حیوان مورد آزمایش و شرایط آزمایشگاهی باشد. اثرات شیمیایی و فیزیکی انجماد می‌تواند یک تغییر ناخواسته در جنین به وجود بیاورد و بر توانایی زنده ماندن بلاستومرها و نهایتاً جنین تأثیر بگذارد. نوع، ترکیب و غلظت مواد محافظ انجمادی، شرایط و زمان‌بندی پروسه انجماد و ذوب و مرحله تکوین جنین و شدت آسیب آن بسته به نوع روش و ابزار انجمادی تغییر می‌کند(۱۰، ۱۱).

قابل ذکر است در همه تحقیقات به غیر از مطالعه Kader، ترکیب و غلظت ماده محافظ انجمادی به کار رفته با پژوهش حاضر متفاوت بوده است و مرحله تکوینی اغلب جنین‌های مورد آزمایش از ۸ سلولی تا بلاستوسیست گزارش شده، در حالی که جنین‌های به کار رفته در این مطالعه دو سلولی بودند. در مطالعه Zwalman ذکر شده که درصد نفوذپذیری مواد محافظ انجمادی از مرحله پرونوکلئار تا بلاستوسیست افزایش می‌یابد(۱۲). با این فرض، زمان متعادل سازی می‌تواند با مرحله تکوین جنین نسبت عکس داشته باشد. با یادآوری این نکات در انجماد رده‌های مختلف جنینی و استفاده از مواد محافظ انجمادی و غلظت‌های مختلف در محیط انجمادی باید به همه این موارد توجه شود و نمی‌توان شرایط یکسان و ثابتی را برای همه رده‌های تکاملی جنین قبل از لانه گزینی در انواع پستانداران در نظر گرفت.

زمانی که سلول در برخی شرایط نامساعد قرار می‌گیرد، اقدام به سنتز پروتئین‌هایی در سیتو پلاسم خود می‌کند که باعث افزایش قدرت تحمل و سازش آن در برابر استرس می‌شود، چنین مکانیسمی احتمالاً در بلاستومرهای جنین نیز وجود داشته و امکان سازش جنین و پشت‌سر گذاشتن شرایط نامساعد را فراهم می‌آورد(۱۴،۱۳).

در چرخه سلولی، مکانیسم‌های جبرانی برای مقابله با استرس وجود دارد. مطالعاتی که در آن برخی از ژن‌ها را از کار انداخته و مختل کردند، نشان داد که چرخه

سلولی جنینی دارای انعطاف پذیری بسیار بالایی است، به طوری که می‌تواند با مکانیسم‌های مختلف، نبود یک یا چندین پروتئین تنظیم کننده را جبران کند. در مرحله دو سلولی موش، گروه کوچکی از ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی حضور دارند که در این مرحله بسیار فعال‌تر از مرحله یک سلولی می‌باشند(۱۵،۱۶). احتمال می‌رود جنین‌ها اثرات ناشی از مواجهه با محلول انجمادی را، در مدت زمان قابل تحمل با مکانیسم‌های تنظیمی خنثی کنند و در مجموع این موارد می‌تواند بقای بالای جنین در مدت ۲۰ دقیقه مواجهه با محلول انجمادی را توجیه کند.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که جنین‌های دو سلولی موش در مدت زمان متعادل‌سازی از ۵ تا ۲۰ دقیقه در محلول انجمادی (با غلظت و ترکیب مشابه)، قابلیت بقاء و تکامل پس از انجماد را به خوبی حفظ می‌کنند، ولی به دلیل این‌که میزان لانه‌گزینی و تولد جنین‌ها در این مطالعه بررسی نشده، احتمال می‌رود مواجهه بیش‌تر کاهش توانایی جنین را در مراحل بعدی به دنبال داشته باشد، از طرفی برای صرفه‌جویی در زمان انجام کار منطقی است که مدت مواجه کم‌تر (۵ تا ۱۰ دقیقه) در نظر گرفته شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله مراتب قدردانی و سپاس خود را از همکاری صمیمانه معاونت محترم پژوهشی و کلیه همکارانشان و معاون پژوهشی وقت دانشکده پزشکی جناب آقای دکتر شیران ابراز داشته و در ضمن متذکر می‌گردد این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی شماره (۱۰۸-۹۱) دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد.

References

1. Zhang J, Cui J, Ling X, Li X, Peng Y, Guo X, et al. Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method. J Assisted Reprod Genet 2009; 26(11-12): 621-628.
2. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. RBM Online 2005; 11(5): 608-614.
3. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. RBM Online 2006; 12(6): 779-796.
4. Ishida GM, Saito H, Ohta N, Takahashi T, Ito MM, Saito T, et al. The optimal equilibration time for mouse embryos frozen by vitrification with trehalose. Hum Reprod 1997; 12(6): 1259-1262.
5. Rall W. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 1987; 24(5): 387-402.
6. Bagis H, Odaman Mercan H, Cetin S, Sekmen S. The effect of equilibration time on survival and development rates of mouse pronuclearstage embryos vitrified in solid surface (SSV) and convential straws: In vitro and In vivo evaluations. Mol Reprod Dev 2005; **7**(4): 494-501.
7. Kader A, Choi A, Sharma R.K, Falcone T, Agarwal A. Effect of varying equilibration time in a two-step vitrification method on the post-warming DNA integrity of mouse blastocysts. Fertil Steril 2010; 93(8): 2640-2645.
8. Valdez CA, Mazni OA, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Effects of equilibration time, precooling and

developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Theriogenology 1990; 33(3): 627-636.

9. Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Nandi S. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. The Veterinary Journal 2009; 179(2): 287-291.
10. Kasai M, Niwa K, Iritani A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. J Reprod Fertil 1981; 63(1): 175-180.
11. Fathi R, Rezazadeh Valojerdi M, Eftekhari Yazdi P. Investigating the Effect of Laser Assisted Hatching on the Development and Quality of Vitrified-Warmed 4-Cell Stage Mouse Embryos. Yakhteh Medical Journal 2008; 10(2): 121-128.
12. Van Der Zwalmen P, Gaurios B, Ectors FJ, Touati K, Massip A, Ectors F. Some factors affecting successful vitrificationof mouse blastocysts. Theriogenology 1988; 30(6): 1177-1183.
13. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins, molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. Circ Res 1998; 83: 117-132.
14. Feder ME, Hofmann GE. Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress responseevolutionary and ecological physiology. Annu Rev Physiol 1999; 61: 243-282.
15. Artus J, Tannoudji MC. Cell cycle regulation during early mouse embryogenesis. Mol Cell Endocrinol 2008; 282: 78-86.
16. Khalili Savadkohi S, Karimpour Malekshah AA, Alizadeh A, Esmaeilnezhad Moghadam A, Shiravi A, Mirhosseini M. The Effect of Light on Mouse Preimplantation Embryo Development in Vitro. J Mazand Univ Med Sci 2011; 21(80): 17-24.