تاثیر استفاده از عسل طبیعی به عنوان ماده‌ی سرمامحافظ جدید بر نرخ زنده‌مانی، خروج از زونا و لانه‌گزینی در بلاستوسیست‌های منجمد-ذوب شده‌ی موش

فاطمه سرمدی، صدف اسفندیاری، مجتبی دشتی‌زاد*، مهدی شمس‌آرا

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (NIGEB)، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: dashtizad@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۱۷

چکیده

بهینه‌سازی فرایند انجماد شیشه‌ای، به عنوان راهکاری جهت ذخیره‌ی رویان‌های حاصل از تکنیک‌های کمک‌باروری، مستلزم تقابل با عوامل مخربی از قبیل تشکیل کریستال‌های یخ، سمیت سلولی و شوک اسمزی است که رویان را در معرض شرایط نا-مساعد قرار می‌دهند. حضور کربوهیدرات‌ها به عنوان مواد سرمامحافظ نفوذناپذیر، تلاشی در راستای کاهش این تنش‌ها می‌باشد. از آن‌جایی که استفاده‌ی ترکیبی از قندها نتایج بهتری را در پی داشته، در این طرح، از عسل طبیعی که متشکل از مونوساکاریدها و دی‌ساکاریدهای مختلف است به عنوان ماده‌ی سرمامحافظ جایگزین ساکارز، در انجماد بلاستوسیست موش استفاده شد. بدین منظور بلاستوسیست‌های درون‌تنی موش پس از استحصال، به طور تصادفی به دو گروه انجمادی عسل و ساکارز تقسیم گشتند. در بخش اول آزمایش، بلاستوسیست‌ها تحت انجماد با محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف عسل قرار گرفتند و در نهایت غلظت‌های بهینه تعیین شدند. بخش دوم به مقایسه‌ی تاثیر محلول‌های انتخاب شده و محیط‌های حاوی ساکارز بر نرخ زنده‌مانی، خروج از زونا و لانه‌گزینی اختصاص یافت. در بخش اول، غلظت‌های بهینه‌ی ۱ و ۲ مولار به ترتیب در محیط انجماد و ذوب برگزیده شدند. نتایج حاصل از بخش دوم آزمایش نشان داد که استفاده از عسل طبیعی نه تنها در میزان زنده‌مانی توانست با گروه ساکارز برابری نماید، بلکه قادر به حفظ نرخ خروج از زونا و مهم‌تر از آن لانه‌گزینی در سطح گروه ساکارز نیز بود. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان عسل طبیعی را به عنوان ماده‌ی سرمامحافظ نفوذناپذیر مناسبی جهت جایگزینی با ساکارز و بهینه‌سازی روند انجماد معرفی کرد.

کلمات کلیدی: انجماد شیشه‌ای، مواد سرمامحافظ نفوذناپذیر، عسل طبیعی، بلاستوسیست موش.

مقدمه

از زمانی که انجماد به عنوان بخش بنیادین تکنیک‌های کمک باروری به کار گرفته شد، با چالش‌های فراوانی مواجه بوده است. حین فرایند انجماد، آب که اصلی-ترین جزء تشکیل‌دهنده‌ی تمام سلول‌های زنده است، به تشکیل کریستال یخ تمایل نشان می‌دهد که به خودی خود آسیب‌رسان است. طی سال‌های متمادی، ترکیباتی که توانایی نفوذ به داخل سلول‌ها و ایجاد پیوندهای هیدروژنی با مولکول‌های آب را دارا می-باشند و تحت عنوان مواد سرمامحافظ نفوذپذیر شناخته می‌شوند، جهت جلوگیری از تشکیل کریستال یخ استفاده می‌گردیدند. انجماد شیشه‌ای فضای داخل سلولی منوط به استفاده از غلظت بالای مواد سرما-محافظ بود که سمیت سلولی و شک اسمزی را در پی داشت (۳).

به کارگیری مواد سرمامحافظ نفوذناپذیر، یکی از تلاش‌هایی است که به منظور کاهش این اثرات مخرب به آن مبادرت می‌ورزند. این ترکیبات، قابلیت عبور از غشای سلولی را ندارند و با ایجاد شیب اسمزی بین دو سوی غشاء، منجر به حرکت رو به خارج، آب داخل سلولی می‌گردند. بدین ترتیب، تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی را به حداقل می‌رسانند (۱۸).

علاوه بر این، با کاهش میزان مورد نیاز مواد سرما-محافظ نفوذپذیر لازم برای انجماد محیط داخل سلولی، سمیت سلولی ناشی از آن‌ها را نیز کاهش می‌دهند (۱).

کربوهیدرات‌ها، به طور گسترده به عنوان مواد سرما-محافظ نفوذناپذیر، در انجماد گامت (۲۲، ۲۳) و رویان (۹) گونه‌های مختلف به کار می‌روند. در این راستا، دی‌ساکاریدها بیشترین کاربرد را دارند (۸، ۱٦). هم‌چنین، مطالعاتی مبنی بر استفاده از مونوساکاریدها نیز وجود دارد (۱۲، ۲۱).

نشان داده شده علاوه بر استفادهی مجزا از قندها، استفادهی ترکیبی از آن‌ها نیز، به طور موثری، حیات اسپرم (۱۵) و رویان (۲۰) را بهبود می‌بخشد. از این رو، استفاده از ترکیبی که متشکل از مونو و دی-ساکاریدها باشد، همانند استفادهی هم‌زمان از چند مادهی سرمامحافظ عمل نموده که ممکن است نتیجه-ای بهتر از استفاده از یک مادهی سرمامحافظ نفوذناپذیر، به تنهایی را به دنبال داشته باشد.

عسل طبیعی، یکی از ترکیباتی است که در راستای دستیابی به این هدف مورد توجه قرار می‌گیرد؛ چرا که وجود قندهای فراوان و متنوع، به خصوص گلوکز و فروکتوز که بیشترین درصد کربوهیدرات‌های آن را به خود اختصاص داده‌اند، خصوصیت یک مادهی سرمامحافظ مناسب را به آن بخشیده‌اند.

علاوه بر این، عسل طبیعی حاوی پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، مواد آلی و معدنی مختلف است. موارد ذکر شده این امکان را فراهم می-آورند که استفاده از این ماده، اثرات تغذیه‌ای، دارویی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسمی، ضدالتهاب و ضدمیکروبی روی سلول‌های زنده داشته باشد (٤، ۱۱، ۱۹).

برخورداری از چنین ویژگی‌های منحصر به فردی ما را بر آن داشت که جهت بهینه‌سازی محیط انجماد شیشه‌ای از عسل طبیعی به عنوان مادهی سرمامحافظ نفوذناپذیر جایگزین ساکارز در انجماد بلاستوسیست موش استفاده کنیم و تاثیر آن را بر نرخ زنده‌مانی، خروج از زونا و لانه‌گزینی مورد ارزیابی قرار دهیم.

مواد و روش کار

در این تحقیق از موش‌های نژاد NMRI استفاده گردید.

استحصال رویان: تحریک تخمک‌گذاری موش‌های مادهی ۱۰-۸ هفته‌ای از طریق تزریق درون صفاقی ۷ واحد بین‌المللی هورمون گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (Gonaser®, Laboratorios Hipra) و به فاصله‌ی ٤۸ ساعت بعد، همین مقدار از هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (111 , Pregnyl® Darou pakhsh) صورت گرفت. بلافاصله موش‌های ماده به نسبت ۱:۱ با موش‌های نر بالغ جفت انداخته شدند و صبح روز بعد از نظر دارا بودن پلاک واژنی بررسی گشتند. پس از گذشت حدود ۸٦ ساعت، موش‌های مادهی پلاک مثبت از طریق جابجایی مهره‌ی گردنی کشته و تشریح شدند و بلاستوسیست‌ها توسط جریان محیط M2 (M7167; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) از داخل لوله‌های رحمی جمع‌آوری گردیدند. در نهایت، بلاستوسیست‌هایی که ظاهری طبیعی داشتند به قطره‌های محیط (MR- KSOM 121-L; Millipore, Billerica, MA, USA)

منتقل گشتند و پتری دیش درون انکوباتور با دمای ۳۷ °C، رطوبت ۹۷٪ و CO_2 ۵٪ قرار گرفت.

انجماد شیشه‌ای: فرایند انجماد با استفاده از روش Kuwayama با اندکی تغییر انجام شد (۱۰).

در ابتدا گروه‌های ۱۵-۱۰ عددی بلاستوسیست‌ها در محیط پایه (Washing Solution: WS) شامل TCM-199 (22340-020, Gibco) و ۲۰٪ سرم جنین گاوی (10270, Gibco) شستشو داده شدند. سپس به منظور متعادل‌سازی، حدود ۱۵ دقیقه درون قطرات محیط ES (Equilibration Solution) حاوی محیط پایه، ۷/۵٪ اتیلن گلیکول (324558, Sigma) و ۷/۵٪ دی‌متیل سولفوکسید (D-2650, Sigma) نگهداری شدند.

در ادامه، رویان‌ها در مجموع طی ۱ دقیقه در قطره‌های محیط انجمادی (Vitrification Solution: VS) شسته شده و با کم‌ترین حجم محلول بر روی کرایوتاپ قرار گرفتند و کرایوتاپ سریعا درون نیتروژن مایع غوطه‌ور گردید.

ذوب: به منظور انجام فرایند ذوب، کرایوتاپ از نیتروژن مایع، خارج و بلافاصله درون محلول ذوب (Thawing Solution: TS) فرو برده شد.

بلاستوسیست‌ها حدود ۱ دقیقه درون TS نگهداری شدند. رویان‌ها پس از جمع‌آوری، وارد قطره‌های محلول رقیق‌سازی (Dilution Solution: DS) شدند و پس از گذشت ۳ دقیقه، جهت شستشوی نهایی به قطرات WS منتقل گشتند. در نهایت، بلاستوسیست‌ها به پتری دیش KSOM منتقل و درون انکوباتور نگهداری شدند.

انتقال بلاستوسیست به مادرخوانده: موش‌های ماده‌ی ۱۰-۸ هفته‌ای دارای وزن تقریبی۴۰gr-۳۵ ، به نسبت ۱:۱ با موش‌های نر وازکتومی شده، جفت‌اندازی شدند. صبح روز بعد به منظور تایید صحت عمل جفت‌گیری، واژن موش‌های ماده چک شد. موش‌هایی که دارای پلاک واژنی بودند از سایرین جدا گشتند تا به عنوان مادر کاذب و پذیرنده‌ی رویان‌های منجمد-ذوب شده استفاده شوند. دو روز پس از چک کردن پلاک واژنی، موش‌های پلاک مثبت، تحت تزریق µl ۳۰۰ داروی بیهوشی، شامل کتامین (1110282-01, IMAN VA SABA) و زایلزین (1110284-02, IMAN VA SABA) بیهوش شدند. سپس موهای ناحیه‌ی پشتی تراشیده و در فاصله‌ی ۰/۵ سانتی‌متری از خط میانی پشتی، بین برآمدگی پشت و نقطه‌ی اتصال پا و شکم یک برش ایجاد گردید. پس از بیرون آوردن شاخ رحم، به کمک سرنگ انسولین سوراخی در دیواره‌ی رحم ایجاد شد و سپس با رعایت دقت و سرعت عمل، سر پیپت پاستور استریل که از قبل، ۸ عدد رویان منجمد-ذوب شده به همراه حداقل محیط KSOM در آن کشیده شده بود، وارد لوله‌ی رحمی شد و بلاستوسیست‌ها درون آن تخلیه شدند و در نهایت ،پرده‌ی صفاق و متعاقب آن پوست حیوان، بخیه زده شدند.

بررسی لانه‌گزینی: سه روز پس از انتقال، این موش‌ها مجددا بیهوش گردیدند و µl ۲۰۰ رنگ ایوانس‌بلو (E2139, SIGMA) ۱٪ به صورت درون وریدی به سیاهرگ دمی آن‌ها تزریق شد. پس از ۱۵ دقیقه، موش‌ها به روش جابجایی مهره‌ی گردنی کشته و پس از تشریح، نقاط لانه‌گزینی شده به صورت دانه‌های تسبیح آبی رنگ نمایان شدند (شکل۱).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های حاصل از هر آزمایش با حداقل سه مرتبه تکرار، توسط نرم‌افزار آماری SPSS16 مورد بررسی قرار گرفتند و بر اساس رابطه Mean ± SD (انحراف معیار ± میانگین) گزارش شدند. تست Duncan برای بررسی‌های چند-گانه استفاده گردید. در مورد تمام نمونه‌ها، تفاوت در $p < ۰/۰۱$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

تعیین غلظت بهینهی عسل طبیعی، به عنوان مادهی سرمامحافظ نفوذناپذیر، در محیط انجماد: بدین منظور، محلولهای انجمادی با سه غلظت مختلف از عسل طبیعی تهیه شدند. محیطهای VS_1، VS_2 و VS_3 هر کدام به ترتیب شامل غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ مولار عسل طبیعی در محیط پایهی محتوی ۱۵٪ EG و ۱۵٪ DMSO بودند. بلاستوسیستهای درونتنی، بلافاصله پس از استحصال، به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. سپس گروه اول، دوم و سوم، هر کدام به ترتیب با استفاده از یکی از محیطهای انجمادی ساخته شده، منجمد و ذوب گشتند. گروه چهارم نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و بلاستوسیستهای این گروه با استفاده از محیط انجمادی حاوی غلظت ۰/۵ مولار ساکارز (S-9387 Sigma)، منجمد و ذوب گشتند. با توجه به نتایج حاصل از نرخ زندهمانی و خروج از زونای هر گروه، محیط انجمادی بهینه تعیین شد.

تعیین غلظت بهینهی عسل طبیعی در محیطهای ذوب و رقیقسازی: مطابق جدول ۱، سه گروه، محیط ذوب و رقیقسازی تهیه شد. بلاستوسیستهای درونتنی، بلافاصله پس از استحصال، به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. سپس گروه اول، دوم و سوم، هر کدام با استفاده از محیط انجمادی حاوی ساکارز با غلظت ۰/۵ مولار و یکی از سه گروه محیط ذوب و رقیقسازی ساخته شده، منجمد و ذوب گشتند. گروه چهارم نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و بلاستوسیستهای این گروه با استفاده از محیطهای انجماد، ذوب و رقیقسازی حاوی ساکارز، منجمد و ذوب شدند. با توجه به نتایج حاصل از نرخ زندهمانی و خروج از زونای هر گروه، محیطهای ذوب و رقیقسازی بهینه تعیین شدن.

اثر استفاده از عسل طبیعی به عنوان مادهی سرمامحافظ نفوذناپذیر در انجماد شیشهای، بر نرخ زندهمانی، خروج از زونا و لانهگزینی: بلاستوسیستها پس از استحصال، به طور تصادفی به دو گروه اصلی تقسیم شدند. تیمار کنترل با استفاده از محلولهای انجماد و ذوب حاوی ساکارز و تیمار عسل توسط محلولهای انجماد و ذوب محتوی عسل طبیعی منجمد و ذوب گشتند (جدول ۲). رویانها پس از ذوب، به مدت ۱۲ ساعت، درون انکوباتور با دمای ۳۷ °C، رطوبت ۹۷٪ و سطح CO_2 ۵٪ نگهداری شدند و سپس از لحاظ نرخ زندهمانی و خروج از زونا مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تعدادی از بلاستوسیستها نیز به منظور ارزیابی نرخ لانهگزینی مورد استفاده قرار گرفتند؛ به طوری که به یک شاخ رحم موش مادر کاذب، بلاستوسیستهای تیمار کنترل و به شاخ رحم دیگر همان موش، بلاستوسیستهای تیمار عسل، منتقل شدند.

جدول ۱- محلولهای ذوب و رقیقسازی حاوی عسل طبیعی

	محلول ذوب (TS)	محلول رقیقسازی (DS)
گروه اول	TCM، ۲۰٪ سرم جنین گاوی و M ۱ عسل طبیعی	TCM، ۲۰٪ سرم جنین گاوی و M ۰/۵ عسل
گروه دوم	TCM، ۲۰٪ سرم جنین گاوی و M ۲ عسل طبیعی	TCM، ۲۰٪ سرم جنین گاوی و M ۱ عسل
گروه سوم	TCM، ۲۰٪ سرم جنین گاوی و M ۳ عسل طبیعی	TCM، ۲۰٪ سرم جنین گاوی و M ۱/۵ عسل

جدول ۲- محلول‌های مورد نیاز جهت انجماد و ذوب- تیمار کنترل و عسل طبیعی

گروه	VS	TS	DS
تیمار کنترل	۱۵٪ EG، ۱۵٪ DMSO و ۰/۵ M ساکارز در WS	۱ M ساکارز در WS	۰/۵ M ساکارز در WS
تیمار عسل طبیعی	۱۵٪ EG، ۱۵٪ DMSO و ۱ M عسل طبیعی در WS	۲ M عسل طبیعی در WS	۱ M عسل طبیعی در WS

نتایج

تعیین غلظت بهینه‌ی عسل طبیعی، به عنوان ماده‌ی سرمامحافظ نفوذناپذیر، در محیط انجماد: بر اساس یافته‌های خلاصه شده در جدول ۳، نرخ زنده‌مانی در گروه‌هایی که با استفاده از محیط انجمادی حاوی عسل طبیعی با غلظت ۰/۵ و ۱ M منجمد و ذوب گشتند، تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل، نشان نداد (به ترتیب ۹۶/٤، ۹٤/٦ و ۹۷/۹). در حالی که این نرخ در بلاستوسیست‌هایی توسط محیط انجمادی حاوی عسل طبیعی با غلظت ۲ M منجمد و ذوب گشتند، به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، پایین‌تر بود (۸۷/۱). در مورد میزان خروج از زونا، تنها گروهی که تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد، محیط انجمادی حاوی عسل طبیعی با غلظت ۱ M بود (به ترتیب ٤۱/۹ و ٤۳/٤). این در حالی بود که گروه اول و سوم، نرخ خروج از زونای به مراتب پایین‌تری نسبت به گروه کنترل داشتند (به ترتیب ۱۹/۵و ۲۰/٤).

تعیین غلظت بهینه‌ی عسل طبیعی، به عنوان ماده‌ی سرمامحافظ نفوذناپذیر، در محیط‌های ذوب و رقیق-سازی: داده‌های به دست‌آمده، حاکی از این بود که استفاده از گروه دوم محیط‌های ذوب و رقیق‌سازی، نرخ زنده‌مانی و خروج از زونای مشابه با گروه کنترل در پی داشت (نرخ زنده‌مانی: ۹٤/۸ و ۹۷/٦؛ نرخ خروج از زونا: ۲۳/٦ و ۲۵/٤). هرچند تفاوت معنی-داری بین نرخ خروج از زونای گروه اول و کنترل مشاهده نشد (۱۹/٦)، میزان زنده‌مانی رویان‌های منجمد-ذوب شده توسط این گروه، به طور معنی-داری از گروه کنترل پایین‌تر بود (۹۰/۹). گروه سوم، نه تنها از نظر نرخ زنده‌مانی (۸٦/۷) بلکه از لحاظ میزان خروج از زونا (۱۳/۳) نیز، نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌دار نشان داد (جدول ٤).

بررسی تاثیر تیمارهای مختلف بر نرخ زنده‌مانی، خروج از زونا و لانه‌گزینی در بلاستوسیست‌های منجمد-ذوب شده‌ی موش: نتایج حاصل، مطابق جدول ۵، تفاوت معنی‌داری را در میزان زنده‌مانی و خروج از زونای گروه‌های مورد آزمایش، نشان نداد. بلاستوسیست‌های منجمد-ذوب شده با استفاده از محیط‌های حاوی غلظت‌های بهینه‌ی عسل طبیعی، در مقایسه با گروه کنترل انجمادی ساکارز، نه تنها در میزان زنده‌مانی (به ترتیب ۹٤/۵ و ۹٦/۵)، بلکه در نرخ خروج از زونا (به ترتیب ۳۸/۳ و ٤۰/۸) نیز نتایجی مشابه نشان دادند. نتایج حاصل از بررسی میزان لانه‌گزینی نیز در نمودار ۱ حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های انجمادی عسل طبیعی و ساکارز بود (به ترتیب ٦/۹ ± ٤۷/٦ و ۸/۸ ± ٥٤/۸).

جدول ۳- نرخ زندهمانی و خروج از زونا در بلاستوسیستهای منجمد شده با محیطهای انجمادی حاوی غلظتهای مختلف عسل طبیعی، به عنوان مادهی سرمامحافظ نفوذناپذیر جایگزین ساکارز

گروه مورد آزمایش	نرخ زندهمانی(٪)	نرخ خروج از زونا (٪)
VS_1	۹٦/٤ ± ٥^{a}	۱۹/٥ ± ۲/۳^{b}
VS_2	۹٤/٦ ± ۲/٥^{a}	٤۳/٤ ± ٤/۸^{a}
VS_3	۸۷/۱ ± ۲/٥^{b}	۲۰/٤ ± ٤/٤^{b}
کنترل	۹۷/۹ ± ۱/٦^{a}	٤۱/۹ ± ۲/٦^{a}

کنترل، VS_1، VS_2 و VS_3 به ترتیب شامل غلظت M ۰/٥ ساکارز، ۰/٥، ۱و M ۲ عسل طبیعی در محیط انجمادی بودند. دادهها حاصل میانگین ۳ تکرار میباشند. در هر ستون، $^{a, b}$ تفاوت معنیدار بین گروهها را نشان میدهند ($p < ۰/۰۱$).

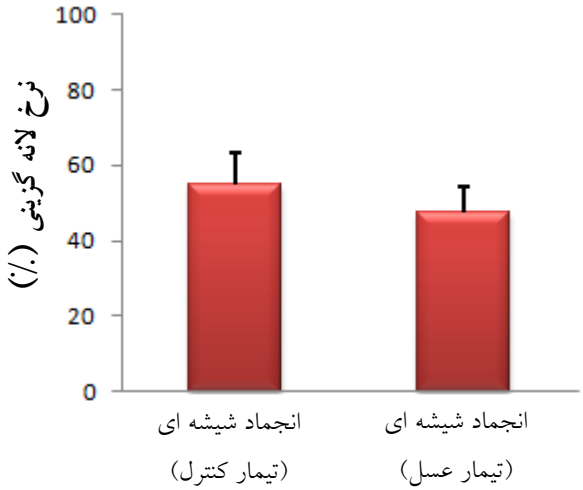
جدول ٤- نرخ زندهمانی و خروج از زونا در بلاستوسیستهای منجمد شده به وسیلهی محیط انجمادی ساکارز و ذوب شده توسط محیطهای حاوی غلظتهای مختلف عسل طبیعی، به عنوان مادهی سرمامحافظ نفوذناپذیر جایگزین

گروه مورد آزمایش	نرخ زندهمانی(٪)	نرخ خروج از زونا (٪)
گروه ۱	۹۰/۹ ± ۱/۳^{bc}	۱۹/٦ ± ٤/۲ ^{ab}
گروه ۲	۹٤/۸ ± ۰/۸^{ab}	۲۳/٦ ± ۰/٥ ^{a}
گروه ۳	۸٦/۷ ± ۱/٤^{c}	۱۳/۳ ± ۱/٤ ^{b}
کنترل	۹۷/٦ ± ۳/۳ ^{a}	۲٥/٤ ± ۳ ^{a}

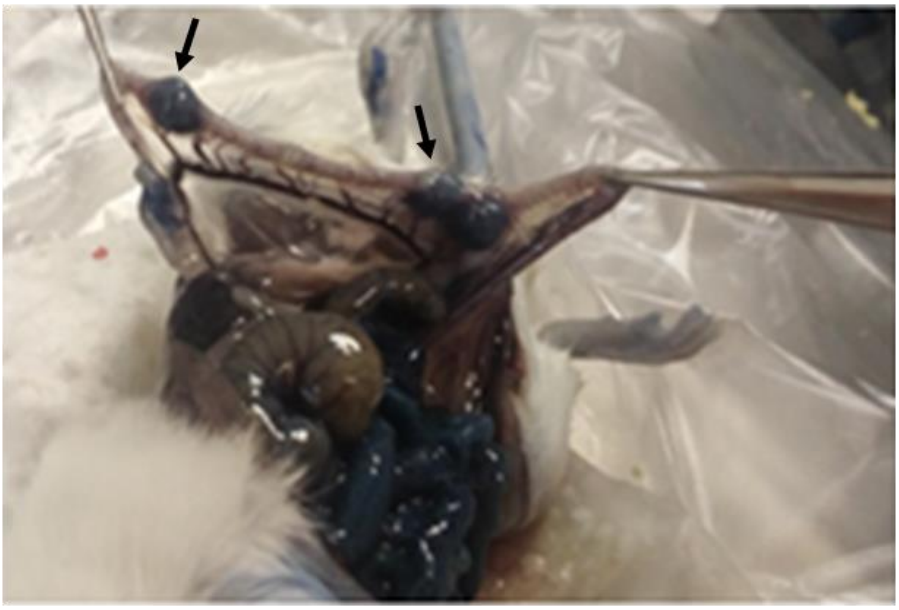
کنترل، گروه۱، ۲ و ۳ به ترتیب شامل غلظت M ۰/٥ ساکارز، ۰/٥، ۱و M ۱/٥ عسل طبیعی در محیط رقیقسازی بودند. دادهها حاصل میانگین ۳ تکرار میباشند. $^{a, b, c}$ تفاوت معنیدار بین گروهها را نشان میدهند ($p < ۰/۰۱$).

جدول ٥- مقایسهی تاثیر تیمارهای مختلف بر نرخ زندهمانی و خروج از زونا

گروه مورد آزمایش	نرخ زندهمانی(٪)	نرخ خروج از زونا (٪)
انجماد شیشهای (تیمار کنترل)	۹٦/٥ ± ۳/٤	٤۰/۸ ± ٤
انجماد شیشهای (تیمار عسل طبیعی)	۹٤/٥ ± ۲/۳	۳۸/۳ ± ۱/۲



نمودار ۱- مقایسه‌ی تاثیر تیمارهای مختلف بر نرخ لانه‌گزینی داده‌ها حاصل میانگین ۵ تکرار می‌باشند ($p < ۰/۰۱$).



شکل ۱- رنگ‌آمیزی با ایوانس بلو. نقاط برجسته مشخص شده با فلش، رویان‌های لانه‌گزینی شده را نشان می‌دهند.

بحث

در مبحث انجماد شیشه‌ای، مواد سرمامحافظ، به خصوص نوع نفوذناپذیر آن‌ها قادرند آسیب‌های سلولی از قبیل تشکیل کریستال یخ، شوک اسمزی و سمیت سلولی را تقلیل بخشند (۱، ۱۸). از گذشته تا به امروز، ساکارز، پرکاربردترین ماده‌ی سرمامحافظ نفوذناپذیر در انجماد شیشه‌ای رویان بوده است؛ بدین معنی که این دی‌ساکارید می‌تواند به طور موثری مانع بروز آسیب‌های لاینفک پروسه‌ی انجماد شود (۱٤، ۱۷).

جایگزین کردن ساکارز با ماده‌ی سرمامحافظ دیگری که قادر به ایفای نقشی چندگانه باشد، شرایط مساعد و مطلوبی را برای دست‌یابی به حداکثر کارایی فرایند انجماد شیشه‌ای فراهم خواهد آورد. در این راستا، مطالعه‌ی حاضر، تلاشی در جهت بررسی تاثیر استفاده از عسل طبیعی به عنوان ماده‌ی سرمامحافظ نفوذناپذیر

جایگزین ساکارز، بر ویژگی‌های بلاستوسیست موش پس از ذوب می‌باشد.

نتایج حاصل نشان داد که استفاده از عسل طبیعی با غلظت ۱ مولار در محیط انجمادی، نه تنها در زمینه‌ی میزان زنده‌مانی توانسته به خوبی گروه کنترل عمل کند، بلکه این قابلیت را داشته که نرخ خروج از زونا و لانه‌گزینی را نیز در سطح گروه کنترل نگه دارد. همان‌طور که پیش‌بینی می‌کردیم، توانایی محلول انجمادی حاوی عسل طبیعی در آب‌گیری از رویان، بر مبنای این واقعیت است که ۹۷-۹۵٪ از وزن خشک عسل، شامل قندهاست و مونوساکاریدهای گلوکز و فروکتوز ۸۵-۷۵ درصد قندهای آن را تشکیل می‌دهند (۵).

مقدار اندکی از انواع سایر قندها مثل دی‌ساکاریدها (ساکارز، مالتوز و ایزومالتوز) و تعدادی از تری-ساکاریدها و اولیگوساکاریدها نیز در ترکیب عسل وجود دارند. در واقع، استفاده از عسل طبیعی مانند حالتی است که ترکیب هم‌زمان چند CPA نفوذناپذیر مختلف، به کار گرفته شود. نتایج مثبت مطالعاتی که در آن‌ها از ترکیب مونو و دی‌ساکاریدها در انجماد اسپرم بز (۱۵) و رویان گاو (۲۰)استفاده شده بود و منجر به بهبود زنده‌مانی پس از ذوب گردیده بود، فرضیه‌ی ما را تایید می‌نماید.

میزان آب‌گیری به غلظت عسل بستگی دارد؛ بنابراین، وجود موازنه‌ی درستی بین غلظت مادهی سرمامحافظ نفوذ ناپذیر، فشار اسمزی و آب‌گیری، لازم و ضروری است. محیط انجماد ایده‌آل، باید حاوی ماکزیمم غلظت قند باشد، به طوری که آب‌گیری به حداکثر میزان خود برسد. اما در عین حال، غلظت قند نباید به حدی بالا باشد که از آستانه‌ی تحمل اسموتیک رویان، تجاوز کند (٦). همان‌طور که می‌دانیم، در مورد بلاستوسیست، عمده‌ی آب‌گیری باید از حفره‌ی بلاستوسل صورت پذیرد؛ زیرا آب فراوان موجود در این حفره، مانند سدی مانع دسترسی سلول‌های درونی رویان به مواد سرمامحافظ می‌شود (٢٤).

در این مطالعه، به منظور ایجاد فشار اسمزی مناسب و کاهش حجم مایع بلاستوسل، سه غلظت مختلف از عسل طبیعی را مورد آزمایش قرار دادیم. از نتایج حاصل، این‌گونه بر می‌آید که احتمالا استفاده از غلظت پایین (M ۰/۵) به آب‌گیری ناکافی انجامیده و تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی را به دنبال داشته باشد. از سوی دیگر، نرخ زنده‌مانی ۸۷٪ ای که هنگام به کارگیری غلظت بالاتر (M ۲)، با آن مواجه شدیم را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که اسمولاریته-ی محیط خارجی به شدت افزایش یافته و به افت سریع حجمی منجر شده که ممکن است باعث آسیب مکانیکی و تخریب ساختمان غشاهای سلولی گردیده باشد.

در سال ۲۰۱۲، Alfoteisy و همکارانش گزارش کردند که محیط انجمادی حاوی غلظت M ۱ عسل طبیعی، قادر به آب‌گیری مشابه با محیط حاوی M ۰/۵ ساکارز، از تخمک گاو می‌باشد. آن‌ها نشان دادند که این غلظت عسل می‌تواند طی ٦۰ ثانیه منجر به آب‌گیری از تخمک گاو، تا ٤٦٪ حجم اولیه‌ی آن شود که این میزان آب‌گیری در این مدت زمان، کافی و بی‌خطر می‌باشد (۲).

این امر که غلظت ۱ مولار عسل طبیعی، عملکردی مشابه با غلظت ۰/۵ مولار ساکارز را در آب‌گیری از خود بروز می‌دهد، می‌توان به حضور گلوکز و فروکتوز در ترکیب عسل مربوط دانست. مونو-ساکاریدها گرانروی پایین‌تری نسبت به دی‌ساکاریدها دارند؛ بنابراین دور از انتظار نیست که به منظور ایجاد محیط خارج سلولی چگال که قادر به ایجاد شیب اسمزی مناسب برای خروج آب باشد، غلظت بالاتری از آن‌ها لازم باشد (۱۳).

مطالعات دیگری بر مبنای استفاده از عسل به عنوان ماده‌ی سرمامحافظ نفوذناپذیر در انجماد اسپرم گونه-های مختلف وجود دارد که همگی بر تاثیر مثبت این ترکیب طبیعی بر کیفیت اسپرم، پس از ذوب دلالت دارند. در این مطالعات از غلظت‌های پایین عسل استفاده شده است که با توجه به اندازه و شکل اسپرم در مقایسه با تخمک و رویان، کاملا منطقی به نظر می‌رسد. از آن‌جایی که حجم سیتوپلاسم اسپرم و مایعات درون آن بسیار اندک است، به منظور آب-گیری، به محیط خارج سلولی با غلظت بالا احتیاج نیست؛ در غیر این صورت، اسپرم دچار آسیب‌های فیزیکی خواهد شد (۷، ۲۵).

نتیجه‌گیری

در انتها از مجموعه‌ی نتایج حاصله در رابطه با نرخ زنده‌مانی، خروج از زونا و لانه‌گزینی رویان‌های منجمد-ذوب شده با محلول‌های حاوی عسل طبیعی، به عنوان ماده‌ی سرمامحافظ نفوذناپذیر می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیب طبیعی قابلیت جایگزینی با ساکارز دارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری جهت تامین هزینه‌های این پژوهش (شماره طرح : ۵۴۳) کمال تشکر و قدردانی اعلام می‌گردد.

منابع

1. AbdelHafez FF., Desai N., Abou-Setta AM., Falcone T., Goldfarb J., 2010. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta- analysis. *Reproductive Biomedicine Oonline*, 20(2): 209-222.

2. Alfoteisy B.A., 2012. Natural honey as a cryoprotectant to improve viability of vitrified bovine oocytes. MSc Thesis, Department of Veterinary Biomedical Sciences, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada. 92 pp.

3. Arav A., 2014. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 81(1): 96-102.

4. Bogdanov S., Jurendic T., Sieber R., Gallmann P., 2008. Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6): 677-89.

5. Bogdanov S., 2012. Honey as nutrient and functional food. *Proteins*, 1100:1400-2700.

6. Davidson A.F., Benson J.D., Higgins A.Z., 2014. Mathematically optimized cryoprotectant equilibration procedures for cryopreservation of human oocytes. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 11: 13.

7. El-sheshtawy R.I., El-badry D.A., Gamal A., El-nattat W.S., Almatty A.M.A., 2016. Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5: 331-334.

8. Eroglu A., Bailey SE., Toner M., Toth TL., 2009. Successful cryopreservation of mouse oocytes by using low concentrations of trehalose and dimethylsulfoxide. *Biology of Reproduction*, 80(1): 70-78.

9. Eto T., Takahashi R., Kamisako T., Hioki K., Sotomaru Y., 2014. A study on cryoprotectant solution suitable for vitrification of rat two-cell stage embryos. *Cryobiology*, 68(1): 147-151.

10. Kuwayama M., 2007. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 67:73-80.

11. Manyi-Loh C.E., Clarke A.M., Ndip N., 2011. An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *African Journal of Microbiology Research*, 5(8): 844-852.

12. McWilliams R., Gibbons W., Leibo S., 1995. Fertilization and early embryology:

Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono-and disaccharides. *Human Reproduction*, 10(5): 1163-1171.

13. Moore K., Bonilla A.Q., 2006. Cryopreservation of mammalian embryos: the state of the art. *Annual Review of Biomedical Sciences*, 8: 19-32.

14. Murakami M., Egashira A., Tanaka K., Mine C., Otsubo H., Kuramoto T., 2014. Perinatal outcomes for transfer of blastocysts vitrified and warmed in defined solutions with recombinant human albumin: 374 babies born after 898 embryo transfers. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31: 1605-1610.

15. Naing S., Wahid H., Azam K.M., Rosnina Y., Zuki A., Kazhal S., Bukar M., Thein M., Kyaw T., San M., 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 122: 23-28.

16. Nynca J., Judycka S., Liszewska E., Dobosz S., Grudniewska J., Arai K., 2016. Utility of different sugar extenders for cryopreservation and post-thaw storage of sperm from Salmonidae species. *Aquaculture*, 464: 340-348.

17. Paul A.K., Liang Y., Nagai T., Parnpai R., 2014. In Vitro Development Potentiality of Expanded Bovine Blastocysts Subsequent to Cryotop Vitrification. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 44: 513.

18. Pereira R., Marques C., 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and Tissue Banking*, 9(4): 267-277.

19. Perez RA., Iglesias MT., Pueyo E., Gonzalez M., de Lorenzo C., 2007. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2): 360-365.

20. Saito N., Imai K., Tomizawa M., 1994. Effect of sugars- addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 41(5): 1053-1060.

21. Sakkas D., Urner F., Menezo Y., Leppens G., 1993. Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage, and viability of mouse embryos in vitro. *Biology of Reproduction*, 49(6):1288-1292.

22. Sanchez R., Risopatrón J., Schulz M., Villegas J., Isachenko V., Kreinberg R., 2011. Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia*, 43(4): 233-241.

23. Somfai T., Nguyen Thi M., Noguchi J., Kaneko H., Kashiwazaki N., Kikuchi K., 2015. Optimization of cryoprotectant treatment for the vitrification of immature cumulus-enclosed porcine oocytes: comparison of sugars, combinations of permeating cryoprotectants and equilibration regimens. *The Journal of Reproduction and Development*, 61(6): 571-579.

24. Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche C., Standaert V., Van Roosendaal E., Vandervorst M., Bollen N., Zech H., Mukaida T., Takahashi K., 2002. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Human Reproduction*, 17: 744-751

25. Yimer N., Muhammad N., Sarsaifi K., Rosnina Y., Wahid H., Khumran A., Kaka A., 2015. Effect of honey supplementation into Tris Extender on Cryopreservation of Bull Spermatozoa. *Malaysian Journal of Animal Science*, 18: 47-54.