بسم الله الرحمن الرحیم

پروتکل انجماد شیشه ای

آزمایشگاه تحقیقاتی ART

تابستان ۹۳

معرفی:

بلوغ آزمایشگاهی(IVM) و انجماد تخمک های نابالغ به عنوان یک بحث متداول برای درمان ناباروری می باشد.

انجماد می تواند برای بیماران با شرایط خاص مفید باشد. یک روش رایج ایجاد شده برای انجماد اووسیت انسانی و جنین، تکنولوژی انجماد شیشه ای (vitrification)است. در طی سال های اخیر، مطالعات نشان داده است که انجماد شیشه ای، یک چشم انداز جدید در زمینه انجماد اووسیت می باشد و اثرات تخریبی کمتری نسبت به سرد کردن آهسته دارد.

انجماد شیشه‌ای

برای انجام انجماد به روش انجماد شیشه‌ای، به دو محیط نیاز داریم:

۱-محیط موازنه (ES)

۲-محیط انجماد شیشه‌ای (VS)

وسایل مورد نیاز

۱-ظرف چند خانه

۲- پاستور پیپت

۳- استریو میکروسکوپ

۴-تایمر زمان سنج

۵- نیتروژن مایع

۶- کرایوتاپ

۷- ظرف مناسب جهت ریختن نیتروژن مایع

۸-تانک نیتروژن

۹- پنس یا انبرک

۱۰-کن و کنیستر جهت قرار دادن نمونه در تانک نیتروژن

ساختن محیط موازنه (ES)

۱-ابتدا محیط $Ham'sF_{10}$ را با ۲۰٪ سرم آلبومین انسانی (HSA) آماده می‌نماییم.

۲- ۷/۵٪ اتیلن گلیکول (EG) را به آن اضافه کرده، پس از اینکه به خوبی مخلوط گردید، ۷/۵٪ دی متیل سولفوکساید (DMSO) را اضافه و هم می زنیم.

۳-درانتها محیط را با فیلتر 0/22µm زیر هود بیولوژیک فیلتر می‌نماییم. محیط موازنه آماده است. این محیط در یخچال تا ۱۵ روز قابل نگهداری می‌باشد.

ساختن محیط VS

۱-ابتدا محیط $Ham'sF_{10}$ را با۲۰٪ سرم آلبومین انسانی (HSA) آماده می‌نمائیم.

۲- ۱۵٪ اتیلن گلیکول (EG) را به آن اضافه کرده و پس از اینکه به خوبی مخلوط گردید، ۱۵٪ دی متیل سولفوکساید (DMSO) را اضافه کرده و هم می زنیم.

۳- ۰/۵ مول ساکروز اضافه می نماییم و محلول بدست آمده را کاملاً مخلوط می‌کنیم.

۴-درانتها محیط با فیلتر 0/22µm زیر هود بیولوژیک فیلتر می‌شود. محیط آماده است. این محیط در یخچال تا ۱۵ روز قابل نگهداری می‌باشد.

مراحل انجام انجماد شیشه‌ای

۱- VS, ES در ظرف چند خانه ریخته و برای مدت دو ساعت در انکوباتور می‌گذاریم. برروی درب دیش‌ها عبارت VS , ES و هر اطلاعاتی که لازم باشد یادداشت می‌نماییم. اطلاعات لازم را برروی کرایوتایپ نیز یادداشت می‌نمائیم.

۲-ظرف مخصوص نیتروژن تقریباً پر از نیتروژن مایع می‌کنیم.

۳-پس از آماده کردن وسایل لازم، تخمک‌های درون دیش را از انکوباتور بیرون آورده و درکنار دیش محیط فریز قرار می‌دهیم.

۴-در زیر استریو میکروسکوپ و به کمک پاستور پیپت تخمک را از دیش تخمک به محیط ES وارد می‌نماییم. تخمک در این محیط می بایست بین ۵ تا ۱۵ دقیقه بماند. (Al-Hassani, 2007).

۵-پس از آن تخمک را از محیط ES به محیط VS منتقل کرده و به مدت ۵۰ تا ۶۰ ثانیه در آن نگه می‌داریم. (Al-Hassani, 2007)

۶-بلافاصله به کمک پاستورپیپت و پیپت دهانی از محیط VS بر روی نوک کرایوتاپ منتقل کرده و به داخل نیتروژن مایع وارد می‌کنیم. بهتر است با کمترین مقدار محیط آن را بر روی کرایوتاپ قرار دهیم.

۷-درپوش کرایوتاپ را داخل نیتروژن مایع به کمک پنس، بر روی آن قرار داده و سپس به کمک همان پنس کرایوتاپ را به داخل کنیستر که شماره گذاری شده است می‌فرستیم.

۸-سپس کنیستر را وارد کن که در داخل تانک نیتروژن یا کانتینر قرار دارد و با شماره مشخص شده است وارد می‌نمائیم. بنابراین دقیقاً هر تخمک با مشخص بودن شماره تخمک که بر روی دسته کرایوتاپ نوشته شده است، شماره کنیستر، شماره کن و شماره کانتینر یا تانک نیتروژن قابل شناسایی می‌باشد.

ساختن محیط ذوب

محیط پایه همان $Ham'sF_{10}$ می‌باشد که ۲۰٪ سرم انسانی و یا سرم آلبومین انسانی به آن اضافه شده است. اولین محیط: تحت عنوان محیط ذوب، به محیط پایه ۱ مول ساکروز اضافه می‌نماییم.

محیط دوم: تحت عنوان محیط رقیق شماره ۱، به محیط پایه ۰/۵ مول ساکروز اضافه می‌گردد.

محیط سوم: تحت عنوان محیط رقیق شماره ۲، به محیط پایه ۰/۲۵ مول ساکروز اضافه می‌نمائیم.

محیط چهارم: تحت عنوان محیط شست و شو، که همان محیط پایه است.

پس از ساخت محیط ها آنها را با فیلتر $0.22\mu m$، زیر هود بیولوژیک فیلتر می‌نمائیم.

مراحل انجام ذوب یا گرم کردن تخمک‌های منجمد شده

۱-ابتدا وسایل مورد نیاز را آماده می‌کنیم. ظرف مخصوص نیتروژن را پر از نیتروژن مایع کرده و تانک نیتروژن که محل نگهداری تخمک‌های منجمد شده می‌باشد در نزدیکی آن قرار می‌دهیم.

۲-براساس شماره تخمک که در کدام کن و کنیستر قرار دارد، کنیستر مورد نظر را به کمک پنس از تانک نیتروژن خارج کرده و بلافاصله آن را وارد نیتروژن مایع می‌نمائیم.

۴- کرایوتاپ که شماره تخمک بر روی آن نوشته شده است را از داخل کنیستر خارج کرده و درون نیتروژن مایع رها می‌نماییم. لازم است ظرف چندخانه حاوی محیط‌های ذوب حدود دو ساعت درون انکوباتور قرار داده شود.

۵-ظرف پنج خانه که درون هرکدام براساس شماره هر خانه محیط‌های ذوب ریخته شده است را زیر استریو میکروسکوپ قرار داده و آماده ورود تخمک منجمد می‌باشد. نوک کرایوتاپ حامل تخمک منجمد را وارد خانه شماره یک که حاوی محیط شماره یک یعنی محیط ذوب می‌باشد می‌کنیم. و از طریق میکروسکوپ شاهد وارد شدن تخمک از روی کرایوتاپ به داخل محیط ذوب می باشیم. ۵۰ تا ۶۰ ثانیه تخمک در خانه شماره ۱ می ماند، پس از آن به کمک پیپت پاستور تخمک را وارد خانه شماره ۲ که حاوی محیط رقیق شماره ۱ می‌باشد، می‌نمائیم. مدت زمان قرار گرفتن تخمک در این محیط ۳ دقیقه می‌باشد. سپس تخمک را وارد خانه شماره ۳ نموده که حاوی محیط رقیق شماره ۲ می‌باشد. مدت زمان لازم در این محیط نیز ۳ دقیقه می‌باشد. بعد از این زمان، تخمک را وارد خانه شماره ۴ نموده که حاوی محیط شست و شو می‌باشد. خانه شماره ۵ نیز حاوی محیط شست و شو می‌باشد. در هر یک از محیط‌های شست و شو ۴ تا ۵ بار قرار می‌دهیم. در این زمان تخمک آماده ورود به محیط کشت IVM می‌باشد و مرحله ذوب به پایان می‌رسد.