

اثر انجماد شیشه ای روی میزان بلوغ و فراساختار اووسیت‌های بالغ شده انسانی در محیط آزمایشگاه

عباس شاهی Ph.D.^۱، احمد حسینی Ph.D.^۲

- ۱- دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، یزد، ایران
 ۲- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی، تهران، ایران
 * پست الکترونیک نویسنده مسئول: abas_shahedi2006@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۳

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه ارزیابی احتمالی اثرات انجماد شیشه‌ای روی میزان بلوغ و فراساختار اووسیت‌های بالغ شده انسانی در محیط آزمایشگاه است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۲۹۲ تخمک نابالغ مرحله وزیکول زاینده و متافاز I به دست آمده از بیماران نابارور استفاده شد. تخمک‌ها به دو گروه تقسیم شدند: ۱- تخمک‌های نابالغ مرحله وزیکول زاینده (تعداد=۱۴۵) ۲- تخمک‌های نابالغ مرحله متافاز I (تعداد=۱۴۷). تخمک‌ها ابتدا منجمد شده و سپس ذوب و بالغ شدند. به علاوه از ۱۰ عدد تخمک بالغ شده به صورت *In vivo* به عنوان کنترل استفاده شد. محیط بلوغ شامل Ham's F10 به همراه FSH و LH و مایع فولیکولی بود. بعد از ۳۶ ساعت تخمک‌ها از لحاظ بلوغ و فراساختار مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: میزان زنده ماندن و دژنراسیون تخمک‌ها در گروه متافاز I نسبت به گروه وزیکول زاینده کاهش معنی‌داری داشت. اما میزان بلوغ تخمک‌ها بین دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت ($p < 0/06$). به علاوه میزان توقف بلوغ تخمک‌ها بین دو گروه به طور معنی‌داری بالاتر بود. از نظر فراساختاری تعداد گرانول‌های قشری در هر دو گروه به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. همچنین واکوئل و تجمعات کوچکی از میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک صاف درون سیتوپلاسم اووسیت‌ها دیده شد.

نتیجه گیری: فرآیندهای انجماد و ذوب منجر به تغییرات فراساختاری در نواحی خاصی از اووسیت می‌شوند و احتمالاً کاهش توانایی بلوغ اووسیت‌های منجمد شده می‌تواند مربوط به این تغییرات باشد.

واژگان کلیدی: اووسیت انسانی، انجماد شیشه‌ای، بلوغ آزمایشگاهی، فراساختار

مقدمه

انجماد اووسیت ممکن است یک جایگزین مهم برای نگهداری باروری در خانم‌هایی باشد که نیاز به تعویق انداختن استفاده از گامت‌های خود به دلایل مختلف از جمله داشتن IVF های ناموفق، وقوع سندرم تحریک بیش از حد تخمدان (OHSS) یا ناتوانی در بدست آوردن اسپرم در روز انجام لقاح هستند و نهایتاً یک انتخاب برای خانم‌های بارور جهت نگهداری گامت‌های آن‌ها حتی بعد از اثرات فیزیولوژیک افزایش سن باشد (۱). به علاوه انجماد اووسیت‌های انسانی یک جایگزین منطقی برای حل مشکلات اخلاقی و مذهبی است که برای انجماد جنین وجود دارد و بدون شک کمک موثری برای تکنولوژی‌های تولید مثل است. هر چند که بر خلاف جنین، انجماد اووسیت بالغ سخت است و این به خاطر تفاوت نفوذپذیری غشای اووسیت و جنین، وجود دوکهای میوزی و نهایتاً شرایط فیزیولوژیک مخصوص اووسیت است (۲). اخیراً پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در بهبود تکنیک‌های انجماد اووسیت صورت گرفته و نتیجه آن حاملگی و تولد زنده بوده است (۳). اووسیت بالغ یکی از بزرگترین سلول‌های بدن به اندازه تقریبی ۱۳۰ میکرومتر است و نسبت پایین سطح به حجم اووسیت سبب کارایی کمتر تبادل آب و ضدیخ محافظ انجماد می‌شود و نتیجه اجتناب ناپذیر این است که اووسیت بیشتر مستعد نگهداری آب و در نتیجه تخریب به دلیل ایجاد کریستال‌های یخ در زمان انجماد است (۴). به علاوه نتایج نشان داده است که غشای اووسیت‌های بالغ دارای یک ترکیب لیپیدی متفاوت در مقایسه با اووسیت‌های نابالغ بوده و نسبت به کاهش درجه حرارت و آسیب‌های ناشی از سرما دارای مقاومت کمتری هستند (۴). بنابراین با انجماد اووسیت‌های نابالغ می‌توان بر این مشکلات غلبه نمود. نتایج نشان داده که ۲۰ درصد تخمک‌های به دست آمده طی تحریک تخمدان، نابالغ بوده و در مراحل پایین‌تر بلوغ مثلاً در نظیر مرحله Germinal Vesicle (GV) یا Metaphase I (MI) قرار دارند، لذا می‌توان با انجماد و بلوغ آزمایشگاهی (IVM) In Vitro Maturation در صورت ناموفق بودن درمان از آن‌ها استفاده کرد که این عمل دارای مزایای بی‌شماری از جمله کاهش هزینه‌های درمانی، جلوگیری از عوارض نامطلوب تحریک بیش از حد تخمدان در بیماران دارای سندرم پلی کیستیک تخمدانی (۵) و یا حفظ باروری در بیماران سرطانی می‌باشد (۶). از عدم مزایای انجماد اووسیت‌های

نابالغ نیاز به بلوغ آن‌ها بعد از ذوب است و باید توجه داشت که در این راستا حاملگی‌های اندکی در انسان گزارش شده است (۷). Chian و همکاران (۸) حاملگی و تولدهای زنده‌ای را با استفاده از اووسیت‌های IVM شده انسانی گزارش کردند. بنابراین این تکنولوژی ممکن است برای بیماران و مطالعه انجماد اووسیت‌های نابالغ مفید باشد. Cao و همکاران (۹) نشان داده‌اند که تفاوتی بین میزان زنده ماندن اووسیت‌های انسانی بالغ و نابالغ منجمد شده وجود ندارد، هر چند که توانایی بالغ شدن بلوغ اووسیت‌های نابالغ منجمد شده کاهش می‌یابد. مکانیسم انجماد مسئول میزان زنده ماندن یا بهبود بعد از ذوب و همچنین آسیب‌های فراساختاری است که توسط آن ایجاد می‌شود. ساختارهایی که عمدتاً درگیر می‌شوند عبارتند از: ۱- غشا ۲- اسکلت سلولی ۳- زوناپلوسیدا. دو روش انجماد در واحدهای IVF در دسترس می‌باشد که عبارتند از ۱- انجماد آهسته (Slow Cooling) ۲- انجماد سریع (Vitrification) (۴).

تخمک و جنین در طی انجماد دچار صدمات مورفولوژیکی و عملکردی می‌شوند، میزان صدمه به فاکتورهائی چون اندازه، شکل، نفوذپذیری، کیفیت و حساسیت تخمک و جنین بستگی دارد. همه این عوامل به میزان زیاد در هر گونه بسته به نوع گونه، مرحله تکاملی و روش بلوغ آزمایشگاهی یا درون تنی (in vitro یا in vivo) متفاوت می‌باشد (۱۰). ارزیابی مورفولوژی تخمک در بررسی تکامل جنین می‌تواند موثر باشد (۱۱). در طی بلوغ تخمک هر نوع نقصی که در بلوغ سیتوپلاسمی وجود داشته باشد، می‌تواند تکوین جنینی را تحت تاثیر قرار داده حتی اگر تخمک بلوغ هسته ای طبیعی داشته باشد (۱۲). امروزه متداول‌ترین روش ارزیابی مورفولوژیکی اووسیت میکروسکوپ نوری می‌باشد، ولی این روش جهت تشخیص صلاحیت لقاح و تکامل اووسیت روش کافی نمی‌باشد (۱۳). لذا تکنیک‌های میکروسکوپ الکترونی از آن جهت که می‌توانند اطلاعات وسیعی را از فراساختار سلول و ارگانل‌های آن فراهم نمایند بسیار ارزشمند است (۱۴). تغییرات فراساختاری گرانول‌های قشری، زوناپلوسیدا و سیتوپلاسم اووسیت‌های انسانی که در معرض آبیگری و آبیگری مجدد قرار گرفتند گزارش شده است و این نشان‌دهنده اینست که میکروسکوپ الکترونی می‌تواند خط اول ابزار مورد بررسی باشد (۱۵). هر چند که مطالعات جامع روی

روش تهیه نمونه

الف) پروتکل تحریک تخمدان: برای تحریک تخمدان از Long Protocol استفاده شد (۲۰). بدین ترتیب که از روز ۲۱ سیکل قبلی تحت درمان با ۰/۵ میلی‌لیتر بوسرلین به صورت زیر جلدی قرار گرفتند و با شروع سیکل بوسرلین به ۰/۲۵ میلی‌لیتر کاهش یافت. از روز دوم سیکل بیماران ۱۵۰ تا ۲۲۵ واحد FSH دریافت کردند و از روز هشتم سیکل تحت سونوگرافی واژینال قرار گرفتند. دوز FSH بر اساس سونوگرافی تنظیم شد. زمانی که حداقل دو فولیکول با قطر بالای ۱۸ میلی‌متر وجود داشت، بیماران ۱۰۰۰۰ واحد HCG دریافت کردند و ۳۶ ساعت بعد جمع آوری تخمک‌ها زیر بی‌هوشی عمومی و با استفاده از سونوگرافی واژینال انجام شد. تخمک‌های جمع آوری شده با استفاده از ۸۰ واحد هیالورونیداز (Sigma Co, USA) و پیپتینگ از سلول‌های کومولوس جدا شدند. تخمک‌هایی که در مرحله GV و MI بودند جهت این مطالعه استفاده شدند و آن‌هایی که در مرحله MII بودند برای ICSI استفاده شدند. تنها تخمک‌های مرحله MII از سیکل‌های لغو شده جهت گروه کنترل استفاده شد. ارزیابی تخمک‌ها با استفاده از استریو میکروسکوپ (Olympus Co, Japan) انجام شد.

آماده سازی مایع فولیکولی: آماده سازی مایع فولیکولی مطابق روشی که قبلاً توسط Kim و همکاران (۲۲) گزارش شد تهیه گردید. بعد از جدا سازی اووسیت‌ها از مایع فولیکولی، مایع با دور ۳۵۰۰ RPM و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از این مرحله سلول‌های گرانولوزا و خونی در لوله ته نشین شدند. سپس مایع فولیکولی خالص جهت غیرفعال کردن درون بن ماری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در نهایت با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد.

بلوغ آزمایشگاهی: تخمک‌های نابالغ بعد از انجماد و ذوب برای رسیدن به بلوغ، وارد محیط IVM (۲ تا ۳ عدد تخمک درون یک قطره ۵۰ میکرو لیتر) نموده، به مدت ۳۶ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO₂ ۶ درصد و رطوبت بالا قرار گرفتند. محیط IVM شامل Ham's F10 (Biochrom Co, Germany) غنی شده با FSH&LH (Ferring Co, Germany) و ۴۰ درصد مایع فولیکولی بود. بعد از گذشت زمان مذکور جهت بررسی بلوغ تخمک‌ها از استریومیکروسکوپ استفاده شد. ملاک ارزیابی بلوغ وجود اولین جسم قطبی بود.

اووسیت‌های انسانی فریز شده اندک است و مدارک مربوط به تعیین کیفیت اووسیت‌های انسانی منجمد شده با استفاده از فرا ساختار اخیراً گزارش شده است (۱۶، ۱۷ و ۱۸). با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انتقالی (Transmission Electron Microscopy) نشان داده شده است که گرانول‌های قشری اووسیت‌های بالغ و نابالغ انسانی که با استفاده از ProH و سوکروز فریز منجمد می‌شوند گرانول‌های قشری آن‌ها کاهش یافته و درون سیتوپلاسم آن‌ها واکوئل‌هایی ظاهر می‌شود که احتمالاً به خاطر تخریب ارگانل‌های سیتوپلاسمی است (۱۹). در مطالعه‌ای (۲۰) نشان داده شده که میزان بلوغ اووسیت‌های نابالغ مرحله MI بیشتر از اووسیت‌های نابالغ مرحله GV است. به علاوه در همین مطالعه با استفاده از TEM نشان داده شد مشخص شد که تعداد کمپلکس‌های میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی اووسیت‌های نابالغ مرحله GV در مقایسه با اووسیت‌های نابالغ مرحله MI بعد از بلوغ در محیط کشت افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه انجماد سریع دارای مزایای بیشتری نسبت به انجماد آهسته است (۲۱)، هدف از این مطالعه اثر انجماد سریع روی بلوغ و فراساختار تخمک‌های نابالغ انسانی که در مرحله GV و MI قرار دارند را بعد از انجام IVM می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بنیادی- کاربردی از ۲۹۲ عدد تخمک انسانی به دست آمده از بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری یزد استفاده شد. سن بیماران بین ۲۰ تا ۴۰ سال بود. تخمک‌ها در گروه‌های زیر مورد مطالعه قرار گرفتند:

- گروه کنترل: در این گروه فراساختار تخمک‌های بالغ شده انسانی به صورت In-vivo در ۱۰ مورد بررسی شد.
- گروه IVM شده بعد از عمل انجماد: گروه GV بلوغ یافته در آزمایشگاه: این گروه شامل ۱۴۵ عدد تخمک نابالغ انسانی در مرحله GV بود که بعد از انجام IVM میزان بلوغ و فراساختار آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.
- گروه IVM شده بعد از عمل انجماد: گروه MI بلوغ یافته در آزمایشگاه: این گروه شامل ۱۴۷ عدد تخمک نابالغ انسانی در مرحله MI بود که بعد از انجام IVM میزان بلوغ و فراساختار آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

نمونه‌ها درون محلول ترکیبی Aceton-Resin به ترتیب نسبت‌های (۰-۱، ۱-۳، ۱-۱، ۳-۱) در روتاتور رزین دهی یا Infiltration شدند. سپس نمونه‌ها را با استفاده از رزین ۸۱۲ Epon قالب گیری شده و درون کوره با درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند تا رزین پلیمریزه شود. در ادامه برش‌های Semi-thin (ضخامت ۱ میکرو متر) تهیه کرده و بعد از رنگ آمیزی با تولوئیدین (Toluidine blue) آن‌ها را زیر میکروسکوپ نوری مشاهده کردیم. سپس برش‌های (۶۰ تا ۸۰ نانومتر) را با استفاده از تیغه الماسی تهیه و بر روی گرید قرار داده و آن‌ها را با Uranyl acetate به مدت ۷ دقیقه و Lead citrate به مدت ۱۳ دقیقه رنگ آمیزی شد و با استفاده از میکروسکوپ TEM مورد ارزیابی قرار گرفت (Germany Zeiss).

رعایت اصول اخلاقی پژوهش

این مطالعه با کسب رضایت نامه از بیماران و تصویب در کمیته اخلاق مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری یزد انجام شد.

آنالیز آماری

میزان زنده ماندن، بلوغ، دژنراسیون و توقف تخمک در بین گروه‌ها با استفاده از Chi-squared و میزان پارتنوژنیز تخمک با استفاده از Fisher-exact test محاسبه و مقایسه شدند. همچنین سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. (P<۰/۰۵). آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (version 16, USA) انجام شد.

نتایج

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است تفاوت معنی‌داری در علل ناباروری در دو گروه مشاهده نشد. در گروه GV ۴۸/۳ درصد و در گروه MI ۵۱/۶۹ درصد از ناباروری‌ها مربوط به فاکتور زنانه بود. فاکتور مردانه در گروه GV ۴۹/۱۹ درصد و در گروه MI ۵۰/۸ درصد بود. ناباروری مربوط به هر دو فاکتور در دو گروه GV و MI مورد بررسی قرار گرفت که به ترتیب ۵۴ و ۴۶ درصد در گروه GV و MI بود. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است در گروه GV ۱۲۷ تخمک از ۱۴۵ تخمک بعد از ذوب زنده ماندند (۸۷/۵۸ درصد) و در گروه MI ۱۰۸ تخمک از ۱۴۷ تخمک بعد از ذوب زنده ماندند

روش انجام انجماد شیشه ای: ابتدا تخمک‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه درون محلول تعادل که شامل ۷/۵ درصد اتیلن گلیکول (Merck Co, Germany) و ۷/۵ درصد دی متیل سولفوکساید (Merck Co, Germany) درون محیط Ham's F10 غنی شده با ۲۰ درصد آلبومین سرم انسانی (Plasbumin Co, USA) است قرار گرفت. سپس آن‌ها را به مدت ۴۵ تا ۶۰ ثانیه وارد محلول Vitrification که شامل ۱۵ درصد اتیلن گلیکول (Merck Co, Germany)، ۱۵ درصد دی متیل سولفوکساید (Merck Co, Germany) و ۰/۵ مول ساکارز (Sigma Co, USA) درون محیط Ham's F10 غنی شده با ۲۰ درصد آلبومین سرم انسانی (Plasbumin Co, USA) است شد. بعد از گذشت زمان مذکور تخمک‌ها را به روی Cryotop منتقل کرده و جهت ذخیره درون نیتروژن مایع قرار دادیم.

برای ذوب کردن تخمک‌ها ابتدا آن‌ها درون محلول Ham's F10 حاوی ۲۰ درصد آلبومین سرم انسانی و یک مول ساکارز به مدت یک دقیقه قرار داده شد و سپس جهت آب‌دهی تخمک‌های ذوب شده، آن‌ها را به مدت ۳ تا ۵ دقیقه به ترتیب درون محلول Ham's F10 حاوی ۲۰ درصد آلبومین سرم انسانی با ۰/۵ و ۰/۲۵ مول ساکارز قرار گرفت. در نهایت تخمک‌ها برای ۳ تا ۵ بار درون محلول Ham's F10 حاوی ۲۰ درصد آلبومین سرم انسانی پی‌پت شدند. بعد از این مرحله تخمک‌ها وارد محیط IVM شده و درون انکوباتور قرار گرفتند (۲۳). بعد از گذشت یک ساعت زنده بودن تخمک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۴) و آن‌هایی که دارای سیتوپلاسم تیره و شدیداً گرانوله بودند از مطالعه خارج و بقیه مجدداً درون انکوباتور قرار گرفتند.

مطالعه میکروسکوپ الکترونی ترانس میشن (TEM): جهت

مطالعه با TEM از هر گروه ۱۰ عدد اووسیت انتخاب شد. مراحل کار طبق روشی که قبلاً توسط Nottola و همکاران (۲۵) توضیح داده شد صورت گرفت. نخست اووسیت‌ها در گلو تار آلدئید ۱/۵ درصد به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس اولیه شدند سپس با بافر فسفات ۰/۱ مولار به مدت سی دقیقه (سه تعویض) شستشو شده و وارد آگارز ۱ درصد کردیم. بعد با استفاده از تتراکسید اسمیوم ۱ درصد فیکس ثانویه شده مجدداً تحت شستشو به روش فوق قرار گرفتند. جهت آگیری از غلظت‌های فزاینده استون (۵۰ تا ۱۰۰) در صد هر یک به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. سپس

میزان بلوغ و پارتنوژنیزس تخمک‌ها بین دو گروه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

(۷۳/۴۶ درصد) که بین دو گروه تفاوت معنی‌داری داشت (میزان دژنراسیون $p < 0/004$) و توقف تخمک‌ها ($p < 0/004$) در بین دو گروه تفاوت معنی‌داری داشت. اما در

جدول ۱: مشخصات علل ناباروری در دو گروه GV و MI در ۲۹۲ تخمک.

P-value	۱۴۷) n=(MI	۱۴۵) n=(GV	علل ناباروری
۰/۷۲	۶۱(۵۱/۶۹)	۵۷(۴۸/۳)	فاکتور زنانه
۰/۸۹	۶۳(۵۰/۸)	۶۱(۴۹/۱۹)	فاکتور مردانه
۰/۵	۲۳(۴۶)	۲۷(۵۴)	هر دو

اعداد داخل پرانتز درصد را نشان می‌دهند.

جدول ۲: میزان بلوغ، دژنراسیون، پارتنوژنیزس و Arrest را در دو گروه GV و MI نشان می‌دهد.

P-value	۱۴۷) n=(MI	۱۴۵) n=(GV	متغیرها
۰/۰۰۳	۱۰۸ (۷۳/۴۶)	۱۲۷ (۸۷/۵۸)	میزان زنده ماندن
۰/۰۶	۳۷(۳۴/۲۵)	۵۹(۴۶/۴۵)	بلوغ
۰/۰۰۴	۶۱(۵۶/۴۸)	۴۸(۳۷/۷۹)	دژنراسیون
۰/۳۴	۳(۲/۷۷)	۱(۰/۷۸)	پارتنوژنیزس
۰/۰۴	۷(۶/۴۸)	۱۹(۱۴/۹۶)	Arrest

اعداد داخل پرانتز درصد را نشان می‌دهند.

*تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های GV و MI بعد از عمل انجماد و بلوغ را نشان می‌دهد. ($P < 0/05$ *) و (** $P < 0/01$).

پراکنده شدند. از عمده‌ترین ارگانول‌های سلولی تجمعات شبکه اندوپلاسمی صاف احاطه شده توسط میتوکندری‌ها است (شکل ۳a). همچنین وزیکول‌های کوچکی از شبکه اندوپلاسمیک صاف که توسط میتوکندری‌ها احاطه شده اند به‌طور پراکنده دیده می‌شوند (شکل ۳a). میتوکندری‌ها عمدتاً کروی یا بیضی شکل هستند. تیغه‌های میتوکندری‌ها قوسی شکل یا عرضی بوده و در محیط میتوکندری و به موازات غشای خارجی میتوکندری می‌باشند (شکل ۳a).

بررسی فراساختار تخمک‌های نابالغ مرحله GV بعد از

بررسی فراساختار تخمک‌های بالغ شده به صورت *In vivo*

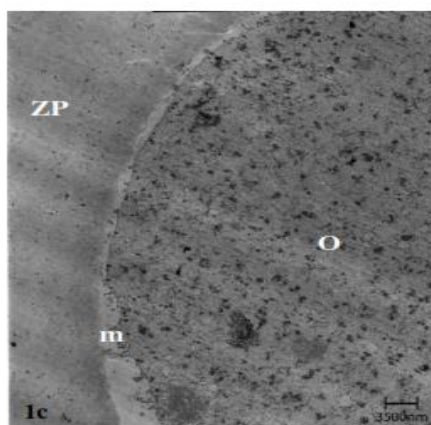
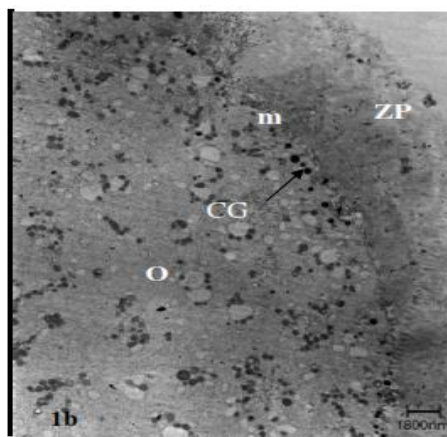
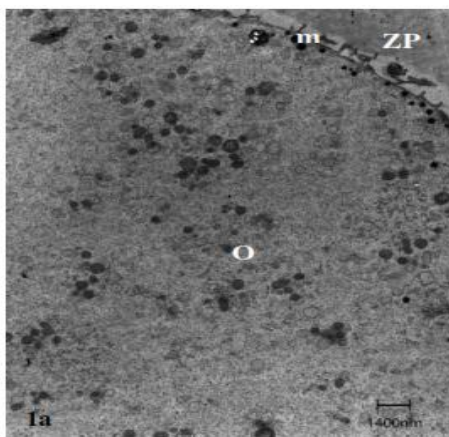
لایه شفاف از مواد فیبری الکترون متراکم تشکیل شده و به‌طور کامل اووسیت را احاطه کرده است (شکل‌های ۱a, ۲a).

فضای دور زرده ای (PVS) بین لایه شفاف و غشای اووسیت مشاهده می‌شود. (شکل ۲a). غشای پلاسمایی در تمام اووسیت‌ها ممتد و میکروویلی‌های فراوانی دارد که به PVS کشیده شده اند (شکل ۲a). گرانول‌های قشری گرد و الکترون متراکم بوده و به‌صورت یک لایه در زیر غشای پلاسمایی مرتب شده اند (شکل ۲a). ارگانول‌های سلولی در سرتاسر سیتوپلاسم

انجماد و بلوغ

همان‌طور که در شکل‌های ۱b و ۲b دیده می‌شود بخش درونی لایه شفاف نسبت به بخش برونی آن الکترون متراکم‌تر بوده و این مربوط به آزاد شدن زود رس گرانول‌های قشری می‌باشد. گرانول‌های قشری گرد و الکترون متراکم بوده و تعداد آن‌ها کاهش یافته است (شکل‌های ۱b و ۲b). تجمعات کوچکی از شبکه اندوپلاسمیک صاف و میتوکندری‌ها دیده می‌شوند که به‌طور تصادفی در سرتاسر سیتوپلاسم پراکنده شده‌اند (شکل ۳b). کمپلکس‌های بزرگ و متعددی از وزیکول‌های شبکه

اندوپلاسمیک صاف و میتوکندری‌ها درون سیتوپلاسم دیده می‌شوند (شکل‌های ۳c). همچنین واکنش‌هایی درون سیتوپلاسم دیده می‌شوند که خالی بوده و اغلب توسط غشای گسسته‌ای احاطه شده‌اند (شکل ۲b). گاهی وقت‌ها لیزوزوم‌های ثانویه با این واکنش‌ها همراه می‌شوند (شکل ۲b). فراساختار غشای پلاسمایی، میکروویلی‌ها و PVS مانند گروه کنترل می‌باشد (شکل ۲b).



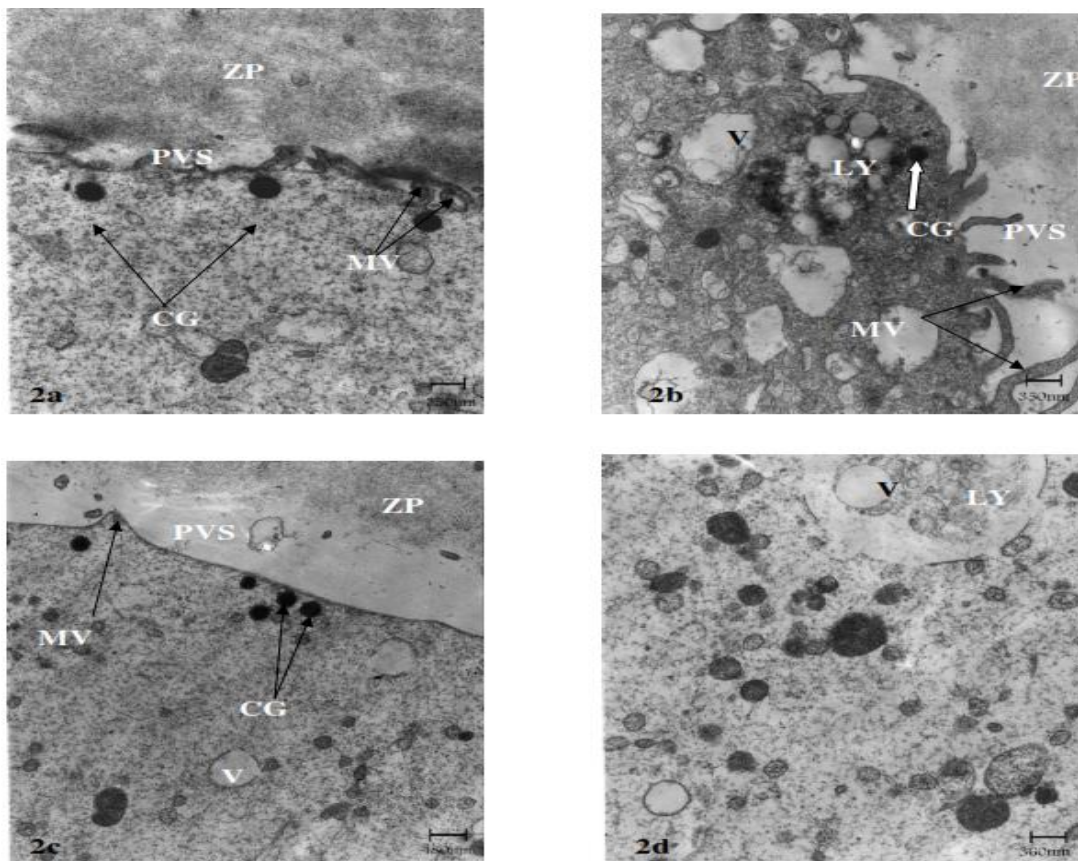
شکل ۱: گروه کنترل (a)، گروه GV بعد از IVM (b)، گروه MI بعد از IVM (c). فراساختار و Microtopography ارگانل‌ها درون سیتوپلاسم اووسیت را نشان می‌دهد. بخش درونی زونا پلوسیدا در گروه GV و MI دارای تراکم الکترونی بالاتری نسبت به گروه کنترل است. O= oocyte; ZP= zona pellucid; m= microvilli; CG= cortical granules.

همان‌طور که در شکل‌های ۱c و ۲c دیده می‌شود بخش درونی لایه شفاف نسبت به بخش برونی آن الکترون متراکم‌تر بوده و این مربوط به آزاد شدن زود رس گرانول‌های قشری می‌باشد.

بررسی فراساختار تخمک‌های نابالغ مرحله MI بعد از انجماد و بلوغ

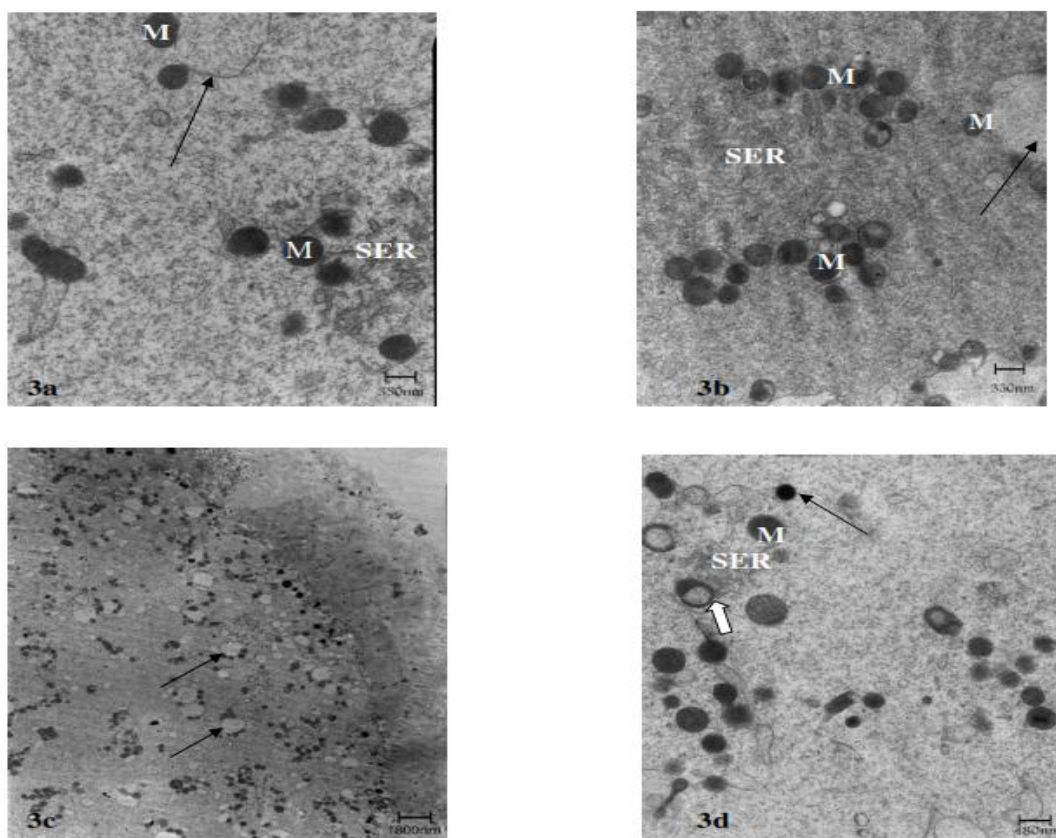
شده اند (شکل ۲d). همچنین واکوئل‌هایی درون سیتوپلاسم دیده می‌شوند که خالی بوده و اغلب توسط غشای گسسته ای احاطه شده اند (شکل ۲c). گاهی وقت‌ها لیزوزوم‌های ثانویه با این واکوئل‌ها همراه می‌شوند (شکل ۲d).

گرانول‌های قشری گرد و الکترون متراکم بوده و تعداد آن‌ها کاهش یافته است (شکل ۲c). میکروویلی‌ها اندک بوده و به‌طور پراکنده بر روی غشای پلاسمایی دیده می‌شوند (شکل ۲c). تجمعات کوچکی از شبکه اندوپلاسمیک صاف و میتوکندری‌ها دیده می‌شوند که به‌طور تصادفی در سرتاسر سیتوپلاسم پراکنده



شکل ۲: گروه کنترل (a)، گروه GV بعد از IVM (b)، گروه MI بعد از IVM (c, d). گرانول‌های قشری به صورت یک لایه ممتد زیر غشای پلاسمایی اووسیت دیده می‌شوند (پیکانها) (a). اما در گروه GV و MI گرانول‌های قشری اندک بوده و یک لایه منقطع را تشکیل می‌دهند (b, c). میکروویلیها متعدد و بلند بوده و به صورت یکنواخت دیده می‌شوند (a, b). اما در گروه C میکروویلیها اندک و کوتاه است. واکوئلها در گروه MI و GV دیده می‌شوند که بعضی وقتها با لیزوزوم همراه هستند (b, d).

ZP= zona pellucida; mv= microvilli; CG= cortical granules; PVS= perivitelline space; V=vacuole; LY=lysosome.



شکل ۳: گروه کنترل (a)، گروه GV بعد از IVM (b, c)، گروه MI بعد از IVM (d). میتوکندریها معمولا گرد بوده و حاوی کریستالهای محیطی یا عرضی هستند (a-d). گاهیگاهی میتوکندریهای دمبل مانند که احتمالا میتوکندریهای در حال تقسیم هستند در سیتوپلاسم اووسیت دیده می شوند. (پیکان) (d). به کمپلکسهای بین میتوکندریها و وزیکولهای شبکه اندوپلاسمیک صاف توجه کنید. مخصوصا در گروه GV که بزرگ و متعدد هستند. (پیکانها) (a-c). تجمعاتی از شبکه اندوپلاسمیک صاف که توسط میتوکندریها احاطه شده اند دیده می شوند. (a, b, d). در شکل 3d پیکان سیاه نشان دهنده گرانول قشری در حال مهاجرت است. SER= smooth endoplasmic reticulum; M= mitochondria.

مقاومت کمتر غشای این اووسیت‌ها نسبت به کاهش درجه حرارت و آسیب‌های ناشی از سرما به دلیل داشتن ترکیب لیپیدی متفاوت در مقایسه با اووسیت‌های نابالغ است (۴). بنابراین با انجماد اووسیت‌های نابالغ می‌توان بر این مشکل غلبه کرد. به‌علاوه با انجماد اووسیت‌های نابالغ می‌توان باروری را در بیماران سرطانی بدون تاخیر در درمان آن‌ها و مشکلات ناشی از آن حفظ کرد (۲۷). در این مطالعه نشان داده شد که ۸۷/۵۸ اووسیت‌های مرحله GV و ۷۳/۴۶ درصد اووسیت‌های مرحله MI بعد از انجماد زنده ماندند که بین دو گروه تفاوت

بحث

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات انجماد شیشه ای روی زنده ماندن، بلوغ و فراساختار اووسیت‌های نابالغ انسانی مرحله GV و MI که از سیکل‌های IVF به دست آمده بودند انجام شد. منجمد کردن اووسیت یک روش حفظ باروری در خانم‌ها است. هر چند که میزان حاملگی اندک و تعداد محدودی تولد زنده از اووسیت‌های منجمد شده گزارش شده است (۲۶). یکی از مشکلاتی که در مورد انجماد اووسیت‌های بالغ انسانی وجود دارد

گرفت حاکی از آن بود که قرار گرفتن اووسیت در معرض ضدیخ‌ها مواد محافظ انجماد باعث فعال شدن پدیده بکرزایی در اووسیت‌های جانوری می‌شود. اما مطالعات اندکی در زمینه انسانی صورت گرفته است. در این مطالعه مشاهده شد که درصد بکرزایی در اووسیت‌های منجمد شده مرحله MI سه برابر اووسیت‌های مرحله GV است که به نظر می‌آید مرحله بلوغ اووسیت در فعال کردن بکرزایی نقش دارد.

مطالعات فراساختاری نشان دادند که انجماد سبب کاهش تعداد گرانول‌های قشری در اووسیت‌های بالغ انسانی می‌شود (۱۹) و (۲۵). در این مطالعه ما نشان دادیم که تعداد گرانول‌های قشری اووسیت‌های نابالغ انسانی فریز شده بعد از بلوغ در محیط کشت کاهش می‌یابد. در یک مطالعه انسانی نشان داده شده است که فرآیند انجماد سبب کاهش تعداد گرانول‌های قشری در ناحیه قشری و ظهور واکوئل‌ها در سیتوپلاسم اووسیت‌های بالغ و نابالغ می‌شود که ممکن است نشان دهنده آسیب ساختاری به آن‌ها باشد و نتایج ما آن‌ها را تایید می‌کند (۱۹). اگزوسیتوز زودرس گرانول‌های قشری در اووسیت‌های انسانی که در معرض ProOH و یا DMSO قرار گرفتند نشان داده شده است (۳۵). اگزوسیتوز زودرس محتویات گرانول‌های قشری به‌داخل PVS منجر به سخت شدن زوناپلوسیدا می‌شود که می‌تواند مانع نفوذ اسپرم در هنگام لقاح شود که با روش ICSI می‌توان بر این مشکل غلبه کرد (۳۶). در این مطالعه نشان داده شد که بخش درونی زوناپلوسیدا الکترون مترکم‌تر است و این می‌تواند توجیه‌کننده کاهش تعداد گرانول‌های قشری به‌علت اگزوسیتوز زودرس در طول انجماد و ذوب باشد. تغییرات فراساختاری مشاهده شده در زوناپلوسیدا مشابه با مطالعات قبلی است (۱۸ و ۲۵). واکوئل‌های متعددی که در این مطالعه درون سیتوپلاسم اووسیت‌های فریز شده دیده شد ممکن است نشانه آسیب ساختاری به این اووسیت‌ها در اثر انجماد باشد. ظهور واکوئل‌ها در اووسیت‌های انسانی منجمد شده، یک واکنش غیر اختصاصی اووسیت به سرما و یا استرس ناشی از فشار اسمزی است (۲۵). واکوئل‌های متعدد در سیتوپلاسم اووسیت‌های انسانی ممکن است در اثر تورم و ادغام وزیکول‌های جدا شده از شبکه اندوپلاسمیک صاف ایجاد و به‌عنوان یک فرآیند دژنراتیو در نظر گرفته شوند (۳۷). این نظریه با همراهی واکوئل، لیزوزوم و اجسام چند حفره‌ای (Multivesicular Bodies) در سیتوپلاسم اووسیت‌های

معنی‌داری را نشان داد. میزان بلوغ بین اووسیت‌های GV و MI تفاوت معنی‌داری را نشان نداد هرچند که در گروه GV میزان بلوغ بالاتر بود (۳۴/۲۵ درصد vs ۴۶/۴۵ درصد). اما میزان دژنراسیون (۳۷/۷۹ vs ۵۶/۴۸) و توقف (۶/۴۸ vs ۱۴/۹۶) بین اووسیت‌های مرحله GV و MI تفاوت معنی‌داری داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که مرحله بلوغ اووسیت نقش مهمی در آسیب ناشی از انجماد دارد و با توجه به اینکه دوک‌های میوزی به کاهش درجه حرارت و ضدیخ‌ها مواد محافظ انجماد حساسیت بالایی دارند (۲۸)، لذا انجماد اووسیت‌های نابالغ مرحله GV نسبت به مرحله MI برتری دارد. مطالعات قبلی نشان دادند که ۱۶ تا ۴۳ درصد اووسیت‌های به‌دست آمده از تخمدان‌های تحریک نشده بعد از انجماد زنده ماندند و بین ۲۰ تا ۵۸ درصد از آن‌ها در محیط IVM بالغ شدند (۲۹). Son و همکاران (۳۰) گزارش کردند که ۵۵/۱ درصد از اووسیت‌های نابالغ انسانی بعد از انجماد و ذوب زنده ماندند و میزان بلوغ، لقاح و کلیواژ به‌ترتیب ۵۹/۳ درصد، ۴۲/۹ درصد و ۱۶/۷ درصد بود. میزان زنده ماندن و بلوغ در مطالعه ما مشابه با نتایج Son و همکاران نیست. این تفاوت می‌تواند به‌علت استفاده از سرعت بالای انجماد به‌منظور غلبه بر حساسیت بالای اووسیت به کاهش درجه حرارت و محیط IVM باشد. Toth و همکاران (۳۱) میزان زنده ماندن ۸۳/۳ درصد برای اووسیت‌های انسانی منجمد شده در مرحله GV نشان دادند که مشابه نتایج ما است. Cao و همکاران (۹) انجماد اووسیت‌های نابالغ مرحله GV که از بیماران با تخمدان پلی کیستیک به‌دست آمده بود را گزارش کردند. آن‌ها میزان زنده ماندن و بلوغ اووسیت‌ها را بعد از ذوب به‌ترتیب ۸۵/۴ درصد و ۵۰/۴ درصد نشان دادند که یافته‌های ما آن‌را تایید می‌کند، اما میزان بلوغ اووسیت‌های نابالغ در مطالعه ما کمتر از آن‌ها بود. تفاوت میزان بلوغ در مطالعات مختلف به فاکتورهایی نظیر ترکیب محیط کشت، منبع تهیه اووسیت (سیکل‌های تحریک شده یا بدون تحریک) و حضور یا عدم حضور سلول‌های کومولوس بستگی دارد (۳۰). از نظر فیزیولوژی حضور سلول‌های کومولوس در طول انجماد به‌خاطر بهبود در میزان بلوغ اووسیت بعد از ذوب مفید است (۳۲). هرچند که Minasi و همکاران (۳۳) اظهار کردند که وجود سلول‌های کومولوس در زمان انجماد اووسیت‌های بالغ اثر مفیدی روی صلاحیت تکاملی آن‌ها ندارد. مطالعاتی که توسط Ambrosini و همکارانش (۳۴) صورت

ضروری است، آن انرژی لازم برای ساخت و ترشح پروتئین و همچنین تبادل مواد بین اووسیت و سلول‌های کومولوس را فراهم می‌کند (۴۱). نشان داده شد که اندازه تجمعات میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک صاف در گروه فریز نسبت به گروه کنترل کوچکتر است ولی فراساختار میتوکندری‌ها در بین گروه‌ها تفاوتی ندارد. نتایج ما مشابه با یافته‌های قبلی است (۱۸ و ۲۵). پیشنهاد شده است که تغییرات فراساختاری تجمعات میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک صاف در اووسیت‌های فریز شده احتمالاً مربوط به استفاده از اتیلن گلیکول در محلول‌های انجماد شیشه‌ای است تا آسیب‌های ناشی از سرما و ممکن است منجر به اختلال در هومئوستازی کلسیم و به دنبال آن کاهش میزان لقاح شوند (۲۵). تجمعات میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک صاف به‌عنوان پیش ساز کمپلکس میتوکندری و وزیکول‌های شبکه اندوپلاسمیک در نظر گرفته می‌شوند (۴۲). میتوکندری‌ها و غشاهای سیتوپلاسمیک مرتبط با آن‌ها ممکن است در تولید مواد لازم جهت لقاح و یا ایجاد سریع غشاهای جدید در مراحل اولیه رویان زایی نقش داشته باشند (۴۲). همچنین تجمعات میتوکندری‌ها و شبکه اندوپلاسمیک صاف ممکن است در تنظیم غلظت کلسیم آزاد و تولید ATP نقش داشته باشند، بنابراین فعالیت‌های مختلف سلولی، از جمله مسیرهای انتقال سیگنال‌های وابسته به کلسیم را در زمان لقاح ناشی از فریز دارد. به‌رحال با توجه به این‌که انجماد شیشه‌ای تغییرات فراساختاری را در نواحی خاصی از اووسیت ایجاد می‌کند لذا تحقیقات بیشتری باید بر روی تکنیک‌های انجماد صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ۳۵۴م است و نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آن مرکز ابراز می‌دارند.

منابع

1. Gook DA, Edgar DH. Human oocyte cryopreservation. Hum Reprod Update. 2007; 13(6): 591-605.
2. Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe

منجمد شده بیشتر تقویت شد (۲۵). اجسام چند حفره ای به‌عنوان یک نوع هضم ارگانل در نظر گرفته می‌شوند که به فرآیندهای تبدالی که در سطح اووسیت رخ می‌دهد مربوط می‌شوند، در حالی‌که لیزوزوم‌های ثانویه در هضم مواد اووسیته نقش دارند. هر چند که هر دو ارگانل، به خصوص لیزوزوم‌ها، زمانی‌که همراه واکوئل‌ها هستند به‌عنوان علائم طبیعی دژنراسیون در نظر گرفته می‌شوند (۳۸). بنابراین ظهور واکوئل‌ها در اووسیت‌های بالغ انسانی ممکن است نهایتاً منجر به کاهش صلاحیت اووسیت جهت لقاح و یا اختلال تکاملی در مراحل اولیه جنین شوند (۳۹). در این مطالعه نشان داده شد که در همه گروه‌ها اووسیت‌ها توسط یک غشای سالم و ممتد که حاوی میکروویلی‌های بلند و یکنواخت است احاطه شده اند. هرچند که تعداد میکروویلی‌ها در اووسیت‌های نابالغ مرحله MI در مقایسه با گروه کنترل و GV کاهش یافته بود. میکروویلی‌ها دسته‌هایی از میکروفیلانمانت‌ها هستند که درون اسکلت سلولی قشر اووسیت شاخه شاخه می‌شوند. یکپارچگی مجموعه غشا و اسکلت سلولی می‌تواند توانایی زایگوت را جهت تشکیل جنین تحت تاثیر قرار دهد (۴۰). میتوکندری‌ها به‌عنوان ارگانلی که نقش اساسی در متابولیسم سلولی ایفا می‌کنند شناخته می‌شوند. شکل، تعداد و پراکندگی میتوکندری‌ها به نیازهای متابولیسی سلول بستگی داشته و به تکثیر و تمایز آن‌ها کمک می‌کنند. تکثیر و حرکت میتوکندری‌ها در طول دوره رشد اووسیت تحت تاثیر قرار می‌دهند. در این مطالعه، تغییرات فراساختاری در کمپلکس‌های میتوکندری و وزیکول‌های شبکه اندوپلاسمیک صاف در گروه GV مشاهده شد که احتمالاً مربوط به طولانی بودن مدت زمان کشت است و می‌تواند به‌طور بالقوه کاهش صلاحیت اووسیت برای لقاح را به خاطر اختلال در هومئوستازی کلسیم توجیه کند.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که توانایی بلوغ اووسیت‌های نابالغ انسانی مرحله MI نسبت به مرحله GV به دنبال انجماد کاهش می‌یابد، به‌علاوه اووسیت‌های منجمد شده مرحله MI آسیب‌های فراساختاری شدیدتری را نسبت به گروه GV نشان دادند که این احتمالاً مسئول کاهش توانایی بلوغ اووسیت و نشان دهنده آن است که مرحله بلوغ اووسیت نقش مهمی در تعیین آسیب‌های

- 65(1): 236-244.
11. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online*. 2006; 12(5): 608-615.
 12. Eimani H, Hasani F, Haeri Rohani SA, NasrEsfahani MH, et al. Effect of glutathion on Resumption of Meiosis, In Vitro Maturation and Embryo Development of Immature Mouse Oocytes. *J Mazandaran Uni Med Sci*. 2003; 15(48): 1- 10.
 13. Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2 propanediol. *Fertil Steril*. 1985; 44(5): 645-651.
 14. Vajta GC, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2006; 12(6): 779-796.
 15. Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, et al. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertil Steril*. 2009; 91(4): 1023-34.
 16. Coticchio G, Borini A, Distratis V, Maione M, et al. Qualitative and morphometric analysis of the ultrastructure of human oocytes cryopreserved by two alternative slow cooling protocols. *J Assist Reprod Genet*. 2010; 27:131-40.
 17. Van Blerkom J, Davis PW. Cytogenetic, cellular, and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Microsc Res Tech*. 1994; 27: 165-93.
 18. Shahedi A, Hosseini A, Khalili MA, Norouzian M, et al. The effect of vitrification on ultrastructure of human in vitro matured germinal vesicle oocytes. *Europe J of Obstet & Gynecol and Reprod Biol*. 2013; 167: 69-75.
 19. Ghetler Y, Skutelsky E, Ben Nun I, Ben Dor L, et al. Huma oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules. *Fertil and Steril*. 2006; 86: 210-216.
 20. Shahedi A, Khalili MA, Soleimani M, Morshedizad S. Ultrastructure of in vitro Matured Human Oocytes. *Shiraz E Med J*. 2013; 15(12): e7379.
 21. Paynter SJ. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Hum Reprod Update*. 2000; 6:449-56.
 22. Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, et al. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil Steril*. 2000; 74(6): 1153-8.
 - M , et al. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*. 2007; 67: 64-72.
 3. Stachecki J. An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online*. 2004; 9(2): 152-63.
 4. Rao GD, Tan SL. In vitro maturation of oocytes. *Semin Reprod Med*. 2005; 23(3): 242-247.
 5. Reichman DE, Politch J, Ginsburg ES, Racowsky C. Extended in vitro maturation of immature oocytes from stimulated cycles: an analysis of fertilization potential, embryo development, and reproductive outcomes. *J of Assist Reprod & Gene*. 2010; 27(7): 347-356.
 6. Fadini R, Comi R, Renzini MM, Coticchio G, et al. Anti-mullerian hormone as a predictive marker for the selection of women for oocyte in vitro maturation treatment. *J of Assist Reprod & Gene*. 2011; 28(6): 501-508.
 7. Wu J, Zhang L, Wang X. In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reprod*. 2001; 121(3): 389-93.
 8. Chian RC, Buckett WM, Abdul Jalil AK, Son WY, et al. Natural-cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes is a potential approach in infertility treatment. *Fertility & Sterility*. 2004; 82: 1675-8.
 9. Cao Y, Xing Q, Zhang ZG, Wei Z L, et al. Cryopreservation of immature and in-vitro matured human oocytes by vitrification. *Reprod BioMed Online*. 2009; 19(3): 369-373.
 10. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006; 23: 23-33.
 23. Al-Hasani S, Ozmen B, Koutlaki N, Schoepper B, et al. Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? *Reprod Biomed Online*. 2007; 14(3): 288-293.
 24. Fasano G, Vanin AS, Biramane J, Delbaere A, et al. Cryopreservation of human failed maturation oocytes shows that vitrification gives superior outcomes to slow cooling. *Cryobiology*. 2010; 61: 243-247.
 25. Nottola SA, Coticchio G, Sciajno R, Gambardella A, et al. Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop. *Reprod BioMed Online*. 2009; 19:17-27.
 26. Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, et al. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril*. 2003; 79(6): 1323-6.
 27. Huang JY, Tulandi T, Holzer H, Tan SL, et al. Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval

- of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. *Fertil Steril*. 2008; 89: 567-72.
28. Paynter SJ. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Hum Reprod Update*. 2000; 6(5): 449-456.
29. Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot M O, et al. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum Reprod*. 1988; 3(1): 117-9.
30. Son WY, Park SE, Lee KA, Lee WS, et al. Effects of 1,2-propanediol and freezing-thawing on the in vitro developmental capacity of human immature oocytes. *Fertil Steril*. 1996; 66: 995-999.
31. Toth TL, Baka SG, Veeck LL, Jones HW Jr, et al. Fertilization and in vitro development of cryopreserved human prophase I oocytes. *Fertil Steril*. 1994; 61: 891-894.
32. Hassan HA. Cumulus cell contribution to cytoplasmic maturation and oocyte developmental competence in vitro. *J of Assist Reprod and Gene*. 2001; 18: 539-43.
33. Minasi MG, Fabozzi G, Casciani V, Ferrero S, et al. Efficiency of slush nitrogen vitrification of human oocytes vitrified with or without cumulus cells in relation to survival rate and meiotic spindle competence. *Fertil Steril*. 2012; 97(5): 1220-5.
34. Ambrosini G, Andrisani A, Porcu E, Rebellato E, et al. Oocytes cryopreservation: state of ART. *Reprod Toxicol*. 2006; 22(2): 250-262.
35. Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers RD. Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. *Biol Reprod*. 1989; 40(2): 379-93.
36. Tao T, Del Valle A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. *J Assist Reprod Gene*. 2008; 25(7): 287-296.
37. Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, et al. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertil Steril*. 2009; 91(4): 1023-34.
38. Familiari G, Heyn R, Relucenti M, Nottola SA, et al. Ultrastructural dynamics of human reproduction, from ovulation to fertilization and early embryo development. *Int Rev Cytol*. 2006; 249: 53-141.
39. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, et al. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil Steril*. 2005; 83(6): 1635-40.
40. Palermo GD, Alikani M, Bertoli M, Colombero LT, et al. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1996; 11(10): 172-176.
41. Carrell DT, Moskovtsev S, Chohan KR, Peterson CM. Ovarian folliculogenesis: emerging role of in vitro maturation of oocytes and follicles in clinical practice. *Clin Obstet Gynecol*. 2003; 46(2): 239-253.
42. Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Heyn R. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod*. 2000; 15 Suppl 2: 129-47.

The effect of vitrification on maturation and ultrastructure of in-vitro matured human oocytes

Shahedi A, Ph.D.^{1*}, Hosseini, Ph.D.²

1- Department of anatomy and cell biology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

2- Cell Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Email corresponding author: abas_shahedi2006@yahoo.com

Received: 24 Jun. 2015

Accepted: 2015

Abstract

Aim: The aim of this study was to describe the possible effects of vitrification on maturation rate and ultrastructural morphology of in-vitro matured human oocytes.

Material and Methods: A total of 292 immature Germinal Vesicle (GV) and Metaphase I (MI) oocytes obtained from infertile patients were allocated into two groups: (i) GV oocytes (n=145), (ii) MI oocytes (n=147). Oocytes were first vitrified and then matured in-vitro. Supernumerary fresh in-vivo matured oocytes (n=10) were used as control. in-vitro maturation media was Ham's F10 supplemented with FSH+LH and human follicular fluid. After 36h of incubation, the oocytes were investigated for nuclear maturation and ultrastructural changes.

Results: The rate of survival and degeneration was significantly higher in Metaphase I than GV group. But, Oocyte maturation rates were not significant between groups ($P < 0.06$). In addition, the rate of oocyte arrest was significantly higher in MI oocytes in comparison with GV oocytes. Ultrastructurally; a drastic reduction was observed in amount of cortical granules at the cortex of vitrified-warmed GV and MI oocytes. In addition, Transmission Electron Microscopy (TEM) revealed vacuoles and small mitochondria-Smooth Endoplasmic Reticulum aggregates in the ooplasm of oocytes.

conclusion: Freeze/thawing procedures are associated with ultrastructural alterations in specific oocyte microdomains, presumably related to the reduced competence of cryopreserved oocytes to maturation.

Key words: Human oocyte, Vitrification, In vitro maturation, Ultrastructure