میزان بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک ژرمینال وزیکول همراه یا بدون سلول کومولوس پس از انجماد شیشه‌ای در موش نژاد BDF1

دکتر فرزاد رجایی(Ph.D)[1]- دکتر ابراهیم نصیری(Ph.D)[2]- دکتر امراله روزبهی(Ph.D)[3]- دکتر حمداله دلاویز (Ph.D)[3]- حسن عبیدی(M.Sc)[3]- رویا آریان‌پور(M.Sc)[3]- *دکتر رضا محمودی(Ph.D)[3]

***نویسنده مسئول:** یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج

پست الکترونیک: **rmahmoudi40@yahoo.com**

تاریخ دریافت مقاله:۹۰/۴/۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۱۶

چکیده

مقدمه: بهبود میزان حاملگی با استفاده از روش‌های انجمادی تخمک‌ها به عنوان عاملی مهم، به پیشرفت فناوری باروری آزمایشگاهی (ART) Assisted Reproductive Technology کمک می‌کند. انجماد شیشه‌ای یک روند فیزیکی است که در طی آن محلول غلیظ ضدیخ پس از قرار گرفتن در سرمای زیاد بدون تشکیل کریستال یخ در سلول‌های زنده به حالت شیشه‌ای تبدیل می‌شود.

هدف: ارزیابی زنده ماندن، بلوغ آزمایشگاهی و بدنبال آن قدرت تکوین تخمک مرحله ژرمینال وزیکول(GV) پس از انجماد شیشه‌ای یک و چند مرحله‌ای

مواد و روش‌ها: تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول با و بدون سلول‌های کومولوس در محلول انجماد شیشه‌ای شامل ۳۰ درصد(V/V) اتیلن‌گلیکول، ۱۸ درصد(W/V) فایکول ۷۰و ۰/۳ مولار به روش یک وچند مرحله‌ای منجمد شدند. پس از انجماد و قرار دادن در داخل نیتروژن مایع، تخمک‌ها ذوب و دو مرتبه در داخل محیط کشت شستشو داده شدند. میزان زنده ماندن تخمک‌ها، بلوغ تخمک و رسیدن آن به مرحله متافاز ۲، لقاح و تکوین جنین به مرحله‌ی دو سلولی بعد از انجماد- ذوب درخارج بدن(In vitro) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: میزان زنده ماندن، بلوغ تخمک به مرحله متافاز ۲، لقاح و میزان تشکیل جنین دو سلولی در روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای به طور معنی‌دار ($P<0.05$) نسبت به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای بالاتر بود.

نتیجه‌گیری: تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول منجمد شده با سلول‌های کومولوس و همچنین روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای نسبت به تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس و روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای اثر مثبتی بر میزان بلوغ(Maturation rate) و میزان تکوین جنین(Development rate)

کلید واژه‌ها: اتیلن گلیکول/ انجماد/ بارورسازی آزمایشگاهی/ سلول‌های کومولوس/ موش‌ها

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست‌ویکم شماره ۸۱، صفحات: ۱۱-۱

مقدمه

حفظ و نگهداری فولیکول، تخمک، بافت تخمدانی و اسپرم از هدف‌های اصلی علم تولیدمثل و کرایوبیولوژی بوده(۱و۲) و تلاش‌های بسیاری برای درک مکانیسم این انجماد سلولی صورت گرفته‌است. استفاده از تخمک‌های نارس اهمیت انجماد را بیشتر نشان می‌دهد. زیرا با ذخیره آنها می‌توان در زمان مناسب با توجه به شرایط بیمار نمونه را ذوب و پس از بلوغ آزمایشگاهی(In vitro maturation) مجدداً استفاده کرد. بسیاری از اشکال‌های باروری را می‌توان با این تکنیک برطرف کرد(۳). روش انجماد برای حفظ تخمک زنان که فعالیت تخمدان آنها به دلایل بیماری لگنی، درمان‌هایی چون رادیوتراپی و شیمی‌درمانی که تخمک‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرده و یا آسیب می‌بیند روش مناسبی است. چون تخمک پستانداران ساختار سلولی پیچیده‌ای دارند و اجزای ترکیب سلولی نسبت به تغییر درجه‌ی حرارت و اسمز فوق‌العاده حساس است، به نظر می‌رسد انجماد تخمک در مراحل مختلف تکامل مثلاً مرحله ژرمینال وزیکول(۴) و تخمک متافاز ۲ با استفاده از انواع ضدیخ می‌تواند تأثیر متفاوتی بر تخمک داشته باشد. پژوهش‌های متعدد نقش متابولیسم سلول‌های کومولوس در روند بلوغ تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول(۵و۶) و واکنش متقابل بین تخمک و سلول‌های کومولوس را تأیید می‌کند. طی مرحله انجماد آسیب وارده به سلول‌های کومولوس می‌تواند تأثیر نامطلوب بر بلوغ و تکوین تخمک ژرمینال وزیکول داشته‌باشد. امروزه اطلاعات مناسبی از روش‌های

۱. قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکزتحقیقات سلولی و مولکولی ۲. رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
۳. یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

Archive of SID
www.SID.ir

انجمادی بدست آمده که براساس آن قدری از مشکلات کلینیکی موجود را می‌توان برطرف کرد. روند سرد کردن تخمک بر عناصر سلولی بخصوص اسکلت سلول، فیبرهای دوک تقسیم، غشای سیتوپلاسمی، گرانول‌های قشری و افزایش سختی منطقه شفاف تأثیر می‌گذارد(۴و۶). محققان معتقدند که گلیکوپروتئین‌های منطقه شفاف در طی انجماد به علت خروج بی‌موقع گرانول‌های قشری سخت‌تر می‌شوند(۷). با سخت‌تر شدن منطقه شفاف نفوذپذیری اسپرم کاهش یافته و میزان باروری پائین می‌آید(۷). در مطالعات متعدد تأثیر ضدیخ‌های گوناگون بر سازمان‌بندی تخمک‌های بالغ و نابالغ موش و انسان بررسی شده‌است، نتایج نشان می‌دهد که تخمک نارس منجمد شده توان بلوغ وتکوین مراحل اولیه‌ی جنینی و لانه‌گزینی را خواهد داشت(۸). در سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینه انجماد تخمک‌های نابالغ مرحله ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس و بدون کومولوس به روش آهسته(۵) و انجماد شیشه‌ای(۹،۱۰و۱۱) در حضور ضدیخ‌های متداول صورت گرفته و گزارش‌های متفاوتی ارائه شده‌است. Park و همکاران درسال ۱۹۹۷ گزارش کردند که انجماد تخمک انسانی مرحله‌ی ژرمینال وزیکول باعث آسیب دوک تقسیم می‌شود(۱۲). درحالی‌که طبق گزارش دیگر محققان حدود۸۰٪ از تخمک‌های انسانی مرحله‌ی ژرمینال وزیکول منجمدشده دارای کروموزم ودوک تقسیم طبیعی هستند(۱۳). Toth و همکاران نشان دادند که تخمک انسانی مرحله‌ی ژرمینال وزیکول می‌تواند پس از انجماد، بلوغ هسته خود را تکمیل کرده و لقاح پیدا کند(۸ و ۱۴). مطالعات دیگر نشان داد که همراهی سلول‌های کومولوس با تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول برای بلوغ تخمک و تکوین جنین حیاتی است(۱۵و ۱۶). همچنین مطالعات دیگر نشان می‌دهد که تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس در مقایسه با تخمک همراه با کومولوس ظرفیت تکاملی کمتری دارد(۵و ۱۱). Whittingham در سال ۱۹۷۷ مشاهده کرد که وجود سلول‌های کومولوس پس از انجماد و ذوب تأثیری بر میزان زنده‌ماندن تخمک موش ندارد(۱۷). همچنین Asada و همکاران تحقیقی بر وال بالغ و نابالغ انجام دادند، و نشان دادند که وجود سلول‌های کومولوس تأثیری بر زنده‌ماندن تخمک نابالغ ندارد(۱۸). ویژگی تخمک مرحله ژرمینال وزیکول قرار داشتن کروماتین غیرمتراکم در داخل غشای هسته و حضور تخمک در مراحل اولیه پروفاز و عدم شکل‌گیری دوک تقسیم است که به نظر می‌رسد این ویژگی قادر باشد از آسیب میکروتوبولی و کروموزمی احتمالی ناشی از انجماد جلوگیری کند(۹و۱۹). در انجماد شیشه‌ای از ضدیخ‌های مختلفی استفاده می‌شود ولی مطالعات متعدد نشان داده که محلول انجمادی حاوی ضدیخ اتیلن‌گلیکول بهتر از ضدیخ‌های دیگر نظیر پروپاندیول، گلیسرول و دی‌متیل سولفاکسید است و از بین آنها ضدیخ اتیلن‌گلیکول در انجماد شیشه‌ای به علت سمیت کمتر یخ‌ها مناسب‌تر از بقیه ضدیخ‌ها باشد(۱۶،۲۰و۲۱). با توجه به گزارش‌های ضد و نقیض در باره انجماد تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول همراه با کومولوس و بدون کومولوس، در این تحقیق تخمک‌های موش آزمایشگاهی مرحله ژرمینال وزیکول را با و بدون سلول‌های کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای منجمد کرده و تأثیرانجماد شیشه‌ای بر روند بلوغ، لقاح و تکوین آزمایشگاهی تخمک‌های ژرمینال وزیکول به مرحله دو سلولی را بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

تهیه تخمک‌های ژرمینال وزیکول(GV): تمام مواد زیر را به استثنای آنچه ذکر شد، از شرکت سیگما(Sigma) خریداری کردیم.

دراین تحقیق از موش‌های سوری ماده نابالغ نژاد [F1 C57BL/6 x DBA/2: BDF1] ۴-۳ هفته‌ای، خریداری شده از Japan SLC, inc (Shizuoka, Japan) استفاده شد. موش‌ها از شرایط حیوان‌خانه‌ای طبق استانداردهای شناخته شده (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و آب و غذای کافی طبق راهکار صادره برای حیوانات آزمایشگاهی از دانشگاه هیوگو برخوردار بودند. ۱۰ واحد بین‌المللی(PMSG) Pregnant Mare Serum Gonadotropin داخل صفاقی برای تحریک تخمدان‌ها به موش‌ها تزریق شد. پس از ۴۸ ساعت موش‌ها را با کشش و جابجایی مهره‌های گردن(Dislocation) کشته و بی‌درنگ تخمدان‌های آنها برداشته شده و در محیط

Archive of SID

www.SID.ir

کشت Hepes-bufer (HTF: human tubal fluid) Irvine حاوی Bovine serum Albumin(BSA) 5mg/ml قرار داده‌شدند. تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول همراه با کومولوس(OGC) Oocytes granulose cell و تخمک مرحله‌ی بدون سلول‌های کومولوس (Do) Denuded oocytes را با سوزن انسولین در زیر استریومیکروسکوب از فولیکول آنترال تخمدان جدا کرده و به شش گروه به شرح زیر تقسیم‌بندی کردیم.

۱- گروه اول: ۲۲۱ تخمک ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس(کنترل)

۲- گروه دوم: ۱۵۶ تخمک ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس که در معرض محلول انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای (Single step) قرار داده‌شدند.

۳- گروه سوم: ۱۶۹ تخمک ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس که در معرض محلول انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای (Step-wise) قرار داده‌شدند.

۴- گروه چهارم: ۲۵۲ تخمک ژرمینال وزیکول همراه با سلول کومولوس(کنترل)

۵- گروه پنجم: ۱۶۸ تخمک ژرمینال وزیکول همراه با سلول کومولوس که در معرض محلول انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای (Single step) قرار داده شدند.

۶- گروه ششم: ۱۵۰ تخمک ژرمینال وزیکول همراه با سلول کومولوس که در معرض محلول انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای (Step-wise) قرار داده‌شدند.

محلول انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای و یک مرحله‌ای: محلول انجماد شیشه‌ای چندمرحله‌ای به EFS10%، EFS20% و EFS 30% تقسیم شدند.

در گروه‌های آزمایشی ۱۰ عدد تخمک OGC و DO ابتدا به مدت ۵ دقیقه در معرض 200µl محلول انجمادی EFS10% شامل EG (v/v) 10%، Ficoll-70 (w/v) 4/5% و 0.075 M Sucrose و FBS 20% گذاشته شدند آنگاه به مدت ۲ دقیقه در 200µl محلول انجمادی EFS 20% که شامل EG (v/v) 20%، Ficoll-70 (w/v) 9% و 15 M Surose/ و FBS 20% قرار داده شدند و سپس به مدت ۱ دقیقه در معرض 200µl محلول انجماد شیشه‌ای نهایی شامل EG (v/v) 30% ، 18% Ficoll-70 (w/v) و 0.3 M Sucrose و FBS 20% گذاشته شدند. پس از آن تخمک‌ها را به داخل نی انجماد(IVM L Aigle, France) منتقل کرده و نی انجمادی را به مدت ۳۰ ثانیه روی بخار نیترون قرار داده، سپس به داخل نیتروژن مایع منتقل و به مدت ۵-۱ روز در نیتروژن مایع نگهداری شدند. ولی در روش یک مرحله‌ای، تخمک‌های OGC و DO به مدت ۱ دقیقه در معرض محلول انجماد شیشه‌ای EFS30% شامل EG (v/v)30%، Ficoll-70 18%(w/v) و 3M/. Sucrose و FBS 20% قرار داده می‌شدند.

روش انجماد شیشه‌ای: تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول با روش Kasai و همکاران(۲۲) و Ishida و همکاران(۲۳) انجماد شیشه‌ای شدند.

در این روش از ضدیخ اتیلن‌گلیکول(EG) استفاده کرده، طی انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای ابتدا در معرض ضدیخ‌های EFS 10%، EFS 20% و EFS 30% و در روش انجمادی یک مرحله‌ای تخمک‌ها فقط در معرض ضدیخ EFS 30% قرار داده شد تا آبگیری شوند. پس از آن به درون نی انجماد (IVM L Aigle, France) منتقل کرده ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در معرض بخار نیتروژن و سپس در تانک ازت مایع قرار داده‌شدند و برای گرم کردن از محلول ساکارز ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ مول به مدت ۹۰ ثانیه در هر قطره استفاده شد.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های ژرمینال وزیکول: تخمک‌های ژرمینال وزیکول منجمد شده(گروه‌های آزمایشی) و تخمک‌های ژرمینال وزیکول منجمد نشده(گروه‌های کنترول) در داخل قطره ۱۰۰µl را در محیط کشت α-MEM حاوی ۰/۲۳ میلی‌مول پیروات سدیم، یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فتوئین (Fetuin)، ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین بر میلی‌لیتر؛ ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر عامل رشد اپی‌درمی موش(EGF)، ۷۵ میلی واحد بر میلی‌لیتر هورمون محرک فولیکولی(FSH) ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سرم جنین گاو (FBS) در دیش ۳۵ میلی‌متری(در هر قطره ۱۰ عدد تخمک) قرار دادیم که قبلاً در انکوباتور به تعادل رسیده بود. تخمک‌ها را در انکوباتور با دمای ۳۷°C و ۵ درصد CO_2 منتقل کردیم. بعد از ۲۴ ساعت کشت در انکوباتور، تخمک‌های ژرمینال وزیکول را که به متافاز ۲ رسیده

Archive of SID

www.SID.ir

بودند(خروج اولین جسم قطبی به عنوان مشخصه متافاز ۲ در نظر گرفته شد) با اسپرم لقاح دادیم.

لقاح تخمک‌های متافاز ۲ در محیط کشت In vitro fertilization (IVF) و تکوین آن به مرحله‌ی دو سلولی:

نمونه‌گیری: گروه‌های لقاح شده شامل تخمک‌های گروه منجمد شده و گروه کنترل بودند.

تخمک‌های ژرمینال وزیکول وقتی که به متافاز ۲ رسیدند جهت لقاح به محیط کشت TYH (Mitsubishi Kagaku Iatron Inc., Tokyo Japan) حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی(BSA) پوشیده شده با روغن معدنی (Mineral oil) منتقل شدند.

مراحل انجام لقاح به ترتیب زیر انجام شد:

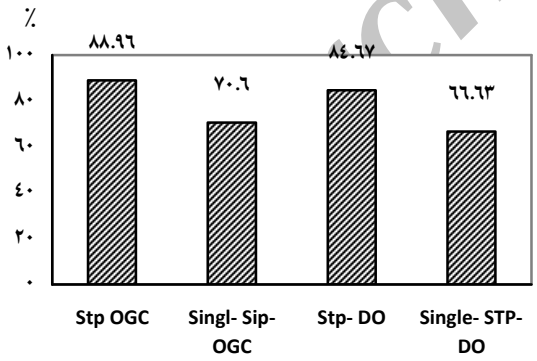
موش‌های سوری نر نژاد [F1 C57BL/6 x DBA/2: BDF1] که ۱۲ هفته سن داشتند، به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند. سپس، دم اپیدیدیم موش‌ها را جدا کرده و به حاشیه روغن، قطره‌ای ۲۰۰µl از محیط کشت TYH حاوی ۴ میلی‌گرم BSA بر هر میلی‌لیتر گذاشتیم آنگاه با سرنگ انسولین اسپرم را از دم اپیدیدیم جدا کرده و به داخل قطره محیط کشت که قبلاً در انکوباتور به تعادل رسیده بودند منتقل شدند. قطره حاوی اسپرم به مدت ۲-۱/۵ تا دوساعت جهت ظرفیت‌دار شدن در انکوباتور ۳۷°C و ۵ درصد CO_2 نگهداری شد. اسپرم‌های فعال و سالم که به طریق Siwm-up در کناره‌های قطره جمع شده بودند را به قطره‌های ۲۰۰µl محیط کشت TYH حاوی تخمک‌ها اضافه کردیم. به گونه‌ای که در هر میلی‌لیتر ۱×۱۰^{۶} اسپرم موجود بود. تخمک‌ها به مدت۶-۴ ساعت در محیط کشت TYH حاوی ۴ میلی‌گرم BSA بر هر میلی‌لیتر در مجاورت اسپرم قرار داده شدند. سپس، تخمک‌ها چندین بار در محیط TYH شستشو داده شدند تا اسپرم‌ها کاملاً شسته شوند. پس از گذشت ۸-۶ ساعت از زمان لقاح تشکیل پیش هسته(2PN) و پس از گذشت ۲۴ ساعت، تشکیل جنین دوسلولی موش توسط میکروسکوب معکوس بررسی شد.

درصد تخمک‌های زنده مانده پس از روش‌های مختلف انجماد شیشه‌ای، درصد تخمک‌های بالغ شده در هر گروه پس از ۲۴ ساعت کشت و همچنین درصد تشکیل جنین و تکامل آن تا مرحله دو سلولی، در گروه‌های مختلف در هر بار تکرار بدست آمد. سپس، میانگین این درصدهای گروه‌های مختلف در هر آزمایش با استفاده از One Way ANOVA و کمک نرم‌افزار SPSS11.5 مقایسه و تجزیه و تحلیل شد. در استفاده از One Way ANOVA برای تست‌های بین گروهی از تست‌های Tukey (در موقعی که واریانس‌ها یکسان بودند) و تست Dunnett T3 (در هنگامی که واریانس‌ها اختلاف داشتند) استفاده شد.

نتایج

میزان زنده ماندن تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول با و بدون سلول‌های کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای(Single step) و چند مرحله‌ای(Step-wise):

این نتایج در نمودار ۱ آورده شده است. پس از انجماد شیشه‌ای به روش یک مرحله‌ای ۵/۰۸±۶۶/۶۳ درصد تخمک‌های مرحله ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس (Single step-DO) زنده ماندند. در حالی‌که در گروه انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای(Stepwise-DO) ۲/۵۵±۸۴/۷۶ درصد تخمک‌های بدون سلول کومولوس مورفولوژی طبیعی‌داشتند که تفاوت‌معنی‌داری دارد($P<0.05$).



Stp.OGC= تخمک با سلول کومولوس به روش انجمادی چندمرحله‌ای

Single- Stp- OGC= تخمک باسلول‌کومولوس به‌روش‌انجمادی یک‌مرحله‌ای

Stp-DO=تخمک بدون سلول کومولوس به روش انجمادی چندمرحله‌ای

Single-Stp-DO= تخمک‌بدون‌سلول کومولوس به روش‌انجمادی یک‌مرحله‌ای

نمودار ۱: میزان زنده‌ماندن تخمک‌های ژرمینال وزیکول در گروه‌های مختلف انجمادی

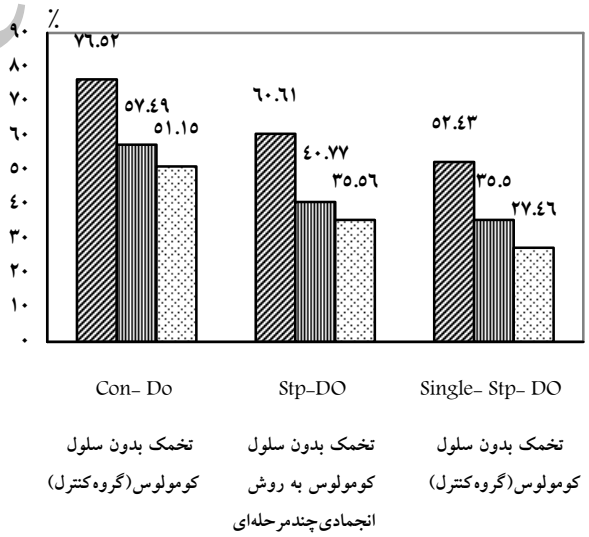
درصد زنده ماندن تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای

Archive of SID

www.SID.ir

۷۰/۶۰±۶/۰۰ و چند مرحله‌ای ۸۸/۹۶±۱/۸۵ درصد بود که این دو نیز تفاوت معنی‌داری داشتند($P< 0.009$). به طور کلی بالاترین میزان از نظر زنده ماندن تخمک‌ها پس از انجماد مربوط به گروه Stepwise-OGC (انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای تخمک‌ها به همراه سلول‌های کومولوس) بود (۸۸/۹۶±۱/۸۵ درصد) که اختلاف آن با کلیه گروه‌های دیگر به جز Stepwise-DO معنی‌دار بود.

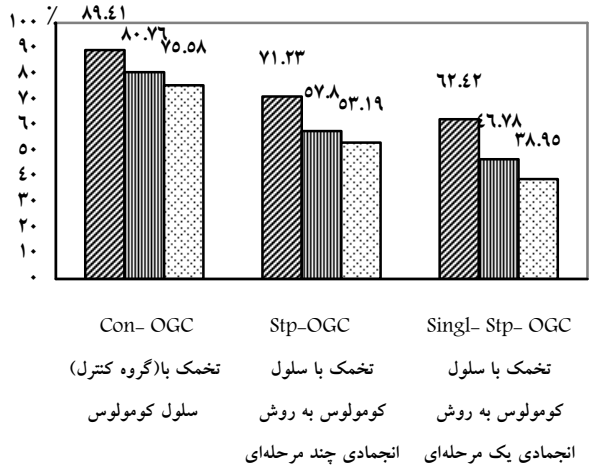
میزان بلوغ تخمک‌های ژرمینال وزیکول با و بدون سلول‌های کومولوس پس از انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای و مقایسه آن با گروه‌های کنترل: میزان بلوغ تخمک‌های ژرمینال وزیکول با سلول‌های کومولوس و بدون سلول کومولوس متعاقب ۲۴ ساعت کشت در آزمایشگاه پس از انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای و همچنین میزان بلوغ تخمک‌های گروه‌های کنترل [با سلول‌های کومولوس(Cont-OGC) و بدون سلول‌های کومولوس-(Cont-DO)] پس از ۲۴ ساعت کشت در نمودارهای ۴-۲ نشان داده‌شده است.



MII% متافاز ۲ 2PN لقاح 2cell جنین دو سلولی

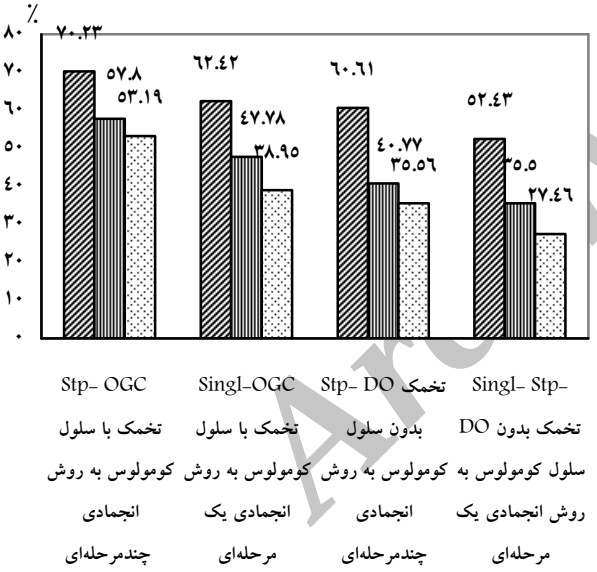
نمودار ۲: میزان بلوغ، لقاح و تشکیل جنین دو سلولی تخمک‌های ژرمینال وزیکول در گروه‌های بدون سلول کومولوس

همان‌طور که در این نمودارها دیده می‌شود پس از انجماد شیشه‌ای به روش یک مرحله‌ای ۵۲/۴۳±۰/۹۵ درصد و در گروه انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای ۶۰/۶۱±۳/۵۰ درصد از تخمک‌های‌مرحله ژرمینال‌وزیکول بدون سلول‌های کومولوس به مرحله‌ی متافاز ۲ رسیدند که در روش چند مرحله‌ای به‌طور معنی‌دار بیش از روش یک مرحله است($P<0.001$).



MII% متافاز۲ 2PN لقاح 2cell جنین دو سلولی

نمودار ۳: میزان بلوغ، لقاح و تشکیل جنین دو سلولی تخمک‌های ژرمینال وزیکول در گروه‌های همراه با سلول کومولوس



MII% متافاز ۲ 2PN لقاح 2cell جنین دو سلولی

نمودار ۴: میزان بلوغ، لقاح و تشکیل جنین دو سلولی تخمک‌های ژرمینال وزیکول در گروه‌های همراه با سلول کومولوس و بدون سلول کومولوس پس از انجماد شیشه‌ای

همچنین میزان بلوغ تخمک‌های ژرمینال وزیکول با سلول‌های کومولوس پس ازانجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای ۶۲/۴۲±۲/۲۱ چنـــد مرحله‌ای ۷۱/۲۳±۲/۴۱ درصد بود که این دو گروه نیز

Archive of SID

www.SID.ir

تفاوت معنی‌دار داشند (P=0.000).

در مقایسه میزان بلوغ تخمک‌های ژرمینال وزیکول با سلول‌های کومولوس پس از انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای با همین نوع تخمک‌ها پس از انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای نیز نشان داد که میزان بلوغ پس از روش چند مرحله‌ای به طور معنی‌دار بیش از روش یک مرحله‌ای است (P= 0.000).

میزان لقاح تخمک‌های متافاز ۲ حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک در گروه‌های مختلف:

نتایج میزان لقاح(تشکیل 2PN) در گروه‌های مختلف در این نمودارهای شماره ۴-۲ آورده‌شده‌است. همان‌طور که در نمودار دیده می‌شود، میزان لقاح در گروه‌های Cont-Do و Cont-OGC به ترتیب ۵۷/۴۹±۰/۶۶ و ۸۰/۷۶±۲/۴ درصد بود که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند(P=0.000). همچنین در گروه‌های انجمادی فاقد سلول‌های کومولوس در گروه Single step-DO میزان لقاح ۳۵/۵۰±۸/۷۱ درصد و در گروه Stepwise-DO ۴۰/۷۷±۱۰/۸۹ درصد بود که اختلاف معنی‌دار نشان نمی‌دهند لیکن اختلاف آنها با هر دو گروه کنترل معنی‌دار بود.

میزان لقاح تخمک‌های بالغ شده همراه با سلول‌های کومولوس پس از انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای (Single step-OGC) و چند مرحله‌ای (Stepwise-OGC) نیز به ترتیب عبارت بود از ۴۶/۷۸±۶/۹۹ و ۵۷/۸۰±۴/۸۸ درصد و در گروه کنترل ۸۰/۷۶±۲/۴۰ درصد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های انجمادی یک و چند مرحله‌ای با هم وجود نداشت لیکن اختلاف با گروه Cont-OGC معنی‌دار بود(P=0.000). اختلاف این گروه‌ها با گروه Cont-DO نیز معنی‌دار نبود. در مقایسه گروه‌های انجمادی همراه سلول‌های کومولوس با گروه‌های انجمادی بدون سلول‌های کومولوس، گروه Single step-OGC با هیچ یک از گروه‌های انجمادی دیگر اختلاف معنی‌دار نداشت. لیکن میزان لقاح در گروه Stepwise-OGC بطور معنی‌دار بیش از گروه‌های Stepwise-DO (P< 0.014) و Single step-DO (P<0.001) بود.

مقایسه میزان تکوین جنین‌های تشکیل شده تا مرحله‌ی دو سلولی درگروه‌های مختلف: نتایج میزان تکامل به مرحله‌ی دو سلولی(شکل ۵) در گروه‌های انجمادی و کنترل در نمودارهای ۴-۲ نشان داده شده است. میزان تکامل جنین‌ها به مرحله‌ی دو سلولی در گروه Cont-DO برابر با ۲ ±۵۱/۱۵ و گروه Cont-OGC، ۷۵/۵۸±۵/۰۹ درصد بود که اختلاف معنی‌دار نشان دادند. همچنین، میزان تکامل جنین‌های زنده مانده پس از انجماد تا مرحله دو سلولی به ترتیب عبارت بود از: گروه Single step-Do، ۲۷/۴۶±۴/۶۸ درصد و Stepwise-DO، ۳۵/۵۶±۸/۴۲ Single step-OGC ., ۳۸/۹۵±۶/۴۳ و گروه Stepwise-OGC، ۵۳/۱۹±۴/۱۶ درصد.

مقایسه دو به دو گروه‌ها نشان داد که میزان تشکیل جنین‌های دو سلولی در گروه Stepwise-OGC به طور معنی‌دار از گروه‌های انجمادی Single step-Do (P= 0.000)، Single step-OGC (P<0.02) و Stepwise-DO(P<0.003) بیشتر است در حالی‌که اختلاف بین گروه‌های‌انجمادی‌دیگر معنی‌دار نبود. همچنین تمام گروه‌های انجمادی با گروه Cont-OGC اختلاف معنی‌داری داشتند و به‌طور جالب توجه اختلاف بین گروه Cont-Do و Stepwise-OGC معنی‌دار نبود.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج، نشان داد که تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول با و بدون سلول‌های کومولوس، منجمد نشده(گروه کنترل) و منجمد شده به روش انجماد شیشه‌ای با اتیلن گلیکول توانایی رشد و تکامل در آزمایشگاه را دارند. تخمک‌ها ضمن بلوغ در آزمایشگاه، قابلیت لقاح و تشکیل جنین‌های دو سلولی را دارند. یافته‌های ما همچنین نشان داد انجماد شیشه‌ای تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول به روش چند مرحله‌ای نسبت به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای روشی مناسب است. این یافته‌ها موافق تحقیق Ohboshi و همکاران(۲۴)، Abe و همکاران(۱۱) بود. آنان نشان دادند استفاده از روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای باعث کاهش فشار اسمزی بر جنین و تخمک شده و در نتیجه آسیب وارده به آنها کاهش می‌یابد. اطلاعات بدست آمده نشان داد درصد زنده ماندن تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای به ترتیب ۵/۰۸ ±۶۶/۶۳ و ۸۴/۷۶±۲/۵۵ درصد بود تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول مورفولوژی طبیعی داشتند.

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین، درصد زنده ماندن تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای به ترتیب ۷۰/۶۰±۶/۰۰ و ۸۸/۹۶±۱/۸۵ درصد بود تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول بهم مورفولوژی طبیعی داشتند. هرچند میزان زنده ماندن تخمک‌های ژرمینال وزیکول با سلول‌های کومولوس در روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای بیش از تخمک ژرمینال وزیکول بدون کومولوس منجمد شده به روش یک مرحله‌ای بود ولی اختلاف معنی‌دار نداشت. این نتایج مطابق با نتایج Abe و همکاران(۱۱) بود ولی میزان زنده‌ماندن در گزارش آنها بیشتر از تحقیق ما بود که علت آن را می‌توان به استفاده از نایلون- مش(Nylon-mash) در انجماد شیشه‌ای تخمک نابالغ گاو نسبت داد. میزان زنده ماندن تخمک در بررسی ما بیشتر از تحقیق Asada و همکاران (Asada et al., 2000) بود که تخمک نابالغ وال را به روش انجماد آهسته منجمد و میزان زنده ماندن را ۴۰ ٪ گزارش کرده بودند. علت زنده ماندن بیشتر در این تحقیق در مقایسه با مطالعه Asada و همکاران را می‌توان به روش انجماد و گونه حیوانی نسبت داد. نتایج این آمار نشان داد تخمک‌های ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای بعد از ۲۴ ساعت کشت ۵۲/۴۳±۰/۹۵ بود و ۶۰/۶۱±۳/۵۰ درصد تخمک‌ها به مرحله‌ی متافاز ۲ رسیده بودند. همچنین با کشت تخمک‌های ژرمینال وزیکول با سلول‌های کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای بعد از ۲۴ ساعت کشت به ترتیب ۶۲/۴۲±۲/۲۱ و ۷۱/۲۳±۲/۴۱ درصد تخمک‌ها به مرحله‌ی متافاز ۲ رسیدند. در تحقیق Abe و همکاران(۱۱) و Hurt و همکاران(۲۵) میزان تکوین تخمک به متافاز ۲ به ترتیب ۶۴/۱٪ و ۶۰٪ گزارش شد که مشابه‌ی نتایج ما بود ولی در مطالعه Aono و همکاران(۹) میزان تکامل تخمک به متافاز ۲، ۹۱/۸ ٪ نسبت به نتایج ما بسیار بیشتر بود. علت آن را می‌توان به روش ۱۰ مرحله‌ای انجماد فوق سریع تخمک موش و غلظت پایین ضد یخ اتیلن‌گلیکول و دی‌متیل‌سولفاکسید استفاده شده(۰/۲۵ تا ۲/۵ درصد) نسبت داد. میزان لقاح تخمک‌های متافاز ۲ بدست آمده از انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای تخمک ژرمینال وزیکول بدون کومولوس به ترتیب ۸/۷۱ ±۳۵/۵۰ و ۴۰/۷۷±۱۰/۸۹ درصد بود و در تخمک ژرمینال وزیکول با کومولوس به ترتیب ۴۶/۷۸±۶/۹۹ و ۵۷/۸۰±۴/۸۸ درصد بود. میزان تکوین به جنین دو سلولی پس از انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای در گروه تخمک ژرمینال وزیکول بدون کومولوس به ترتیب ۲۷/۴۶±۴/۶۸ و ۳۵/۵۶±۸/۴۲ درصد بود و در گروه تخمک ژرمینال وزیکول با سلول‌های کومولوس به ترتیب ۳۸/۹۵±۶/۴۳ و ۵۳/۱۹±۴/۱۶ درصد بود. Abe و همکاران(۱۱) میزان تشکیل جنین دو سلولی در روش یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای انجماد شیشه‌ای تخمک ژرمینال وزیکول را به ترتیب ۲۰/۸ ٪ و ۳۷/۷٪ گزارش کردند که نسبت به نتایج ما پایین‌تر بود. علت آن را شاید بتوان به گونه‌ی حیوان استفاده شده نسبت داد. Aono و همکاران(۹) به روش انجماد شیشه‌ای ۱۰ مرحله‌ای تخمک ژرمینال وزیکول موش را منجمد کرده و میزان تشکیل جنین دو سلولی را ۷۳/۳٪ گزارش کردند که نسبت به نتایج ما بیشتر بود. با توجه به یکسان بودن گونه‌ی حیوانی علت بالا بودن میزان تشکیل جنین را می‌توان به روش کار و غلظت پایین ضد یخ استفاده شده نسبت داد. Abe و همکاران(۱۱) تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس گاو را با استفاده از اتیلن گلیکول(EFS40) به روش یک و چند مرحله‌ای منجمد کرده و گزارش کردند که میزان بلوغ(IVM) و میزان تقسیم(Cleavage rate) در روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای بسیار بیشتر از روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای است ولی میزان زنده ماندن تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول در روش انجمادی یک وچند مرحله‌ی تفاوتی ندارد. همچنین، آنان در روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای نشان دادند تخمک‌های ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس پس از انجماد سلول‌های کومولوس از تخمک جدا شده و در اطراف آن پخش می‌شوند. مطالعات دیگر در این زمینه نشان داد که از بین رفتن ارتباط بین سلول‌های کومولوس و تخمک پس از انجماد آهسته و ذوب نیز صورت می‌گیرد(۲۶ و ۲۷) و احتمال دادند که این جدا شدن به طور فیزیکی بر اثر تشکیل یخ باشد. ارتباط بین

Archive of SID

www.SID.ir

سلول‌های کومولوس با تخمک برای تکمیل بلوغ و تکوین طبیعی تخمک، In vitro، عاملی مهم محسوب می‌شود(۲۸). وجود سلول‌های کومولوس تاثیر مهمی بر بلوغ آزمایشگاهی (IVM) تخمک نابالغ دارد. تخمک‌های ژرمینال وزیکول همراه با سلول کومولوس نسبت به تخمک بدون کومولوس بیشتر تکوین می‌یابند (۲۹و۳۰). در مطالعه ما، پایین بودن میزان بلوغ تخمک ژرمینال وزیکول به سبب تخریب ارتباط بین سلول‌های کومولوس با تخمک و فشار اسمزی وارده به تخمک در روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ی نسبت به روش چند مرحله‌ی قابل توجیه است. علاوه بر این به نظر می‌رسد در قرار دادن تخمک ژرمینال وزیکول به مدت ۱ دقیقه در معرض انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ی ضد یخ به اندازه کافی به داخل تخمک نفوذ نمی‌کند، هر چند که قرار دادن تخمک به مدت طولانی‌تر در معرض ضد یخ نفوذپذیر با غلظت بالا باعث کاهش زنده ماندن تخمک، به علت سمیّت ضدیخ می‌شود(۳۱). در انجماد شیشه‌ای از غلظت زیاد ضدیخ برای انجماد تخمک و جنین استفاده می‌شود بنابراین، استفاده از روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای باعث کاهش فشار اسمزی و کاهش اثر سمی ضدیخ بر تخمک شده، آسیب وارده به تخمک را کاهش می‌دهد. Ohboshi و همکاران بلاستوسیست گاو را با روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای منجمد کردند، گزارش آنان آسیب بلاستوسیست‌ها در انجماد یک مرحله‌ی بیشتر بوده‌است(۲۴). Kuwayama و همکاران با روش انجماد شیشه‌ای ۱۶ مرحله-ای، بلاستوسیست گاو را منجمد کردند که میزان زنده ماندن بلاستوسیست در این روش بالا بود. بررسی‌های فوق تأییدی بر نتایج مطالعه ماست که نشان می‌دهد روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای بهتر از روش یک مرحله‌ای است(۳۲).

Aono و همکاران تخمک ژرمینال وزیکول موش را به روش یک مرحله‌ای و ده مرحله‌ای انجماد شیشه‌ای کردند. میزان زنده‌ماندن، تکوین به متافاز ۲ و تشکیل بلاستوسیست در روش یک مرحله‌ای به ترتیب ۹۷/۵٪، ۹۵/۸٪ و ۲۳/۷٪ و در روش ده مرحله‌ای به ترتیب ۹۸/۶٪، ۹۲/۶٪ و ۴۲/۹٪ بود. تشکیل بلاستوسیست در روش ده مرحله‌ی به‌طور معنی‌دار بیش از روش یک مرحله‌ای بود(۹).

Park و همکاران تخمک موش را با استفاده از ضدیخ اتیلن‌گلیکول به روش انجماد شیشه‌ای منجـمد و ذوب کردند در روش آنان تخمک‌ها با سلول‌های کومولوس بیشتر از تخمک‌های بدون کومولوس به مرحله‌ی ۸ سلولی رسیدند که منطبق با نتیجه مطالعه ما بود(۱۵). Chian و همکاران تخمک گاو (Bovine) را با و بدون سلول‌های کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای با استفاده از ۱۵٪ اتیلن‌گلیکول + ۱۵٪ DMSO و ۱۵٪ اتیلن گلیکول +PROH و Cryotop منجمد کردند. به گزارش آنهاد میزان زنده‌ماندن و لقاح تخمک با و بدون کومولوس تفاوتی نداشت ولی میزان تشکیل جنین تا مرحله‌ی ۸ سلولی در تخمک بدون کومولوس به طور معنی‌دار بیشتر بود(۱۰) که مخالف نتایج مطالعه ماست. Abe و همکاران تخمک ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس گاو، را به روش یک و چند مرحله‌ای با نایلون-مش (Nylon-Mesh) انجماد شیشه‌ای کردند. در روش یک مرحله ای از EFS40% استفاده شد. میزان زنده ماندن، تکوین به متافاز ۲، دو سلولی و تشکیل بلاستوسیست به ترتیب ۹۶/۹٪، ۲۲/۶٪، ۲۰/۸٪ و صفر بود. در این روش هیچ بلاستوسیستی تشکیل نشد. در روش چند مرحله‌ای EFS10%، EFS20% و EFS40% بکار رفت و میزان زنده‌ماندن، تکوین به متافاز ۲، دو سلولی و تشکیل بلاستوسیست به ترتیب ۹۶/۷ ٪، ۶۴/۱ ٪، ۳۷/۷ ٪ و ۸٪ گزارش شد. طبق نتایج تکامل تخمک ژرمینال وزیکول پس از انجماد و ذوب به مرحله‌ی متافاز۲، دوسلولی و بلاستوسیست در روش انجمادی چند مرحله‌ای به طور معنی‌دار بالاتر بود(۱۱) زیرا تماس فیزیکی بین تخمک و سلول‌های کومولوس برای انتقال مواد مغذی و عوامل لازم، برای تکامل تخمک ضروروی هستند. همچنین سلول‌های کومولوس به علت انتقال تعداد زیادی عوامل شناخته شده و شناخته نشده برای بلوغ هسته و سیتوپلاسم تخمک ضروری هستند (۳۳و۳۴). به طور کلی پذیرفته شده که ارتباط بین سلول کومولوس و تخمک نه تنها برای تکامل تخمک ژرمینال وزیکول به مرحله‌ی متافاز ۲ بلکه برای بلوغ سیتوپلاسم تخمک که باعث تکوین جنین بعد از لقاح می‌شود مهم است(۳۵و۳۶). تأثیر سلول‌های کومولوس ممکن است به

Archive of SID

www.SID.ir

خاطر تولید موضعی گلیکوز آمینوگلیکان‌ها، هورمون‌های استروئیدی و عوامل دیگری باشد که باعث تکامل سیتوپلاسم تخمک می‌شود و مسئول تشکیل پیش‌هسته مذکر، لقاح مونو اسپرمی و تکوین جنین در مراحل اولیه است(۳۷ و ۳۸). نتایج ما نشان داد که تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول منجمد شده با سلول‌های کومولوس و همچنین روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای اثر مثبتی بر میزان بلوغ(Maturation rate) و میزان تکوین جنین (Development rate) نسبت به تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس و روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای دارد.

منابع

1. Agca Y. Cryopreservation of Oocyte and Ovarian Tissue. ILAR J 2000; 41(4): 207-20.

2. Amorim CA, Goncalves PB, Figueiredo JR. Cryopreservation of Oocytes from Pre-Antral Follicles. Hum Reprod Update 2003; 9(2); 119-29.

3. Hovatta O. Cryobiology of Ovarian and Testicular Tissue. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2003; 17(2):331-42.

4. Parks JE, Ruffing NA. Factors Affecting Low Temperature Survival of Mammalian Oocyte. Theriogenology 1992; 37: 59-73.

5. Ruppert-Lingham CJ, Paynter SJ, Godfrey J, Fuller BJ, Shaw RW. Developmental Potential of Murine Germinal Vesicle Stage Cumulus-Oocyte Complexes Following Exposure to Dimethylsulphoxide Orcryopreservation: Loss of Membrane Integrity of Cumulus Cells after Thawing. Hum Reprod 2003; 18 (2): 392-8.

6. Hassan M Warriach, Kazim R Chohan. Thickness of Cumulus Cell Layer is A Significant Factor in Meiotic Competence of Buffalo Oocytes. J Vet Sci 2004; 5(3): 247-251.

7. Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of Cryopreservation on Meiotic Spindles of Oocytes and its Dynamics after Thawing: Clinical Implications in Oocyte Freezing--A Review Article. Mol Cell Endocrinol 2003; 202(1-2): 101-7.

8. Wu J, Zhang L, Wang X. In Vitro Maturation, Fertilisation and Embryo Development after Ultra-Rapid Freezing of Immature Human Oocytes. Reproduction 2001; 121; 389–393.

9. Aono N, Naganuma T, Abe Y, Hara K, Sasada H, Sato E, Yoshida H. Successful Production of Blastocysts Following Ultrarapid Vitrification with Step-Wise Equilibriation of Germinal Vesicle-Stage Mouse Oocytes. J Reprod Dev 2003; 49(6): 501-6.

10. Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T. High Survival Rate of Bovine Oocytes Matured in Vitro Following Vitrification. J Reprod Dev 2004; 50(6): 685-96.

11. Abe Y, Hara K, Matsumoto H, Kobayashi J, Sasada H, Ekwall H, Rodriguez-Martinez H, Sato E. Feasibility of a Nylon-Mesh Holder for Vitrification of Bovine Germinal Vesicle Oocytes in Subsequent Production of Viable Blastocysts. Biol Reprod 2005; 72(6): 1416-20.

12. Park S, Son W, Lee K, Ko J, Cha K. Chromosome and Spindle Configuration of Human Oocyte Maturerd in Vitro after Cryopreservation at the Germinal Vesicle Stage. Fertile Steril 1997; 68: 920- 926.

13. Baka SG, Toth TL, Veeck LL, Jones HW Jr, Muasher SJ, Lanzendorf SE. Evaluation of the Spindle Apparatus of in-Vitro Matured Human Oocytes Following Cryopreservation. Hum Reprod 1995; 10(7): 1816-20.

14. Toth TL, Lanzendorf SE, Sandow BA, Veeck LL, Hassen WA, Hansen K, Hodgen GD. Cryopreservation of Human Prophase I Oocytes Collected from Unstimulated Follicles. Fertil. Steril 1994; 61; 1077-1082.

15. Park SE, Chung HM, Cha KY, Hwang WS, Lee ES, Lim JM. Cryopreservation of ICR Mouse Oocytes: Improved Post-Thawed Preimplantation Development after Vitrification Using Taxol, a Cytoskeleton Stabilizer. Fertil Steril 2001; 75 (6): 1177-84.

16. Cetin Y, Bastan A. Cryopreservation of Immature Bovine Oocytes by Vitrification in Straws. Anim Reprod Sci 2006; 92(1-2): 29-36.

17. Whittingham DG. Fertilization in Vitro and Development to Term of Unfertilized Mouse Oocytes Previously Stored at -196 Degrees C. J Reprod Fertil 1977; 49 (1): 89-94.

18. Asada M, Horii M, Mogoe T, Fukui Y, Ishikawa H, Ohsumi S. In Vitro Maturation and Ultrastructural Observation of Cryopreserved Minke Whale (Balaenoptera Acutorostrata) Follicular Oocytes. Biol Reprod 2000; 62 (2); 253-9.

19. Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. Vitrification of Buffalo (Bubalus Bubalis) Oocytes. Theriogenology 2000; 53 (6); 1295-303.

20. Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. Vitrification of Human Embryos Based on the Assessment of Suitable Conditions for 8-Cell Mouse Embryos. Hum Reprod 1998; 13(10); 2874-9.

21. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A Simple Method for Mouse Embryo Cryopreservation in a Low Toxicity

Archive of SID

www.SID.ir

Vitrification Solution, Without Appreciable Loss of Viability. J Reprod Fertil 1990; 89 (1): 91-7.

22. Kasai M, Iritani A, Chang MC. Fertilization in Vitro of Rat Ovarian Oocytes after Freezing and Thawing. Biol Reprod 1979; 21(4): 839-44.

23. Ishida GM, Saito H, Ohta N, Takahashi T, Ito MM, Saito T, Nakahara K, Hiroi M. The Optimal Equilibration Time for Mouse Embryos Frozen by Vitrification with Trehalose. Hum Reprod 1997; 12 (6): 1259-62.

24. Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, Tomagane H. Ultrastructure of Bovine in Vitro Produced Blastocysts Cryopreserved by Vitrification. Zygote 1998; 6: 17–26.

25.Hurt A E, Landim F, Seidel G E, Squires E L. Vitrification of Immature and Mature Equine and Bovine Oocytes in An Ethylene Glycol, Ficoll and Sucrose Solution Using Open-Pulled Straws. Theriogenology 2000; 54, 119–128.

26. Cooper A, Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW. Differential Effects of Cryopreservation on Nuclear or Cytoplasmic Maturation in Vitro in Immature Mouse Oocytes from Stimulated Ovaries. Hum Reprod 1998; 13: 971–978.

27. Khosravi-Farsani S, Sobhani A, Amidi F, Mahmoudi R. Mouse Oocyte Vitrification: The Effects of Two Methods on Maturing Germinal Vesicle Breakdown Oocytes. J Assist Reprod Genet 2010; 27:233–238.

28. Vozzi C, Formenton A, Chanson A, Senn A, Sahli R, Shaw P, Nicod P, Germond M, Haefliger JA. Involvement of Connexin 43 in Meiotic Maturation of Bovine Oocytes. Reproduction 2001; 122:619–628.

29. Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE, Eppig JJ. Developmental Capacity of Mousee Oocytes Cryopreserved Befor and after Maturation in Vitro. J. Reprod. Fertil 1990 89:43-50.

30. Mahmodi R, Abbasi M, Amiri I, Ragardi Kashani I, Pasbakhsh P, Saadipour K, Amidi F, Abolhasani F, Sobhani A. Cumulus Cell Role On Mouse Germinal Vesicle Oocyte Maturation,Fertilization, and Subsequent Embryo Development To Blastocyst Stage in Vitro. Yakhteh Medical Journal 2009; 11(3): 299-302.

31. Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T, Kasai M. Successful Vitrification of Bovine Blastocysts, Derived By In Vitro Maturation and Fertilization. Mol Reprod Dev 1993; 34: 266–271.

32. Kuwayama M, Fujikawa S, Nagai T. Ultrastructure of IVM-IVF Bovine Blastocysts Vitrified after Equilibration In Glycerol 1,2-Propanediol Using 2-Step and 16-Step Procedures. Cryobiology 1994; 31: 415-422.

33. Nagai T. The Improvement Of In Vitro Maturation Systems for Bovine And Porcine Oocytes. Theriogenology. 2001 55:1291–1301.

34. Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular Basis For Paracrine Regulation Of Ovarian Follicle Development. Reproduction, 2001; 121, 647-653.

35. Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T. Maturation of Pig Oocytes in Vivo and in Vitro. J Reprod Fertil 1990; 40 (Suppl.), 197–210.

36. Ka HH, Sawai K, Wang WH, Im KS, Niwa K. Amino Acids in Maturation Medium and Presence of Cumulus Cells at Fertilization Promote Male Pronuclear Formation in Porcine Oocytes Matured and Penetrated In Vitro. Biol Reprod 1997; 57, 1478–1483.

37. Dode MA, Graves C. Involvement of Steroid Hormones on in Vitro Maturation of Pig Oocytes. Theriogenology 2002; 57, 811–821.

38. Yamauchi N, Nagai T. Male Pronuclear Formation in Denuded Porcine Oocytes after In Vitro Maturation In The Presence of Cysteamine. Biol Reprod 1999; 61: 828–833.

Archive of SID

www.SID.ir

Assessment of *in vitro* Maturation and Fertilization of BDF1 Mice Germinal Vesicle Oocytes with and without Cumulus Cell after Vitrification

Rajahei F.(Ph.D)[1]- Nasiri E.(Ph.D)[2]- Roozbehi A.(Ph.D)[3]- Delaviz H.(Ph.D)[3]- Abidi H.(M.Sc)[3]- Aryanpoor R.(M.Sc)[3]- *Mahmoudi R.(Ph.D)[3]

***Corresponding Address:** Cellular and molecullar research center, Yasouj University of Medical Sciences, Yasouj, IRAN

Email: rmahmoudi40@yahoo.com

Received: 27/Jun/2011 Accepted: 8/Oct/2011

Abstract

Introduction: Improving pregnancy rate associated with the use of cryopreserved oocytes would be an important advancement in human Assisted Reproductive Technology (ART). Vitrification allows glasslike solidification of a solution, a physical process, without ice crystal formation in the living cells.

Objective: The purpose of this study was to evaluate the viability of the oocytes, *in vitro* maturation and embryo development vitrified germinal vesicle oocytes after single and stepwise exposure to cryoprotectants.

Materials and Methods: Germinal vesicle oocytes with or without cumulus cells were transferred to a verification solution composed of 30 % M sucrose (v/v) ethylene glycol, 18% (w/v) Ficoll-70 , and 0.3 M sucrose either by single step or in a step-wise fashion. After verification and storage in liquid nitrogen, the oocytes were thawed and washed twice in the medium TCM119 and then subjected to *in vitro* maturation, fertilization and culture.

Results: The oocytes survival rates after vitrifying-warming, maturation rate, the capacity of fertilization and embryonic development to 2-cell were examined *in vitro*. The oocytes surviving, maturing to MII, fertilization developmental rate in the step-wise exposure were significantly higher (P<0/05), compared with the corresponding rate in single step procedure.

Conclusion: The results of the present study indicated that oocytes vitrified with cumulus cells and stepwise procedure had a positive effect on the maturation and developmental rate than oocytes without cumulus cell and single step procedure.

Key words: Cumulus Cells/ Ethylene Glycol/ Fertilization in Vitro/ Freezing/ Mice

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 81, Pages: 1-11

Archive of SID

1. Cellular and molecullar research center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, IRAN
2. Cellular and molecullar research center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, IRAN
3. Cellular and molecullar research center, Yasouj University of Medical Sciences, Yasouj, IRAN

www.SID.ir