مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۶، شماره۴، مهر و آبان ۱۳۹۰(شماره پی در پی ۶۴)

بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک ژرمینال وزیکول پس از انجماد شیشه‌ای با استفاده ازضد یخ اتیلن گلیکول و دی‌متیل سولفوکساید در موش

امید میاحی[۱]، حمداله دلاویز[۲]، کامبیز کریم زاده شیرازی[۳]، امرالله روزبهی[۲]، سمیه خسروی فارسانی [۴]، رویا آریانپور[۲]، رضا محمودی[۲*]

[۱] دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، [۲]دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، [۳]دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده بهداشت، گروه آموزش بهداشت، [۴] دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۳/۸

چکیده

زمینه و هدف: انجماد تخمک، بخش مهمی‌از بیوتکنولوژی تولید مثل می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تماس با ترکیب ضد یخ‌ها و انجماد شیشه‌ای بر تخمک نابالغ موش در حضور یا عدم حضور سلول‌های کومولوس بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شد. تخمک‌های نابالغ با و بدون سلول کومولوس از تخمدان موش‌های ۶-۴ هفته‌ای جدا و با استفاده از ترکیب اتیلن گلیکول، دی‌متیل سولفوکساید و ساکاروز به عنوان محلول انجماد شیشه‌ای منجمد شدند و گروهی نیز بدون انجماد تنها با این ترکیب تماس داده شدند. بعد از ذوب، تخمک‌ها از لحاظ بلوغ و لقاح بررسی شدند. داده‌ها با استفاده آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: میزان لقاح و بلوغ در تخمک‌های منجمد شده همراه با سلول‌های کومولوس به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود($p<۰/۰۵$). میزان بلوغ در گروه‌های تماس یافته با ضدیخ به طور معنی‌داری از گروه‌های انجمادی و کنترل کمتر بود($p<۰/۰۵$). حضور سلول‌های کومولوس در تمامی گروه‌های آزمایش و کنترل باعث افزایش معنی‌دار میزان لقاح نسبت به تخمک‌های بدون کومولوس شد($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: تخمک‌های مرحله ژرمینال وزیکول در حضور یا عدم حضور سلول‌های کومولوس می‌توانند به طور موفقی انجماد شیشه‌ای شوند. تماس با ضدیخ‌ها می‌تواند باعث کاهش توانایی تکاملی تخمک‌های ژرمینال وزیکول شود. حضور سلول‌های کومولوس می‌تواند باعث افزایش میزان لقاح در طی فرآیند لقاح آزمایشگاهی گردد.

واژه‌های کلیدی: تخمک، سلول‌های کومولوس، انجماد شیشه‌ای، بلوغ آزمایشگاهی

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

E-mail: rmahmoudi40@yahoo.com

مقدمه

توانایی انجماد تخمک[1] و جنین یکی از مسایل حیاتی جهت ادامه توسعه و پیشرفت‌های تکنولوژی تولید مثل کمکی[2]، جهت درمان ناباروری می‌باشد(۱). روش انجماد برای حفظ تخمک خانم‌هایی که فعالیت تخمدان آنها به دلایل مختلف مانند بیماری‌های لگنی، درمان‌های کلینیکی هم چون رادیوتراپی و شیمی درمانی کاهش می‌یابد و یا تخمک‌های آنان آسیب می‌بیند، روش مناسبی می‌باشد. در گذشته جنین و تخمک با استفاده از غلظت‌های پایین ضدیخ‌ها و تکنیک انجماد آهسته[3]منجمد می‌شدند(۵ـ۱)، اما این روش باعث کاهش قابلیت زنده ماندن سلول‌ها می‌شد(۶). روش انجماد شیشه‌ای، انجماد محلول در دماهای بسیار پایین (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) بدون تشکیل هیچ‌گونه یخ درون سلولی می‌باشد. این روش به سرعت به عنوان یک روش مهم جهت جایگزینی روش‌های سنتی انجماد مورد توجه قرار گرفت. زیرا گزارش‌های متعددی مبنی بر این که انجماد شیشه‌ای می‌تواند نسبت به روش سنتی جهت انجماد تخمک پستانداران مؤثرتر و بهتر باشد، ارایه گردید. مطالعات نشان داد که روش انجماد آهسته باعث سفتی زونا پلوسیدا به دلیل آزاد شدن گرانول‌های قشری و شکستن کروموزوم‌ها باعث کاهش باروری آنها می‌شود(۸ و۷).

جنین موش را می‌توان با قرار دادن در محلول تغلیظ شده ضدیخ و سپس سرد کردن آن با قرار دادن سریع در نیتروژن مایع، با موفقیت منجمد نمود. بقاء تخمک و جنین‌های پستانداران بعد از انجماد بسته به مرحله تکاملی و بلوغ آنها متفاوت است(۱۰ و۹). یکی دیگر از فاکتورهایی که به نظر می‌رسد می‌تواند بر نتیجه تکنیک انجماد تأثیرگذار باشد سلول‌های کومولوس می‌باشد. امروزه تاکید شده است که همراهی سلول‌های کومولوس با تخمک‌های مرحله ژرمینال وزیکول جهت مراحل بلوغ تخمک و به دنبال آن تکوین به مرحله جنینی، حیاتی می‌باشند(۱۰). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که تخمک‌های مرحله ژرمینال وزیکول که بدون سلول‌های کومولوس نسبت به تخمک‌های با کومولوس، دارای توانایی تکامل کمتری می‌باشند(۱۴ـ۱۲). یکی از فاکتورهایی که می‌تواند بر میزان موفقیت انجماد تخمک‌های نابالغ اثر بگذارد، میزان آسیب به سلول‌های کومولوس در بر گیرنده تخمک می‌باشد(۱۵). نگهداری سلول‌های کومولوس تخمک‌های نابالغ در طی انجماد، همچنان به عنوان یک سئوال مناقشه برانگیز مطرح است که می‌تواند تابع تفاوت‌های خاص گونه‌های مختلف باشد(۱۶). احتمالاً سلول‌های کومولوس یک نقش محافظتی در مقابل شوک اسمزی ناشی از تغلیظ سریع یا رقیق‌سازی ضدیخ‌ها دارند(۱۷).

یکی دیگر از پارامتر مهم در طی انجماد تخمک، موضوع ضدیخ‌های مورد استفاده در فرآیند انجماد

1-Cryopreservation
2-Assisted Reproductive Technology
3-Slow Freezing

می‌باشد. انواع ضدیخ‌ها با خاصیت نفوذپذیری یا عدم نفوذپذیری به سلول و با غلظت‌های متفاوت جهت انجماد تخمک گونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. شایع‌ترین ضدیخ‌های مورد استفاده در روش انجماد شیشه‌ای شامل؛ دی‌متیل سولفوکساید، پروپاندیول، پلی اتیلن گلیکول، دکستروز و استامید می‌باشند(۱۷). شایع‌ترین ترکیب مورد استفاده، ترکیب اتیلن گلیکول، دی‌متیل سولفوکساید و ساکاروز می‌باشد. اضافه کردن دی‌متیل سولفوکساید به محیط کشت محتوی اتیلن گلیکول در تسهیل انجماد شیشه‌ای به علت خواص بهتر gloss-forming مربوط به دی‌متیل سولفوکساید می‌باشد، به علاوه، خاصیت نفوذپذیری هر کدام از ضدیخ‌ها در حضور دیگری تقویت می‌شود(۱۸). در مطالعه‌های متعددی بر روی گونه‌های مختلف، از ترکیب این ضدیخ ها با غلظت‌های متفاوت استفاده شده است، همچنین مدت زمان تماس با ضدیخ ها، نحوه اضافه کردن ضدیخ‌ها، نوع تخمک مورد استفاده، روش انجمادی و سایر متغیرها نیز متفاوت می‌باشد(۲۴-۱۹).

با توجه به تناقضات مختلف در مورد نقش سلول‌های کومولوس در میزان بقاء، توانایی بلوغ آزمایشگاهی و لقاح و تکوین به مراحل بعدی در تخمک ژرمینال وزیکول و همچنین تأثیر ترکیب ضدیخ‌ها بر پیامد انجماد شیشه‌ای، این مطالعه با هدف بررسی بلوغ و لقاح آزمایشگاهی تخمک ژرمینال وزیکول با استفاده از ضدیخ اتیلن گلیکول و دی‌متیل سولفوکساید در موش نژاد NMRI انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شد.

پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و در کمیته اخلاق دانشگاه به تصویب رسید.

در این تحقیق از موش‌های نژاد NMRI (۶-۴ هفته) استفاده شد. برای تحریک تخمک‌گذاری ۵ واحد بین‌المللیPMSG به طریق داخل صفاقی به موش تزریق شد. بعد از ۴۸ ساعت موش‌ها با کشش و جا به جایی مهره‌های گردن کشته شده و بلافاصله تخمدان آنها را برداشته شد و در محیط کشت HTF[1] به عنوان محیط جمع‌آوری کننده تخمک قرار داده شد. سپس در زیر استریو میکروسکوپ تخمک مرحله ژرمینال وزیکول (با و بدون کومولوس) به وسیله سوزن انسولین از فولیکول آنترال تخمدان جدا گردید. تخمک‌های جدا شده به طور تصادفی در شش گروه قرار گرفتند؛ گروه اول و دوم به ترتیب شامل تخمک‌های ژرمینال وزیکول با و بدون سلول‌های کومولوس (کنترل) که درمعرض محیط کشت α-MEM[2] قرار گرفتند. گروه سوم و چهارم، تخمک‌های ژرمینال وزیکول با و بدون سلول‌های کومولوس که فقط در معرض ضد یخ قرار گرفتند (بدون انجماد شیشه‌ای). گروه پنجم و ششم

1-Human Tubal Fluid (HTF)

2- Alpha Minimum Essential Medium (α -MEM)

تخمک‌های ژرمینال وزیکول با و بدون سلول‌های کومولوس که ابتدا در معرض محلول ضدیخ(دی متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول) و سپس تحت انجماد شیشه‌ای قرار گرفتند. تخمک‌هایی که در معرض ضدیخ و انجماد قرار گرفته بودند، پس از ذوب همانند گروه کنترل به مدت ۲۴ ساعت در داخل محیط کشت α-MEM قرار داده شدند تا به متافاز ۲ برسند. سپس تخمک‌های بالغ با اسپرم لقاح داده شده و با استفاده از میکروسکوپ معکوس تا مرحله دو سلولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در هر گروه این آزمایش‌ها ۵ تا ۶ بار تکرار گردید.

روش انجماد تخمک به این طریق بود که تخمک ژرمینال وزیکول با و بدون کومولوس به مدت ۵ دقیقه در داخل محلول تعادل[1] که شامل؛ ۷/۵ درصد اتیلن گلیکول، ۷/۵ درصد دی متیل سولفوکساید و ۲۰ درصد سرم آلبومین انسانی بود، قرار می‌گرفتند و سپس به مدت ۶۰ ـ۳۰ ثانیه در محلول انجمادی[2] که شامل؛ ۱۵درصد اتیلن گلیکول، ۱۵ درصد دی متیل سولفوکساید، ساکاروز ۰/۵مولار و۲۰ درصد سرم آلبومین انسانی بود، قرار گرفتند. بعد از طی این مراحل تخمک‌ها به داخل نی انجمادی منتقل و سپس نی انجمادی به مدت ۱۰ ثانیه روی بخار نیتروژن قرار گرفت و بعد به داخل نیتروژن مایع منتقل گردیدند و پس از یک تا ۵ روز ذوب شدند.

پس از خارج نمودن نی انجمادی حاوی تخمک از درون نیتروژن مایع، ابتدا به مدت ۱۰ ثانیه روی بخار نیتروژن مایع نگه داشته شدند و سپس به مدت ۱۰ ثانیه در داخل حمام آب گرم ۳۷ درجه قرار گرفتند، بعد از این مراحل با دستمال کاغذی خشک شدند و سپس نی انجمادی از طرف خمیر هماتو کریت بریده شده و محتویات نی انجمادی به داخل قطره ذوب که شامل؛ ساکاروز ۱ مولار و ۲۰ درصد سرم آلبومین انسانی بود، ریخته می‌شد و به مدت ۲ـ۱ دقیقه در این قطره نگهداری می‌شدند. سپس به داخل محلول رقیق کننده که شامل؛ ساکاروز ۰/۵ مولار و ۲۰ درصدسرم آلبومین انسانی بود، منتقل شده و به مدت ۳ دقیقه در این محلول نگهداری شدند. آنگاه به داخل قطره ۲۰۰ میکرولیتری محلول شستشوی یک و دو هر کدام به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند تا ضدیخ که برای تخمک سمی می‌باشد از تخمک خارج گردد. بعد از طی این مراحل تخمک‌های ذوب شده به داخل محیط کشت α-MEM منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در این محیط نگهداری شدند، سپس تخمک‌هایی که به متافاز ۲ رسیده بودند، با اسپرم لقاح داده شده و مراحل تکاملی تخمک تا مرحله دو سلولی در زیر میکروسکوب معکوس بررسی قرار گرفتند.

برای اسپرم‌گیری از موش نر ۱۲ هفته‌ای از همان نژاد استفاده شد و پس از تهیه اسپرم از اپی دیدیم موش نر، آنها به داخل محیط لقاح انتقال داده شده و جهت ظرفیت‌دار شدن به مدت ۲ـ۱/۵ ساعت در داخل انکوباتور۳۷ درجه با ۵ درصد

1-Equlibration Solution
2-Vitrification Solution

دی اکسیدکربن قرار گرفتند. بعد از ظرفیت‌دار شدن اسپرم‌ها، به مقدار یک میلیون اسپرم در میلی‌لیتر به تخمک‌هایی که در محیط α-MEM به بلوغ رسیده‌اند و اینک به محیط لقاح منتقل شده بودند، اضافه گردید. به مدت ۶ تا ۸ ساعت در این حالت صبر نموده، سپس تخمک‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. با مشاهده پرونکلئوس تخمک‌ها برای تکامل بیشتر به داخل محیط KSOM[1] منتقل شدند. با استفاده از میکروسکوپ معکوس مراحل تکاملی تخمک‌ها تا رسیدن به مرحله دو سلولی بررسی شده و اطلاعات به دست آمده ثبت گردیدند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS [2] و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه[3] و تست توکی[4] تجزیه و تحلیل شدند.

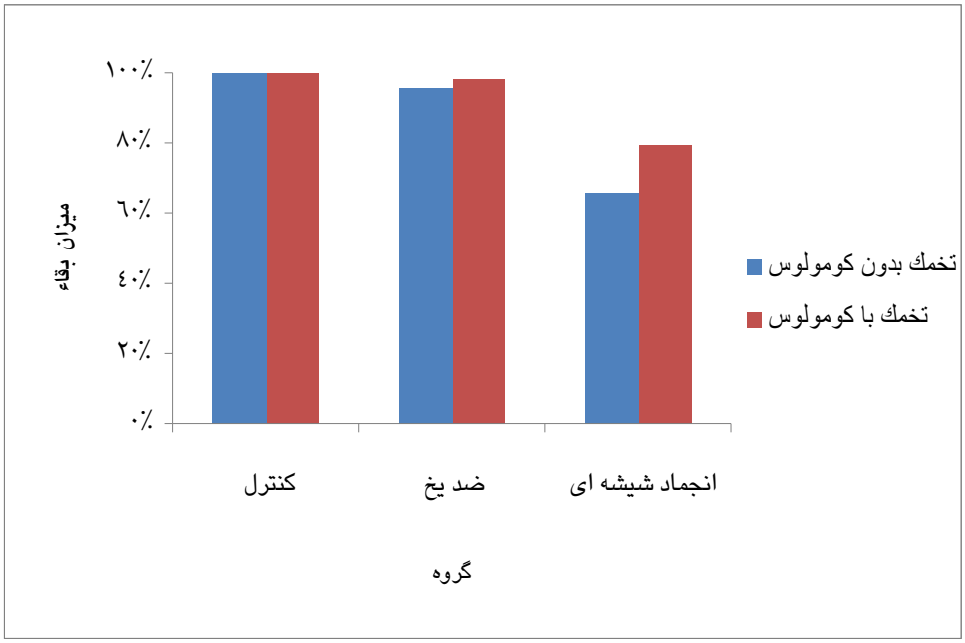
یافته ها

بیشترین میزان بقاء در گروه‌های کنترل به دلیل عدم قرارگیری در معرض ضد یخ و انجماد شیشه‌ای به میزان ۱۰۰ درصد بود. در گروه‌های در معرض ضدیخ قرار گرفته، گروه همراه با سلول کومولوس از میزان بقای بیشتری برخوردار بود (۹۸/۳ درصد در برابر۹۵/۴ درصد). همچنین در گروه انجماد شیشه‌ای، میزان بقای تخمک‌های همراه با سلول کومولوس بیشتر بود(۷۹/۶ درصد در مقابل ۶۵/۶ درصد)(نمودار ۱).

بیشترین میزان بلوغ آزمایشگاهی مربوط به گروه انجماد شیشه‌ای همراه با سلول‌های کومولوس می‌باشد(۸۷/۵ درصد). این میزان در گروه انجماد شیشه‌ای بدون سلول کومولوس۸۵/۸ درصد بود. همچنین کمترین میزان بلوغ مربوط به گروه بدون سلول کومولوس که در معرض ضدیخ قرار گرفته بود (۶۶/۹ درصد) می‌باشد(نمودار۲). بیشترین میزان لقاح مربوط به گروه کنترل همراه سلول‌های کومولوس(۸۸ درصد) و کمترین میزان لقاح نیز مربوط به گروه بدون سلول کومولوس(۶۳/۱درصد) بود، که در معرض ضد یخ قرار گرفته بودند. مجدداً در هر سه گروه میزان لقاح در گروه های همراه با سلول کومولوس نسبت به گروه‌های بدون سلول کومولوس بیشتر بود(نمودار۳).

بیشترین میزان تکوین به مرحله دو سلولی مربوط به گروه کنترل بدون سلول کومولوس(۹۱/۱درصد) می‌باشد. کمترین میزان تکوین به مرحله دو سلولی نیز در گروه انجماد شیشه‌ای بدون سلول کومولوس(۸۳/۸ درصد) صورت گرفت. در این متغیر بر خلاف سایر متغیرها، میزان تکوین به مرحله دو سلولی، در گروه تخمک‌های بدون سلول کومولوس بیشتر از تخمک‌های همراه با سلول کومولوس در معرض ضدیخ بود(به ترتیب ۹۰ درصد و ۸۸/۷ درصد)(نمودار۴).

1- Potassium Simplex Optimized Medium(KSOM)
2-Statistical Package for Social Sciences
3- One-Way Analysis of Variance
4-Tukey



نمودار ۱: مقایسه میزان بقاء تخمک‌های ژرمینال وزیکول با و بدون سلول کومولوس در گروه های کنترل و مداخله

نمودار۲: مقایسه میزان بلوغ تخمک‌های ژرمینال وزیکول با و بدون کومولوس در گروه های کنترل و مداخله

نمودار ۳: مقایسه میزان لقاح تخمک‌های ژرمینال وزیکول با و بدون کومولوس در گروه های کنترل و مداخله

نمودار ۴: مقایسه میزان تکوین به مرحله دو سلولی تخمک‌های ژرمینال وزیکول با و بدون کومولوس در گروه های کنترل و مداخله

بحث

توانایی انجماد تخمک وجنین یکی از مسایل حیاتی جهت ادامه توسعه و پیشرفت‌های تکنولوژی تولید مثل کمکی، جهت درمان ناباروری می‌باشد(۱).

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تماس با ترکیب ضد یخ‌ها و انجماد شیشه‌ای بر تخمک نابالغ موش در حضور یا عدم حضور سلول‌های کومولوس بود.

این بررسی نشان داد که تخمک‌های مرحله ژرمینال وزیکول موش در حضور یا عدم حضور سلول‌های کومولوس توانایی تکوین تا مرحله دوسلولی را دارند. همچنین مقایسه نتایج گروه‌ها

نشان داد که تماس تخمک با مواد شیمیایی به عنوان ضدیخ و همچنین انجماد شیشه‌ای باعث کاهش توانایی تخمک جهت طی مراحل تکاملی نسبت به گروه کنترل می‌شود. در گروه‌های مورد مطالعه، حضور سلول‌های کومولوس باعث بهبود نتایج در همه شاخص‌های تکاملی تخمک‌ها شد به جز در میزان تکامل به مرحله دوسلولی در گروه‌های کنترل و در معرض ضدیخ که تخمک‌های بدون کومولوس از توانایی بیشتری برخوردار بودند، هرچند تفاوت معنی‌دار نبود.

سال‌های زیادی است که انجماد شیشه‌ای به عنوان یک جایگزین امید بخش به جای روش انجماد آهسته در انجماد تخمک مورد توجه قرار گرفته است. روش‌های متعددی برای کاهش احتمال تشکیل یخ طی انجماد شیشه‌ای ارایه شدند، که شامل؛ بررسی ضدیخ‌ها با غلظت‌های متفاوت، استفاده از ترکیب‌های مختلف ضد یخ، کم کردن حجم ضد یخ و استفاده از استراتژی‌های مختلف سرد کردن می‌باشند(۲۵). ترکیب چند ضد یخ با یکدیگر که در نتیجه امکان استفاده از غلظت‌های کمتر ضد یخ را به وجود می‌آورد، در مطالعه‌های متعددی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر نیز از ترکیب دو ضد یخ رایج یعنی اتیلن گلیکول و دی‌متیل سولفوکساید استفاده شد. ترکیب دو یا چند ضد یخ باعث کاهش سمیت خاص هر کدام از آنها می‌شود. همچنین نفوذپذیری هر کدام در حضور دیگری تغییر می‌کند. در مطالعه زو و همکاران[1](۲۰۱۰) میزان بقای تخمک‌های با کومولوس بعد از ذوب ۹۳/۸ درصد بود که این میزان در مطالعه حاضر۷۹/۶ درصد بود(۲۵). این تفاوت را می‌توان به روش انجمادی مورد استفاده در این مطالعه که کرایوتوب می‌باشد نسبت داد که دارای برتری‌هایی نسبت به نی‌های انجمادی مرسوم مورد استفاده در مطالعه اخیر می‌باشد.

میزان بقاء تخمک‌های با کومولوس در مطالعه حاضر تقریباً مشابه نتایجی است که دشموخ و همکاران[2](۲۰۱۰) در مطالعه خود بر روی تخمک نابالغ بوفالو و با غلظت ۱۵ درصد از دو ضد یخ دی‌متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول به دست آوردند(۲۱). البته بهتر بودن نتایج مطالعه دشموخ و همکاران(۲۰۱۰)می‌تواند تا حدودی مربوط به افزودن مرحله به مرحله ضدیخ‌ها در این مطالعه باشد. در مطالعه ذکر شده بهترین نتایج با غلظت ۲۵ درصد ضدیخ‌ها و با افزودن مرحله به مرحله ضدیخ‌ها به دست آمد. میزان بلوغ در غلظت ۲۵ درصد نیز به طور معنی‌داری بیشتر از بقیه گروه‌ها بود. همچنین در مطالعه یامادا و همکاران[3](۲۰۰۷) نیز بیشترین میزان بلوغ مربوط به گروهی بود که از غلظت ۲۵ درصد این دو ضدیخ استفاده شد(۲۶). میزان بقاء تخمک‌های با کومولوس در مطالعه ما کمتر از نتایج به دست آمده در مطالعه گاسپارینی و همکاران[4](۲۰۰۷) بود و در این مطالعه از غلظتی تقریباً نزدیک به مطالعه حاضر(۱۶/۵ درصد) شد(۲۷).

1-Zhou et al
2-Deshmukh et al
3-Yamada et al
4-Gasparini et al

حضور سلول‌های کومولوس و نقش آن در مراحل تکامل تخمک همواره مورد مناقشه بوده است. نتایج این تحقیق نشان داد که حضور سلول‌های کومولوس باعث بهبود نتایج در همه شاخص‌های تکاملی تخمک‌ها می‌شود. به جز در میزان تکامل به مرحله دو سلولی در گروه‌های کنترل و مواجهه که تخمک‌های بدون کومولوس از توانایی بیشتری برخوردار بودند هرچند تفاوت معنی‌دار نبود. حضور سلول‌های کومولوس باعث افزایش معنی‌دار میزان بقاء بعد از ذوب در تخمک‌های با کومولوس نسبت به تخمک‌های بی کومولوس شد. مشابه این نتیجه در مطالعه‌های دیگری به دست آمد(۲۷و۲۵). این در حالی است که در مطالعه‌های دیگری نشان دادند که حضور سلول‌های کومولوس باعث کاهش معنی‌دار میزان بقاء، تخمک‌ها بعد از ذوب می‌شود(۲۸ و ۱۵). این تناقض می‌تواند مربوط به نوع گونه، ضد یخ مورد استفاده و هم‌چنین تفاوت در میزان بلوغ تخمک‌های مورد استفاده باشد.

در مطالعه زاواره و همکاران[1](۲۰۰۹) که از تخمک ژرمینال وزیکول موش نژادNMRI استفاده شده بود میزان بلوغ تخمک‌های با کومولوس در گروه‌های انجمادی و کنترل به طور معنی‌داری بیشتر از تخمک‌های بدون کومولوس بود(۲۹). در حالی که در مطالعه دیگری که از تخمک ژرمینال وزیکول گوسفند استفاده شد، عکس این نتیجه به دست آمد(۱۵). این نتایج متناقض نقش حضور سلول‌های کومولوس در بلوغ تخمک را مشکل می‌سازد. مقایسه تخمک‌های با و بدون کومولوس در هر سه گروه مورد مطالعه اخیر نشان داد که میزان لقاح در همه گروه‌ها در حضور سلول‌های کومولوس به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. در صورتی که در مورد سایر شاخص‌ها این تفاوت دیده نشد. در مطالعه جهرمی و همکاران(۲۰۱۰) که از تخمک بالغ بدون کومولوس موش نژاد NMRI استفاده شد، میزان لقاح ۳۹ درصد به دست آمد (۳۰)، که نسبت به تخمک‌های بدون کومولوس در مطالعه حاضر، به طور چشمگیری کمتر است. این یافته می‌تواند مؤید نقش مهم سلول‌های کومولوس در جذب اسپرم به سمت تخمک و ایجاد محیط مناسب جهت نفوذ اسپرم به تخمک باشد. شاید نبود سلول‌های کومولوس در طی روند بلوغ تخمک‌های موش باعث افزایش مقاومت زونا پلوسیدا در مقابل توان هضم پروتئولیتیکی و نفوذ اسپرم شود. علاوه بر این گالتی و همکاران[2](۱۹۹۱) نیز در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که برداشت سلول‌های کومولوس باعث آزاد شدن زود هنگام گرانول‌های قشری می‌شوند که این نیز خود از دلایل سفت شدن زونا و کاهش میزان لقاح می‌باشد(۳۱).

در مقایسه گروه کنترل و انجماد شیشه‌ای، مشاهده شد که تأثیر انجماد بر شاخص‌های تکاملی تخمک‌های با کومولوس بیشتر از تخمک‌های بی کومولوس بود. به طوری که تفاوت گروه کنترل با

1-Zavaresh et al
2-Galeati et al

انجماد شیشه‌ای در تخمک‌های بدون کومولوس فقط در میزان بقاء معنی‌دار بود، در حالی که در سلول‌های با کومولوس در میزان بقاء، لقاح و تکوین به مرحله دوسلولی معنی دار بود. این در حالی است که در مطالعه زو و همکاران(۲۰۱۰) تخمک‌های بدون کومولوس همانند گروه با کومولوس، در مقایسه با گروه کنترل دچار کاهش معنی دار در میزان بقاء، تقسیم و تکوین به مرحله دوسلولی شدند(۲۵).

نتیجه‌گیری

در مجموع این مطالعه نشان داد، ترکیب دو ضد یخ نسبت به استفاده از یک ضد یخ به تنهایی می‌تواند، باعث نتایج بهتری در انجماد تخمک ژرمینال وزیکول شود. تماس با ضدیخ باعث کاهش میزان بقاء و توانایی تکاملی تخمک ژرمینال وزیکول می‌شود. حضور سلول‌های کومولوس باعث بهبود میزان بقاء و توانایی تکاملی تخمک و افزایش قابل توجه میزان لقاح تخمک می‌شود. احتمالاً استفاده از ترکیب ضدیخ‌های دیگر، روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای و وسایل انجمادی مانند کرایوتاپ و کرایوتیوب و نایلون مش می‌توانند، اثر بهتری بروی بلوغ و لقاع تخمک داشته باشند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه منتج از پایان نامه دانشجویی است که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شد.

REFERENCES:

1.Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet 1986; 1(8486):884-6.
2.Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. Fertil Steril 1997; 68: 724-726.
3.Porcu E, Fabbri R, Ciotti PM. Cycles of human oocyte cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection: results of 112 cycles. Fertil Steril 1999; 72(1): 165-71.
4.Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Sweitzer CL, Massey JB. Clinical application of human egg cryopreservation. Hum Reprod 1998; 13(11):3156-9.
5.Van Uem JF, Siebzehnrübl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. Lancet 1987; 28;1(8535):752-3.
6.Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes andovarian tissue. Theriogenology 2000; 1;53(1):59-72
7.Carroll J, Depypere H, Matthews CD.Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. J Reprod Fertil 1990; 90(2):547-53.
8.Prentice JR, Singh J, Dochi O, Anzar M. Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine cumulus-oocyte complexes. Theriogenology 2011; 75(4): 602-9.
9.Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196ºC by vitrification. Nature1985; 313: 573-5.
10.Pedro PB, Yokoyama E, Zhu SE, Yoshida N, Valdez DM, Tanaka M, et al. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. J Reprod Dev 2005; 51: 235–46.
11.Fagbohun CF, Downs SM. Metabolic coupling and ligandstimulated meiotic maturation in the mouse oocyte-cumulus cell complex. Biol Reprod 1991; 45: 851-9.
12.Schroeder AC, Eppig JJ. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. Dev Biol 1984; 102: 493-7.
13.Mahmodi R, Abbasi M, Amiri I, Kashani IR, Pasbakhsh P, Saadipour K, et al. 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.
14.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: 233–8.
15.Bogliolo L, Ariu F , Fois S , Rosati I, Zedda G, Leoni S, et al. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. Theriogenology 2007; 68: 1138–49.
16.Modina S, Beretta M, Lodde V, Lauria A, Luciano AM. Cytoplasmic changes and developmental competence of bovine oocytes cryopreserved without cumulus cells. Eur J Histochem 2004; 48: 337–46.
17.Porcu E. Oocyte freezing. Seminars in Reproductive Medicine 2001; 19(3):221-30.
18.Morato R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. Cryobiology 2008; 57: 137-41.
19.Succu S, Leoni GG, Berlinguer F, Madeddu M, Bebbere D, Mossa F, et al. Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes. Theriogenology 2007; 68: 107–14.
20.Cetin Y, Bastan A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. Animal Reproduction Science 2006; 92: 29–36.
21.Deshmukh SP, Pawshe CH, Ingawale MV, Deshmukh SG. In vitro maturation of buffalo immature oocyte after vitrification with combination of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide.. Buenos Aires 2010; proceedings 9th world buffalo congress.
22.Mahmoud K, Scholkamy TH, Ahmed YF, Seidel GE, Nawito MF. Effect of different combinations of cryoprotectants on in vitro maturation of immature buffalo (bubalus bubalis) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods. Reprod Dom Anim 2010; 45: 565–71.
23.Almasi-Turk S, Roozbehi A, Aliabadi E, Haeri A, Sadeghi Y, Hosseini A. Developmental consequences of mouse cryotop-vitrified oocyte and embryo using low concentrated cryoprotectants. Iranian Journal of Reproductive Medicine 2009; 4(7): 181-8.

24.Cocchia N, Ciani F, Russo M, Rass RE, Rosapane I, Avallone L, Tortora G, Lorizio R. Immature cat oocyte vitrification in open pulled straws (OPSs) using a cryoprotectant mixture. Cryobiology 2010; 60: 229–34.
25.Zhou XL, Naib AA, Sun DW, Lonergan P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. Cryobiology 2010; 61: 66–72.
26.Yamada C, Vasconcellos H, Caetano A, Simoes R, Nicacio AC, Beringui W, et al. Immature bovine oocyte cryopreservation: Comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. Animal Reproduction Science 2007; 99: 384–8.
27.Gasparrini B, Attanasio L, Rosa AD, Monaco E, Palo RD, Campanile G. Cryopreservation of in vitro matured buffalo (Bubalus bubalis) oocytes by minimum volumes vitrification methods. Animal Reproduction Science 2007; 98: 335–42.
28.Chian R, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. Journal of Reproduction and Development 2004; 50(6): 684-96.
29.Zavareh S, Salehnia M, Saberivand A. Comparison of different vitrification procedures on developmental competence of mouse germinal vesicle oocytes in the presence or absence of cumulus cells. International Journal of Fertility and Sterility 2009; 3(3): 111-8.
30.Jahromi ZK, Amidi F, Nori Mugehe SM, Sobhani Ak, Mehrannia K, Abbasi M, et al. Expression of heat shock protein (hsp a1a) and mnsod genes following vitrification of mouse mii oocytes with cryotop method.Yakhteh Medical Journal 2010; 12(1): 113-9.
31.Galeati G, Modina S, Lauria A, Mattioli M. Follicle somatic cells influence pig oocyte penetrability and cortical granule distribution. Mol Reprod Dev 1991; 29(1): 40–6.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

In Vitro Maturation and Fertilization of Cryopreserved Germinal Vesicle Stage Oocytes in NMRI Mice, Using Ethylene Glycol and DMSO

Mayahi O[1], Delaviz H[2], Karimzadhe Shirazi K[3], Roozbehi A[2], Khosravi Farsani S[4], Aryanpour R[2], Mahmoudi R[2*],

[1]Student Research Committee, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran [2]Department of Anatomy, Cellular and Molecullar Research Center, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [3]Department of Public Health, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [4]Department of Anatomy,Theran University of Medical Sciences, Theran, Iran

Received:4 Apr 2011 Accepted: 29 May 2011

Abstract

Background & Aim: Cryopreservation of oocytes is an essential part of reproductive biotechnology. The objective of the present study was to investigate the effects of exposure to combination of cryoprotectants and vitrification on immature mouse oocytes with or without cumulus cells.

Methods: This was an experimental study conducted at Yasouj University of Medical Sciences in 2010. Immature oocytes with and without cumulus cells were isolated from ovaries of mice 4-6 weeks of age. They were vitrified in conventional straw using ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO) and sucrose as vitrification solution or exposed to vitrification solution without subjected to liquid nitrogen. After warming, oocytes were assessed for nuclear maturation and fertilization. The collected data were analyzed with one-way ANOVA and Tukey test.

Results: Survival and fertilization rates in vitrified oocytes with cumulus cells were significantly lower than the control group ($p<0.05$). Maturation rates in exposure groups were significantly lower than the vitrified and control groups ($p<0.05$). The fertilization rate increased significantly in all experiment and control groups with cumulus cells in comparison with denuded oocytes ($p<0.05$).

Conclusion: Germinal vesicle stage oocytes in the presence or absence of cumulus cells can be vitrified successfully. Exposure to cryoprotectants can decrease the developmental competence of GV oocytes. Presence of cumulus cells can increase the fertilization rate in IVF procedure.

Keywords: Oocyte, Cumulus cells, Vitrification, Maturation

* **Corresponding Author: Mahmoudi R,** Department of Anatomy, Cellular and Molecullar Research Center, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
Email:rmahmoudi40@yahoo.com