ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۸، شماره۸، آذر۱۳۹۲(شماره پی در پی۸۰)

مقاله پژوهشی

میزان بلوغ و تکوین جنینی تخمک مرحله ژرمینال وزیکول موش به بلاستوسیست پس از انجماد شیشه‌ای

محسن نیک سرشت[۱]، طاهره راستی[۲]، مهرزاد جعفری برمک[۱]، هاتف قاسمی حمید آبادی[۳]، زهرا رضایی[۱]، فاطمه دهقانی[۱]، رضا محمودی[۱*]

[۱] مرکز تحقیقات سلولی ومولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۲] کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران،[۳] گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۶/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: یکی از روش‌های نگهداری به منظور حفظ قدرت باروری، انجماد شیشه‌ای است که روشی ساده و فوق سریع است. بهبود میزان حاملگی با استفاده از روش‌های انجمادی تخمک‌ها به عنوان یک فاکتور مهم به پیشرفت فناوری باروری آزمایشگاهی کمک می‌کند. هدف این مطالعه ارزیابی میزان زنده ماندن، بلوغ آزمایشگاهی و تکامل جنینی تخمک مرحله ژرمینال وزیکول به بلاستوسیست پس از انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول، با و بدون سلول‌های کومولوس در محلول انجماد شیشه‌ای که شامل ۳۰ درصد اتیلن گلیکول، ۱۸ درصد فایکول ۷۰ و ۰/۳ مولار ساکارز به روش یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای منجمد شدند. پس از انجماد و قرار دادن در داخل نیتروژن مایع، تخمک‌ها ذوب شده و دو مرتبه در داخل محیط کشت شستشو داده شدند. میزان زنده ماندن تخمک‌ها، بلوغ تخمک و رسیدن آن به مرحله متافاز۲، لقاح و تکوین جنین به مرحله‌ی بلاستوسیست بعد از انجماد- ذوب در آزمایشگاه بررسی شدند. داده‌ها با آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: میزان زنده ماندن، بلوغ تخمک به مرحله متافاز ۲، لقاح و میزان تشکیل جنین بلاستوسیست در روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای به طور معنی داری نسبت به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای بالاتر بود($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول منجمد شده با سلول‌های کومولوس و هم‌چنین روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای اثر مثبتی بر میزان بلوغ و میزان تکوین جنین به مرحله بلاستوسیست نسبت به تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس و روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای دارد.

واژه‌های کلیدی: تخمک ژرمینال وزیکول، انجماد شیشه‌ای، اتیلن گلیکول، بلاستوسیست

***نویسنده مسئول**: **دکتر رضا محمودی**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی ومولکولی
Email:rmahmoudi40@yahoo.com

مقدمه

انجماد شیشه‌ای روشی فیزیکی است که طی آن محلول غلیظ ضدیخ پس از قرار گرفتن در سرمای زیاد بدون تشکیل کریستال یخ به یک‌باره به حالت جامد تبدیل می‌شود. این حالت به عنوان شیشه‌ای شدن شناخته شده و یک پدیده جدید در علم کرایوبیولوژی می‌باشد(۱). اولین بار این روش در سال ۱۹۳۷ به وسیله لویت مطرح گردید و امروزه جهت حفظ و نگهداری جنین و تخمک گونه‌های مختلف جانوری مورد استفاده قرار می گیرد(۲). در این رابطه تلاش‌های بسیاری برای درک مکانیسم انجماد سلولی صورت گرفته است. استفاده از تخمک‌های نارس اهمیت انجماد را بیشتر مشخص می‌کند، زیرا با ذخیره کردن آن‌ها می‌توان در زمان‌های مناسب با توجه به شرایط بیمار نمونه را ذوب و پس از بلوغ آزمایشگاهی، مجدداً استفاده نمود و بسیاری از مشکلات باروری را می‌توان با این تکنیک برطرف نمود(۳). روش انجماد برای حفظ تخمک خانم‌هایی که فعالیت تخمدان آن‌ها به دلایل بیماری لگنی، درمان‌های کلینیکی هم‌چون رادیوتراپی و شیمی درمانی که تخمک‌های آنان به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا می‌کند و یا آسیب می‌بیند روش مناسبی می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد که انجماد تخمک در مراحل مختلف تکامل مثلاً مرحله ژرمینال وزیکول و تخمک متافاز ۲ با استفاده از انواع ضد یخ می‌تواند اثرات متفاوتی بر روی تخمک داشته باشند. مطالعات متعددی نقش متابولیکی سلول‌های کومولوس در روند بلوغ تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول و واکنش متقابل بین تخمک و سلول‌های کومولوس را تأیید می‌کند.

در سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینه انجماد تخمک‌های نابالغ مرحله ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس و بدون کومولوس به روش آهسته و انجماد شیشه‌ای در حضور ضد یخ‌های متداول صورت گرفته وگزارش‌های متفاوتی بیان شده است(۱۱ـ۸). بارک و همکاران درسال ۱۹۹۷ گزارش دادند انجماد تخمک انسانی مرحله‌ی ژرمینال وزیکول باعث آسیب دوک تقسیم می‌شوند(۱۴-۱۲). در حالی‌که دیگر محققین گزارش دادند که حدود ۸۰ درصد از تخمک انسانی مرحله‌ی ژرمینال وزیکول منجمد شده دارای کروموزم و دوک تقسیم نرمال می‌باشند(۱۳). در این رابطه توت و همکاران(۱۹۹۴) گزارش نمودند که تخمک انسانی مرحله‌ی ژرمینال وزیکول می‌توانند بعد از انجماد، بلوغ هسته خود را تکمیل نموده و لقاح پیدا کنند (۱۶ و۱۵). مطالعات دیگر نشان داد که همراهی سلول‌های کومولوس با تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول برای بلوغ تخمک و تکوین جنین حیاتی است(۲۰-۱۵). هم‌چنین مطالعات دیگر نشان می‌دهد که تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس در مقایسه با تخمک همراه با کومولوس از ظرفیت تکاملی کم‌تری برخوردار است (۱۱ و۵). هم‌چنین مشخص شد که وجود و عدم وجود سلول‌های کومولوس پس از انجماد و ذوب تأثیری بر میزان زنده ماندن تخمک موش ندارد(۲۱). نیز روشن

شد وجود و عدم وجود سلول‌های کومولوس تأثیری بر میزان زنده ماندن تخمک نابالغ ندارد(۲۲).

با توجه به گزارش‌های ضد و نقیض که درباره انجماد تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول همراه با کومولوس و بدون کومولوس وجود دارد، در این مطالعه تخمک‌های موش آزمایشگاهی مرحله ژرمینال وزیکول را با و بدون سلول‌های کومولوس با روش‌های انجما د شیشه‌ای منجمد نموده و اثرات انجماد شیشه‌ای بر روند بلوغ و تکوین آزمایشگاهی تخمک‌های ژرمینال وزیکول به مرحله بلاستوسیت می‌شود.

روش بررسی

دراین مطالعه تجربی از موش ماده نابالغ نژاد BDF1: F1 C57BL/6 x DBA/2، ۴-۳ هفته‌ای استفاده شد. موش‌ها از شرایط حیوان خانه‌ای طبق استانداردهای شناخته شده(۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و از آب و غذای کافی طبق دستورالعمل صادره در مورد حیوانات آزمایشگاهی برخوردار بودند. برای تحریک تخمدان‌ها از ۱۰ واحد بین المللی PMSG[1] باشد به طریق داخل صفاقی به موش تزریق شد. بعد از ۴۸ ساعت موش‌ها با کشش و جابه‌جایی مهره‌های گردن[2] کشته شده و بلافاصله تخمدان موش را برداشته و در داخل محیط کشت HTF[3] حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی قرار داده شدند. تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول همراه با کومولوس[4] (COC) و تخمک مرحله‌ی بدون سلول‌های کومولوس[5] (Do) را به وسیله سوزن انسولین در زیر استریومیکروسکوب از فولیکول آنترال تخمدان جدا شدند. سپس موش‌ها به طور مساوی به شش گروه به شرح زیر تقسیم بندی شدند؛ گروه اول؛ تخمک‌های ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس(کنترل)، گروه دوم، تخمک‌های ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس که در معرض محلول انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای قرار گرفتند، گروه سوم؛ تخمک‌های ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس که در معرض محلول انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای قرار گرفتند، گروه چهارم؛ تخمک‌های ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس(کنترل)، گروه پنجم؛ تخمک‌های ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس که در معرض محلول انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای قرار گرفتند، گروه ششم؛ تخمک‌های ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس که در معرض محلول انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای قرار گرفتند.

محلول انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای به ۱۰درصد EFS، ۲۰ درصد EFS و ۳۰درصد EFS تقسیم شدند. در گروه‌های آزمایشی ۱۰ عدد تخمک‌های COC و DO ابتدا به مدت ۵ دقیقه در معرض ۲۰۰ میکرولیتر محلول انجمادی ۱۰ درصد EFS که شامل (v/v) ۱۰درصد EG ، Ficoll-70 (w/v) ۴/۵ درصد و ۰/۰۷۵

1-PMSG Pregnant Mare Serum Gonadotropin(PMSG)
2-Dislocation
3-Hepes-Bufer Human Tubal Fluid Irvine
4-Cumulus Oocyte Complex
5- Denuded Oocytes

مولارSucrose و ۲۰درصد آلبومین سرم گاوی قرار داده شدند و سپس به مدت ۲ دقیقه در ۲۰۰ میکرو لیتر محلول انجمادی ۲۰ درصد EFS که شامل ۲۰ درصد EG (v/v)، ۹ درصد (w/v) Ficoll-70 و ۰/۱۵ مولارSurose و ۲۰ FBS درصد قرار داده شدند و سپس به مدت ۱ دقیقه در معرض ۲۰۰ میکرو لیتر محلول انجماد شیشه‌ای نهایی که شامل EG (v/v) ۳۰ درصد، (w/v) Ficoll-70 ۱۸ درصد و Sucrose ۰/۳ مولار و ۲۰ درصد آلبومین سرم گاوی قرار داده شدند. سپس تخمک‌ها به داخل نی انجماد(VM L Aigle, France) منتقل شده و نی انجمادی را به مدت ۳۰ ثانیه روی بخار نیترون قرار داده و سپس به داخل نیتروژن مایع منتقل نموده و به مدت ۵-۱ روز در داخل نیتروژن مایع نگهداری شدند. ولی در روش یک مرحله‌ای تخمک‌های COC و DO به مدت ۱ دقیقه در معرض محلول انجماد شیشه‌ای ۳۰ درصد EFS که شامل ۳۰ درصدEG (v/v)، ۱۸ درصدFicoll-70 (w/v) و ۰/۳ مولارSucrose و ۲۰ درصد آلبومین سرم گاوی قرار داده می‌شوند.

تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول را با استفاده از روش کاسایی و همکاران و ایشیدا و همکارانش انجماد شیشه‌ای شدند(۲۵-۲۳). در این روش از ضدیخ اتیلن گلیکول(EG) استفاده شد. در طی انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای ابتدا تخمک‌ها در معرض ضدیخ‌های ۱۰EFS درصد، ۲۰EFS درصد و EFSدرصد و در روش انجمادی یک مرحله‌ای تخمک‌ها فقط در معرض ضدیخ ۳۰EFS درصد قرار گرفته تا آب‌گیری شوند. پس از آن به درون نی انجماد(IVM L Aigle, France) منتقل شده و ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در معرض بخار نیتروژن و سپس در تانک ازت مایع قرار گرفتند. به منظور گرم کردن از محلول ساکارز ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ مول به مدت ۹۰ ثانیه در هر قطره قرار گرفتند.

تخمک‌های ژرمینال وزیکول منجمد شده(گروه‌های آزمایشی) و تخمک‌های ژرمینال وزیکول منجمد نشده(گروه‌های کنترل) در داخل قطره ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت α-MEM حاوی ۲۳/۰ میلی‌مول پیروات سدیم، یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فتوئین، ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین بر میلی‌لیتر، ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور 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) که قبلاً در انکوباتور به تعادل رسیده بود، قرار دادیم. تخمک‌ها را در انکوباتور با دمای $37^{\circ}C$ و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت کشت در انکوباتور تخمک‌های ژرمینال وزیکول که به متافاز ۲ رسیده بودند(خروج اولین جسم قطبی به عنوان مشخصه متافاز ۲ در نظر گرفتیم) و با اسپرم لقاح داده شدند.

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

موش‌های سوری‌نر نـژاد [F1 C57BL/6 x DBA/2: BDF1] که ۱۲ هفته سن داشـتند، بـه روش جابـه‌جـایی مهـره‌هـای گردنـی کـشته شـدند. سـپس دم اپیدیـدیم موش‌ها را جدا نموده و به حاشیه روغن، قطره‌ای ۲۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت TYH حاوی ۴ میلی‌گرم BSA بر هر میلـی‌لیتـر قـرار داده شـدند، سـپس بـا سـرنگ انسولین اسپرم را از دم اپیدیدیم جدا کرده و به داخل قطره محـیط کـشت کـه قـبلاً در انکوبـاتور بـه تعـادل رسیده بودند، منتقل شدند. قطره حـاوی اسـپرم را بـه مدت ۲-۱/۵ ساعت جهت ظرفیـت‌دار شدن در شـرایط انکوباتور ۳۷°C و ۵ درصد دی اکسیدکربن نگهداری شدند. اسپرم‌های فعال و سـالم کـه بـه طریـق Swim-up در کنـاره‌هـای قطـره جمـع شـدند بـه قطـره‌هـای ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت TYH حـاوی تخمـک‌هـا اضـافه شدند. به گونه‌ای که در هـر میلـی‌لیتـر ۱×۱۰^{۶} اسـپرم موجـود باشـد. بـه مـدت ۶-۴ سـاعت تخمـک‌هـا در مجـاورت اسـپرم در محـیط کـشت TYH حـاوی ۴ میلی‌گرم BSA بر هر میلی‌لیتر قرار داده شدند و سپس تخمک‌ها را چندین بار در محیط TYH شستشو داده تا اسپرم‌ها کاملاً شسته شوند. پس از گذشت ۸-۶ ساعت از زمان لقاح تشکیل پیش هسته و پس از گذشـت ۱۲۰ ساعت تشکیل جنین بلاستوسیـست مـوش بـه وسـیله میکروسکوب معکوس بررسی گردید.

درصد تخمک‌های زنده مانده پس از روش‌های مختلف انجماد شیشه‌ای، درصد تخمک‌های بـالغ شـده در هر گروه پس از ۲۴ ساعت کشت و هم‌چنین درصد تشکیل جنین و تکامل آن تا مرحله بلاستوسیست و در گروه‌های مختلف در هر بار تکرار به دست آمد. سپس میانگین درصـدهای فـوق گـروه‌هـای مختلـف در هـر آزمایش با استفاده از نرم‌افـزار SPSS و آزمـون‌هـای آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست تـوکی تجزیـه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

میـزان بقـای تخمـک GV بـا و بـدون سـلول کومولوس در گروه انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای بـه طـور معنـی‌داری بیـشتر از انجمـاد شیـشه‌ای یـک مرحله‌ای بود($P<۰/۰۵$)، ولی میزان بقـای تخمـک GV بـا سـلول کومولـوس در روش انجمـاد شیـشه‌ای بـه روش چند مرحله‌ای بیشتر از تخمک GV بـدون سـلول کومولـوس بـوده امـا تفـاوت بـین آنهـا معنـی‌دار نبود($p>۰/۰۵$). بـه طـور کلـی بیـشترین میـزان بقـای مربوط به تخمک‌های ژرمینال وزیکول همرا ه با سلول کومولوس به روش انجمـاد شیـشه‌ای چنـد مرحلـه‌ای بود. هم‌چنین میزان بلوغ تخمک‌های ژرمینال وزیکـول با و بدون سلول کومولوس به روش انجماد شیـشه‌ای چند مرحلـه‌ای بـه طـور معنـی‌داری بیـشتر از انجمـاد شیشه‌ای یک مرحله‌ای بود($p<۰/۰۵$)، ولی میزان بلوغ تخمک GV باسلول کومولوس در گروه کنترل به طـور معنی‌داری از تمام گروه‌ها بیشتر بود($p<۰/۰۵$).

میـزان لقـاح(2PN) در گـروه کنتـرل بـا سـلول کومولوس با تمام گروه‌های دیگر اختلاف معنـی‌داری را نشان داد($P<۰/۰۵$). گروه انجمادی چند مرحلـه‌ای با سلول کومولوس با تمام گروه‌ها اختلاف معنی‌داری

داشت($p<0/05$). به جز با گروه کنترل بدون سلول کومولوس، هم‌چنین میزان لقاح بین گروه انجمادی چند مرحله‌ای بدون سلول کومولوس و گروه انجمادی یک مرحله‌ای بدون سلول کومولوس اختلاف معنی‌وجود نداشت. میزان کلیواژ و تشکیل بلاستوسیست در گروه کنترل با سلول کومولوس اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل بدون سلول کومولوس داشت($p<0/05$)(جدول۲).

مقایسه دو به دو گروه‌ها با هم نشان داد که میزان کلیواژ و تشکیل جنین بلاستوسیست در گروه انجمادی چند مرحله‌ای با سلول کومولوس به طور معنی‌داری از گروه‌های انجمادی یک مرحله‌ای بدون سلول کومولوس، گروه انجمادی یک مرحله‌ای با سلول کومولوس و گروه انجمادی چند مرحله‌ای بدون سلول کومولوس بیشتر بود. در حالی‌که اختلاف بین گروه‌های انجمادی دیگر معنی‌دار نیست. هم‌چنین تمامی گروه‌های انجمادی با گروه کنترل همراه با سلول کومولوس اختلاف معنی‌داری دارند و هم‌چنین مشاهده می‌شود که اختلاف بین گروه کنترل بدون سلول کومولوس و گروه انجمادی چند مرحله‌ای همراه با سلول کومولوس معنی‌دار نبود.

میزان بقا و بلوغ تخمک‌های ژرمینال وزیکول با و بدون سلول کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله ای به طور معنی داری بیشتر از انجماد شیشه‌ای یک مرحله بود($p>0/05$)، میزان بلوغ تخمک GV با سلول کومولوس در گروه کنترل به طور معنی‌داری از تمام گروه بیشتر بود، هر چند میزان بقای تخمک GV با سلول کومولوس در روش انجماد شیشه‌ای به روش چند مرحله‌ای بیشتر از تخمک GV بدون سلول کومولوس بوده اما تفاوت بین آن معنی‌دار نبود($p>0/05$).

میزان کلیواژ و تشکیل جنین بلاستوسیست در گروه انجمادی چند مرحله‌ای با سلول کومولوس به طور معنی‌داری از گروه های انجمادی یک مرحله‌ای بدون سلول کومولوس، گروه انجمادی یک مرحله‌ای با سلول کومولوس و گروه انجمادی چند مرحله‌ای بدون سلول کومولوس بیشتربود($p>0/05$). در حالی‌که اختلاف بین گروه‌های انجمادی دیگر معنی‌دار نبود($p>0/05$). هم‌چنین تمامی گروه‌های انجمادی با گروه کنترل همراه با سلول کومولوس اختلاف معنی‌داری داشتند و هم‌چنین مشاهده شد که اختلاف بین گروه کنترل بدون سلول کومولوس و گروه انجمادی چند مرحله‌ای همراه با سلول کومولوس معنی‌دار نبود($p>0/05$).

بحث

روش انجماد شیشه‌ای برای حفظ تخمک خانم‌هایی که فعالیت تخمدان آن‌ها به دلایل مختلف هم چون شیمی درمانی و رادیو تراپی کاهش می‌یابد یا تخمک آن‌ها آسیب می‌بیند روش مناسبی است(۴). هدف این مطالعه ارزیابی میزان زنده ماندن، بلوغ آزمایشگاهی و تکامل جنینی تخمک مرحله ژرمینال وزیکول(GV) به بلاستوسیست پس از انجماد شیشه‌ای می‌باشد.

جدول۱: مقایسه میزان بقا و بلوغ تخمک‌های ژرمینال وزیکول(GV) پس از انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای

متغیر / گروه	تعداد تخمک ژرمینال وزیکول (GV) مورد آزمایش	درصد بقا تخمک ها تعداد(درصد)	مرحله نهایی بلوغ تخمک ها		
			تعداد تخمک ژرمینال وزیکول تعداد(درصد)	تعدادتخمک ژرمینال وزیکول بریک داون(GVBD) تعداد (درصد)	تعداد تخمکی که به متافاز ۲رسیدند تعداد(درصد)
تخمک های ژرمینال وزیکول با سلول کومولوس (کنترل)	۲۵۱	۲۵۲(۱۰۰)	۰	۲۴(۹/۴۷)	۲۲۶(۸۹/۴۱)
تخمک های ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس (کنترل)	۲۲۱	۲۲۱(۱۰۰)	۲۸(۱۲/۶۶)	۲۳(۱۰/۴۰)	۱۶۹(۷۷/۴۷)
انجماد چند مرحله ای تخمک های ژرمینال وزیکول با سلول کومولوس	۱۵۰	۱۳۴(۸۸/۹۶)	۲(۱/۳۴)	۳۴(۲۵/۳۷)	۹۸(۷۳/۲۳)
انجماد چند مرحله تخمک های ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس	۱۶۹	۱۴۴(۸۵/۲۰)	۳۰(۱۷/۷۵)	۳۰(۱۷/۷۵)	۸۶(۵۰/۸۸)
انجماد یک مرحله تخمک های ژرمینال وزیکول با سلول کومولوس	۱۶۸	۱۱۶(۷۰/۶)	۶(۶/۸۹)	۳۵(۳۰/۶۷)	۷۲(۶۲/۴۲)
انجماد یک مرحله تخمک های ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس	۱۵۶	۱۰۳(۶۶/۰۲)	۲۹(۱۸/۵۸)	۱۷(۱۰/۸۹)	۵۴(۳۴/۶۱)

جدول۲: مقایسه فراوانی نسبی(تعداد و درصد)میزان لقاح، کلیواژ و تکامل جنین به مرحله بلاستوسیست تخمک‌های ژرمینال وزیکول(GV) پس از انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای

متغیر / گروه	لقاح	دوسلولی	چهارسلولی	هشت سلولی	مورولا	بلاستوسیت
تخمک های ژرمینال وزیکول با سلول کومولوس (کنترل)	۲۰۴(۸۰/۷۶)	۱۹۲(۷۵/۵۸)	۱۷۷(۶۹/۳۸)	۱۵۷(۶۱/۵۸)	۱۳۹(۵۴/۶۵)	۱۱۷(۴۵/۶۲)
تخمک های ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس (کنترل)	۱۲۷(۵۷/۴۶)	۱۱۳(۵۱/۱۳)	۸۰(۴۰/۲۷)	۷۲(۳۲/۵۷)	۶۱(۲۷/۶۰)	۴۲(۱۹/۰۴)
انجماد چند مرحله ای تخمک های ژرمینال وزیکول با سلول کومولوس	۷۷(۵۷/۸۰)	۷۰(۵۳/۱۹)	۵۰(۳۶/۵۰)	۳۹(۲۷/۳۵)	۳۲(۲۲/۲۰)	۲۲(۱۶/۴۱)
انجماد چند مرحله تخمک های ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس	۵۷(۳۳/۷۲)	۴۹(۲۸/۹۹)	۳۳(۱۹/۵۲)	۱۹(۱۱/۲۴)	۱۳(۷/۶۹)	۸(۴/۷۳)
انجماد یک مرحله تخمک های ژرمینال وزیکول با سلول کومولوس	۵۳(۴۵/۶۸)	۴۴(۳۸/۹۵)	۳۲(۲۸/۴۵)	۲۲(۱۸/۷۶)	۱۶(۱۳/۶۷)	۶(۴/۸۴)
انجماد یک مرحله تخمک های ژرمینال وزیکول بدون سلول کومولوس	۳۶(۲۳/۰۷)	۲۸(۱۷/۹۴)	۱۳(۸/۳۳)	۷(۴/۴۸)	۵(۳/۲۰)	۳(۱/۹۲)

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول با و بدون سلول‌های کومولوس، گروه کنترل و منجمد شده به روش انجماد شیشه‌ای یک و چند مرحله‌ای توانایی رشد و تکامل در آزمایشگاه را دارند. تخمک‌ها ضمن بلوغ، قابلیت لقاح و تشکیل جنین‌های تا مرحله بلاستوسیست را دارند. یافته‌ها نشان داد، انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول نسبت به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای روش مناسب‌تری می‌باشد. این یافته‌ها موافق مطالعه‌های انجام شده بود(۲۷و۷،۱۲،۲۶). آنان بیان نمودند استفاده از روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای باعث کاهش فشار اسمزی بر جنین و تخمک شده و در نتیجه آسیب وارده به تخمک و جنین کاهش می‌یابد.

اطلاعات به دست آمده نشان می‌دهد میزان درصد زنده ماندن تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای به ترتیب۵/۰۸ ±۶۶/۶۳ درصد و ۸۴/۷۶±۲/۵۵ تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول دارای مورفولوژی طبیعی بودند. میزان درصد زنده ماندن تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای به ترتیب۶±۷۰/۶۰ درصد و ۸۸/۹۶±۱/۸۵ تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول دارای مورفولوژی طبیعی بودند. هر چند میزان زنده ماندن تخمک‌های ژرمینال وزیکول با سلول‌های کومولوس در روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای بیشتر از تخمک ژرمینال وزیکول بدون کومولوس به روش یک مرحله‌ای بوده ولی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. این نتایج منطبق با نتایج آبه و همکاران بود(۱۲)، ولی میزان زنده ماندن در تحقیق آن‌ها بیشتر از مطالعه حاضر بود و علت آن را استفاده از نایلون ـ مش(Nylon-mash) برای انجماد شیشه‌ای تخمک نابالغ گاو نسبت داد. میزان زنده ماندن تخمک در تحقیق حاضر بالاتر از تحقیق آسادا و همکاران که تخمک نابالغ وال را به روش انجماد آهسته منجمد نمودند و میزان زنده ماندن را ۴۰ درصد گزارش کردند، بود(۲۲). علت بیشتر بودن میزان زنده ماندن در این تحقیق در مقایسه با مطالعه آسادا و همکاران را می‌توان روش انجمادی و نوع گونه حیوانی نسبت داد. در تحقیق آبه و همکاران، هارت و همکاران میزان تکوین تخمک به متافاز۲ به ترتیب ۶۴/۱ درصد و ۶۰ درصد گزارش شد که مشابه‌ی نتایج مطالعه حاضر بود(۲۸و۱۲). ولی در مطالعه آنو و همکاران میزان تکامل تخمک به متافاز۲، ۹۱/۸ درصد گزارش گردید که نسبت به نتایج ما بسیار بالاتر بود(۱۰). علت آن را می‌توان به روش ۱۰ مرحله‌ای انجماد فوق سریع تخمک موش و غلظت پایین ضد یخ اتیلن گلیکول و دی متیل سولفاکسید استفاده شده(۰/۲۵ تا ۲/۵ درصد) نسبت داد.

آبه و همکاران میزان تشکل جنین دو سلولی در روش یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای انجماد شیشه‌ای تخمک ژرمینال وزیکول را به ترتیب ۲۰/۸ درصد و ۳۷/۷درصد گزارش کردند که نسبت به نتایج

حاضر پایین‌تر بود. علت آن را شاید به توان به گونه‌ی حیوان استفاده شده نسبت داد. آنو و همکاران به روش انجماد شیشه‌ای ۱۰ مرحله‌ای تخمک ژرمینال وزیکول موش را منجمد نموده و میزان تشکیل جنین دوسلولی را ۷۳/۳درصد گزارش کردند که نسبت به نتایج مطالعه حاضر بیشتر بود(۱۰). 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. آبه و همکاران تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس گاو را با استفاده از اتیلن گلیکول(EFS40) به روش یک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای منجمد نموده و گزارش کردند که میزان بلوغ(IVM) و میزان تقسیم در روش انجماد چند مرحله‌ای بیشتر از روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای می‌باشد، ولی میزان زنده ماندن تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول در روش انجمادی یک مرحله‌ای وچند مرحله‌ای تفاوتی با یکدیگر نداشت، هر چند میزان زنده ماندن در روش چند مرحله‌ای بیشتر از روش یک مرحله‌ای بود. ارتباط بین سلول‌های کومولوس با تخمک برای تکمیل بلوغ و تکوین طبیعی تخمک درIn vitro به عنوان یک فاکتور مهم محسوب می‌شود(۲۹). وجود سلول‌های کومولوس تأثیر مهمی بر بلوغ آزمایشگاهی(IVM) تخمک نابالغ دارد. تخمک‌های ژرمینال وزیکول همراه با سلول کومولوس نسبت به تخمک بدون کومولوس بیشتر تکوین پیدا می‌کنند(۳۱و۱۹،۱۸،۳۰). اهوبوشی و همکاران بلاستوسیست گاو با روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای و دومرحله‌ای منجمد نمودند، آنان گزارش کردند آسیب وارده به بلاستوسیست‌ها در روش انجمادی یک مرحله‌ای بیشتر بوده است(۲۶). کووایا و همکاران با روش انجماد شیشه‌ای ۱۶ مرحله‌ای بلاستوسیست گاو را منجمد نمودند و آنان میزان بالای زنده ماندن بلاستوسیست را با این روش گزارش کردند. مطالعات فوق تأییدی بر مطالعه حاضر است که نشان می‌دهد روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای بهتر از روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای می‌باشد(۳۲).

آنو و همکاران تخمک ژرمینال وزیکول موش را به روش یک مرحله‌ای و ده مرحله‌ای انجماد شیشه‌ای نمودند. میزان زنده ماندن، تکوین به متافاز۲ و تشکیل بلاستوسیست در روش یک مرحله‌ای را به ترتیب ۹۷/۵، ۹۵/۸ و ۲۳/۷ درصد و در روش ده مرحله‌ای به ترتیب ۹۸/۶، ۹۲/۶ و ۴۲/۹ درصد گزارش کردند. تشکیل بلاستوسیست در روش ده مرحله‌ای به طور معنی‌داری از روش یک مرحله‌ای بالاتر بود که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد(۱۰).

پارک و همکاران تخمک موش را با استفاده از ضد یخ اتیلن گلیکول به روش انجماد شیشه‌ای منجمد و ذوب نمودند. آنان گزارش کردند که تخمک‌ها با سلول‌های کومولوس نسبت به تخمک‌های بدون کومولوس بیشتر به مرحله‌ی ۸ سلولی رسیدند. این تحقیق موافق با نتیجه به دست آمده در مطالعه اخیر می‌باشد(۱۵و۱۴). چیان و همکاران تخمک گاو را با و بدون سلول‌های کومولوس به روش انجماد شیشه‌ای

با استفاده از ۱۵درصد اتیلن گلیکول+ ۱۵ درصد DMSO و ۱۵درصد اتیلن گلیکول+PROH و Cryotop منجمد نمودند و گزارش نمودند میزان زنده ماندن و لقاح تخمک با و بدون کومولوس تفاوتی با یکدیگر ندارند ولی میزان تشکیل جنین تا مرحله‌ی ۸ سلولی در تخمک بدون کومولوس به طور معنی‌داری بیشتر بوده است(۱۱). نتایج این تحقیق مخالف اطلاعات به دست آمده در مطالعه حاضر می‌باشد. آبه و همکاران تخمک ژرمینال وزیکول همراه با سلول‌های کومولوس گاو را به روش یک و چند مرحله‌ای با نایلون_مش(Nylon-Mesh) انجماد شیشه‌ای نمودند. در روش یک مرحله‌ای از EFS ۴۰ درصد استفاده نمودند و میزان زنده ماندن، تکوین به متافاز۲، دوسلولی و تشکیل بلاستوسیست را به ترتیب ۹۶/۹، ۲۲/۶، ۲۰/۸ و صفر گزارش نمودند. در این روش هیچ بلاستوسیست تشکیل نگردید. در روش چند مرحله‌ای از EFS۱۰ درصد، EFS ۲۰ درصد و EFS ۴۰ درصد استفاده نمودند و میزان زنده ماندن، تکوین به متافاز۲، دوسلولی و تشکیل بلاستوسیست را به ترتیب ۹۶/۷، ۶۴/۱، ۳۷/۷ و ۸ درصد گزارش نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد تکامل تخمک ژرمینال وزیکول پس از انجماد و ذوب به مرحله‌ی متافاز۲، دوسلولی و بلاستوسیست در روش انجمادی چند مرحله‌ای به طور معنی‌داری بالاتر می‌باشد(۱۲). زیرا تماس فیزیکی بین تخمک و سلول‌های کومولوس برای انتقال مواد مغذی و فاکتورهای لازم برای تکامل تخمک ضروری می‌باشند. هم‌چنین سلول‌های کومولوس به علت انتقال تعداد زیادی فاکتورهای شناخته شده و شناخته نشده برای بلوغ هسته و سیتوپلاسم تخمک ضروری می‌باشند(۳۴و۳۳). 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 می‌باشد(۳۶و۳۵).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول منجمد شده با سلول‌های کومولوس و روش انجماد شیشه‌ای چند مرحله‌ای نسبت به تخمک مرحله‌ی ژرمینال وزیکول بدون سلول‌های کومولوس و روش انجماد شیشه‌ای یک مرحله‌ای اثر مثبتی بر میزان بقا، بلوغ و تکوین جنین به مرحله‌ی بلاستوسیست دارد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم تشریحی بود که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فنآوری دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شد.

REFERENCES:

1. Fahy GM, Macfarlane DR, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiol 1984; 21:407-26.
2. Luyte BJ. The vitrification of organi colloids and of protoplasme. Biodynamica 1937; 1(29): 1-14.
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 M, Kazim R, Chohan KR. Thickness of cumulus cell layer is a significant factor in meiotic competence of buffalo oocytes. J vet Sci 2004; 5(3); 247-51.
7.Mahmoudi R, Rajaei F, Ragardi Kashani I, Abbasi M, Amidi F, Sobhani A, et al. The rate of blastocysts production following vitrification with step-wise equilibration of immature mouse oocytes. Iran J Reprod Med 2012; 10(5): 453-8.
8. 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.
9.Wu J, Zhang L, and Wang X. In vitro maturation, fertilisation and embryo development after ultra-rapid freezing of immature human oocytes. Reproduction 2001; 121: 389–93.
10.Aono N, Naganuma T, Abe Y, Hara K, Sasada H, Sato E, et al. 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.
11.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.
12.Abe Y, Hara K, Matsumoto H, Kobayashi J, Sasada H, Ekwall H, et al. 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.
13.Mahmoud RI, Amir II, Pasbakhsh P, Ragardi Kashani I, Abbasi M, Aboulhasani F, et al. The effects of vitrification on spindle apparatus of in vitro matured germinal vesicle in mice. Iranian Journal of Reproductive Medicine 2008; 6(4): 209-15.
14. 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- 6.
15.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.
16.Toth TL, Lanzendorf SE, Sandow BA, Veeck LL, Hassen WA, Hansen K, et al. Cryopreservation of human prophase I oocytes collected from unstimulated follicles. Fertil Steril 1994; 61: 1077–82.
17.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.
18.Mahmodi R, Abbasi M, Amiri I, Ragardi Kashani I, 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.
19.Mahmoudi R, Subhani A, Pasbakhsh P, Abolhasani F, Amiri I, Salehnia M, et al. The Effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes. Iranian Journal of Reproductive Medicine 2005; 3(2): 74-8.
20. Cetin Y, Bastan A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. Anim Reprod Sci 2006; 92(1-2): 29-36.
21.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.
22.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.
23.Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J Reprod Fertil 1990; 89(1): 91-7.

24.Kasai M, Iritani A, Chang MC. Fertilization in vitro of rat ovarian oocytes after freezing and thawing. Biol Reprod 1979; 21(4): 839-44.
25.Ishida GM, Saito H, Ohta N, Takahashi T, Ito MM, Saito T, et al. The optimal equilibration time for mouse embryos frozen by vitrification with trehalose. Hum Reprod 1997; 12(6): 1259-62.
26.Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, Tomagane H. Ultrastructure of bovine in vitro produced blastocysts cryopreserved by vitrification. Zygote 1998; 6: 17–26.
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: 233–8.
28.Hurt AE, Landim F, Seidel GE, Squires EL. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. Theriogenology 2000; 54: 119–28.
29.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: 971–8.
30.Vozzi C, Formenton A, Chanson A, Senn A, Sahli R, Shaw P, et al. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. Reproduction 2001; 122: 619–28.
31.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.
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: 415–22.
33.Nagai T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. Theriogenology 2001; 55: 1291–301.
34.Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. Reproduction 2001; 121: 647-53.
35.Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. J Reprod Fertil 1990; 40 : 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: 1478–83.

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

Original Article

In Vitro Maturation and Embryo Development to blastocyst Mouse Germinal Vesicle Oocytes after Vitrification

Nikseresht M[1] , Rasti T[2], Jafari Barmak M[1], Ghasemi Hamidabadi H[3], Rezaei Z[1], Dehghani F[1], Mahmoudi R[1]*

[1]CIlular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [2]Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran,[3]Departement of Anatomy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Received: 05 Feb 2013 Accepted: 01 Sep 2013

Abstract

Background & aim: Vitrification is a simple and ultra rapid technique for the conservation of fertility. Improving pregnancy rate associate with the use of cryopreserved oocytes would be an important advanced in human assisted reproductive technology (ART). The purpose of this study was to evaluate survival, oocytes maturation and embryo development to the blastocyst stage after vitrification of oocytes germinal vesicle-stage and multi stage

Methods: In the present experimental study, germinal vesicle oocytes with or without cumulus cells were transferred to vitrification solution containing 30% (v/v) ethylene glycol, 18% (w/v) Ficoll-70, and 0.3 M sucrose, either by single step or in a step-wise way. After vitrification and storage in liquid nitrogen, the oocytes were thawed and washed twice in culture medium TCM119, and then subjected to in vitro maturation, fertilization, and culture. Data analysis was performed by using One-way variance and Tukey tests.

Results: Oocytes survival, metaphase 2 stage oocyte maturation, fertilization and embryo formed blastocyst in vitrification methods multistage were significantly higher than the single step procedure (P<0/05)

Conclusion: The Germinal vesicle stage oocytes vitrified with cumulus cells and stepwise procedure had positive effect on the survival, maturation and developmental rate on blastocyst compared to oocytes without cumulus cell and single step procedure.

Key words: Germinal Vesicle Oocyte, Blastocyst, Vitrification, Ethylene glycol

***Corresponding Auther**: **Mahmoudi R,** Cellular and Molecular Reseach Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
Email: rmahmoudi40@yahoo.com