فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی۵۸، جلد۱۵، شماره۲، بهار ۱۴۰۱، صفحه ۱۲۳ تا ۱۳۶
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

بررسی مقایسه‌ای تاثیر دوستاکسل بر داربست سلولی تخمک موش سوری پس از انجماد شیشه‌ای با دو ماده انجمادی متفاوت

حامد دانش پژوه[۱]، نسیم حیاتی رودباری[۲]، **مهدی دیانت پور**[۳]، زهرا خدابنده جهرمی[۴]، یاسر تهمتنی[۵]

۱-دانشجوی دکتری زیست شناسی علوم جانوری تکوینی گروه زیست شناسی، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران .

۲-دانشیار گروه زیست شناسی ، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، ،تهران، ایران.

۳-دانشیار، مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران و دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. **mdianatpur@gmail.com**

۴-استادیار، مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۵-استادیار، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، موسسه زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی رویان، ACECR، تهران.ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۱۱/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: پژوهش حاضر به منظور بررسی مقایسه‌ای تاثیر ماده دوستاکسل بر روی لقاح آزمایشگاهی، درصد زنده‌مانی و داربست سلولی تخمک‌ها پس از انجماد شیشه‌ای با دو ماده انجمادی متفاوت می‌باشد.

روش کار: برای رسیدن به این منظور موش‌های ماده نژاد NMRI با سن ۸ تا ۱۰ هفته با تزریق هورمون‌های PMSG و HCG برای تخمک‌گذاری تحریک شدند. توده سلولی کومولوس اطراف تخمک با استفاده از آنزیم هیالورونیداز ۰/۱٪ برداشته و سپس تخمک‌ها به ۸ گروه آزمایشی شامل گروه‌های کنترل، دوستاکسل، دوستاکسل+ محلول انجمادی۱، دوستاکسل+ محلول انجمادی۲، دوستاکسل+ انجماد شیشه‌ای ۱، دوستاکسل+ انجماد شیشه‌ای۲، انجماد شیشه‌ای ۱ و انجماد شیشه‌ای ۲ تقسیم گردیدند. تخمک‌های بالغ در محلول‌های انجمادی اتیلن گلیکول و دی‌متیل‌سولفوکساید با غلظت ۱۵ درصد و ساکارز ۰/۵ مولار در گروه انجمادی ۱ و محلول‌های انجمادی اتیلن‌گلیکول ۷/۵ ٪، گلیسرول ۷/۵ ٪ و سوکروز ۰/۵ مولار در گروه انجمادی دوم منجمد شدند. پس از ذوب شدن، درصد زنده مانی و لقاح آن ها تا مرحله دو سلولی بررسی گردید. رنگ‌آمیزی میکروتوبول‌ها در تخمک‌ها با آنتی‌بادی آلفاتوبولین انجام گردید.

یافته ها: نتایج نشان می‌دهد تفاوت‌های معنی‌داری بین درصد زنده مانی و درصد لقاح گروه‌های انجمادی در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد($P<0.05$). درصد زنده مانی و درصد لقاح در گروه انجمادی اول نسبت به گروه انجمادی دوم کاهش یافت اما این دو گروه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بایک دیگر نداشتند. هم چنین درصد زنده مانی و درصد لقاح گروه‌های پیش انکوبه شده با دوستاکسل بیشتر از گروه‌های انکوبه نشده بود

نتیجه گیری: با توجه نتایج حاصل دوستاکسل با کاهش آسیب‌های وارده به اسکلت سلولی تخمک می‌تواند در بهبود تکنیک‌های تولید مثلی موثر باشد.

واژه های کلیدی: انجماد شیشه‌ای، تخمک، محلول انجمادی، دوستاکسل، کرایوتاپ.

مقدمه

انجماد تخمک ممکن است یک جای گزین مهم برای نگهداری باروری در خانم‌هایی باشد که نیاز به تعویق انداختن استفاده از گامت‌های خود به دلایل مختلف از جمله داشتن IVF های ناموفق، وقوع سندرم تحریک بیش از حد تخمدان(OHSS) یا ناتوانی در به دست آوردن اسپرم در روز انجام لقاح هستند و نهایتاً

یک انتخاب برای خانم‌های بارور جهت نگه‌داری گامت‌های آن‌ها حتی بعد از اثرات فیزیولوژیک افزایش سن باشد(۱۵). انجماد تخمک باعث تکمیل روش‌های کمکی باروری و گسترش کاربرد آن در بین زنان بارور شده است(۲۱). از میان روش های مختلف انجماد، انجماد شیشه‌ای در حال حاضر موثرترین روش جهت نگهداری تخمک و جنین می‌باشد. انجماد شیشه‌ای فرآیند فیزیکی است که در آن از محلول‌های انجمادی با غلظت بالا استفاده شده و از تشکیل کریستال‌های یخ جلوگیری می‌شود(۱۰). انجماد شیشه ای تخمک یک روش سودمند برای حفاظت از تنوع ژنتیکی در گونه‌های حیوانات در معرض انقراض و حیوانات مزرعه ای می باشد(۲۷). روش کرایوتاپ آخرین روش کشف شده است که در آن از حداقل حجم محلول استفاده شده و نمونه به طور مستقیم در تماس با نیتروژن مایع قرار می‌گیرد(۲۳). تخمک و جنین در طی انجماد دچار صدمات مورفولوژیکی و عملکردی می‌شوند، تنوعی از فاکتورها از قبیل سمیت، غلظت بالای محلول‌های انجمادی، شوک دمایی و استرس‌های اسمزی در طول انجماد شیشه‌ای ممکن است بر تخمک تاثیر بگذارند که این فاکتورها منجر به هم ریختن ارگانل‌ها، تیرگی لایه شفاف و آسیب‌های ژنتیکی می‌شود(۳۱). ضدیخ های مورد استفاده در انجماد شیشه‌ای تخمک ها یا جنین ها نقش قطعی در ممانعت از دهیدراسیون سلولی و تشکیل کریستال یخ بازی می‌کنند اما آن ها هم چنین مسئول آسیب های اسموتیک و سمیت می‌باشند(۱۹). یکی از ضد یخ ها، اتیلن گلیکول است که بسیار موثر و سمیت کمتری برای انجماد تخمک ها دارد. درسال ۲۰۰۸ کارتبرگ و همکاران تشخیص دادند که انجماد با DMSO تمامیت غشای جنین را بهتر از محلول های بدون DMSO حفظ می‌کند. ترکیب DMSO با اتیلن گلیکول دارای حد متوسط حداقل دو فایده دارد: اولاً، انجماد به دلیل خاصیت تشکیل شیشه بهتر و بیشتر از DMSO به تنهایی، تسهیل می شود؛ دوماً،تراوش پذیری هر ضد یخ در حضور دیگری افزایش پیدا می کند بنابر این در این پژوهش می بایست از روش هایی استفاده گردد که به جریانی که محلول‌های انجماد را با هم ترکیب کند بسط داده شود(۲۶). الماسی ترک و روزبهی در تحقیقی در سال۲۰۱۳ با به کار بردن غلظت کمتر ضد یخ(۱/۲۵ و ۱ مولار) نسبت به غلظت معمول ۱/۵مولار نتایج مشابهی به دست آوردند، ضمن این که سمیت ضد یخ هایی که در انجماد تخمک یا جنین استفاده می شود نیز کاهش پیدا خواهد کرد(۲). مطالعات متعدد نشان داده که محلول انجمادی حاوی ضد یخ اتیلن گلیکول بهتر از ضد یخ های دیگر نظیر پروپاندیول، گلیسرول و دی متیل سولفاکسید عمل می کند(۹). بیان شده است که اتیلن گلیکول به خاطر سمیت کم، نقش مهمی در پایداری غشای سلولی در طی انجماد دارد ضدیخ بسته به مرحله تکاملی تخمک نیز اثرات متفاوتی بر آن دارد. از طرف دیگر انجماد تخمک در مراحل تکاملی مختلف نتایج متفاوتی به دنبال داشته است. که از دلایل آن می توان به اندازه سلول، میزان متابولیت متفاوت، مرحله سیکل سلول، وجود یا نبود گرانول های قشری و میزان لیپید داخل سلولی حساس به سرما اشاره کرد. رهایی زودرس گرانول های قشری در تخمک مرحله MII موجب سختی زوناپلوسیدا و کاهش میزان باروری آن می گردد(۳۴). اسکلت سلولی از ساختار سیتوپلاسمی فیبریلی پیچیده تشکیل شده است و هدف آن حفظ و اصلاح شکل سلول، دخالت در ارگانل های سیتوپلاسمی و اگزوسیتوز می باشد. پروتئین های داخل غشایی، میکروتوبول ها، میکروفیلامنت های اکتین و فیلامنت های بینابینی ترکیبات اصلی اسکلت سلولی می باشند. کل ترکیبات ذکر شده به انواع مختلف تحریکات

حساس هستند و قابلیت تبدیل سریع به زیر واحدهای خود را دارند. Vincent و همکارانش نشان دادند که ضدیخ DMSO منجر به صدمات قابل توجه در میکروفیلامنت های تخمک مورین(Murine) می شود که ارتباط مستقیمی با غلظت آن دارد(۳۲). به هر حال آسیب به فیبرهای سیتواسکلتن(CSF) تخمک ها در طول انجماد شیشه‌ای، علت اصلی آرایش دوک غیر عادی و کاهش زنده مانی تخمک های منجمد- ذوب شده است(۲۶). اخیراً گزارش شده که پایداری CSF قبل از انجماد شیشه ای ممکن است جهت کاهش تخریب CSF در اووسیت ها مفید باشد(۲۲). در واقع چندین عامل پایدار کننده سیتواسکلتن از قبیل سیتوکالازین(CB,CD) (B,D و پاکلیتاکسل برای محافظت اووسیت ها از آسیب CSF در طول انجماد شیشه ای مورد استفاده قرار می گیرد. به هر حال به خوبی شناخته شده که انکوبه کردن اووسیت های بالغ با پاکلیتاکسل می‌تواند آسیب CSF را بعد از انجماد- ذوب کاهش داده و تکامل جنینی را در انسان ها(۱۲)، موش(۲۸) و خوک(۳۵) بهبود بخشد. میکروتوبول ها از مهم ترین ترکیبات اسکلت سلولی هستند که در فرآیندهای مهم سلول از جمله در حرکات، تقسیم سلولی، نقل و انتقالات درون سلولی نقش دارند. با توجه به این که میکروتوبول‌ها و دیگر فیبرهای اسکلت سلولی تخمک ممکن است در طول انجماد شیشه‌ای دچار آسیب شده و در نتیجه باعث شکست در فرایند لقاح پس از ذوب شدن گردند، پایداری رشته‌های دوکی برای انجماد شیشه‌ای موفق تخمک از اهمیت بسیاری برخوردار می‌باشد .(۷) یکی از روش‌های مورد استفاده برای حفظ تخمک در مقابل آسیب سلولی در طول انجماد شیشه‌ای استفاده از مواد پایدار کننده مانند سیتوکالازین B و D، پاکلیتاکسل (۳۵) و دوستاکسل می‌باشد. دوستاکسل یک عضو تازه شناخته شده از رده داروهای ضد سرطانی است که رده پاکلیتاکسل را نیز در بر می‌گیرد(۴،۱۷). دوستاکسل تجمع میکروتوبول‌های توبولین را تسهیل می کند و با بالا بردن نرخ پلیمریزاسیون توبولین به میکروتوبول‌های پایدار، از جدا شدن دایمرهای از قبل تشکیل شده میکروتوبول‌ها جلوگیری و باعث تثبیت آن ها می گردد. این تثبیت مانع از آرایش فعال و طبیعی شبکه میکروتوبول‌ها شده که خود منجر به توقف تقسیم سلولی می گردد(۳۵،۳۶).به هر حال تغییر فعالیت های دو داروی دوستاکسل و پاکلیتاکسل متفاوت است. دوستاکسل، نرخ و وسعت پلیمریزاسیون توبولین به میکروتوبول های پایدار(MT) را بالا برده و زمانی که در معرض دمای خیلی پایین قرار می گیرند، از دپلیمریزاسیون MT ممانعت می‌کند. نرخ گسترش پلیمریزاسیون افزایش یافته توبولین توسط دوستاکسل دو برابر پاکلیتاکسل می باشد(۳۶). تمایل اتصالی دوستاکسل برای جایگاه اتصال MT 9/1 fold بیشتر از پاکلیتاکسل می باشد(۱۳). به علاوه دوستاکسل، کاهش ۲ بار بیشتر از غلظت قطعی GTP- tubulin مورد نیاز برای پلیمریزاسیون توبولین را در مقایسه با پاکلیتاکسل القا می کند(۹،۱۴). دوستاکسل ممکن است از پاکلیتاکسل در پایداری CSF اووسیت ها در طول انجماد شیشه ای و بهبود قابلیت زنده مانی آن ها بعد از انجماد-ذوب موثرتر باشد. به هر حال سمیت دوستاکسل روی اووسیت های موش هرگز گزارش نشده است و اثرات انکوبه کردن اووسیت های موش بالغ(IVM) با دوستاکسل قبل از انجماد شیشه ای روی پایداری CSF و بقا اووسیت بعد از انجماد-ذوب و نرخ های تکوین جنینی متعاقب آن گزارش نشده است(۱۴). با توجه مطالعه انجام شده و با توجه به این که تاکنون گزارش اندکی در مورد اثرات دوستاکسل بر روی انجماد شیشه‌ای تخمک موش مشاهده شده است، هدف از پژوهش حاضر مقایسه تاثیر دوستاکسل بر روی

تخمک‌ها، درصد زنده مانی و درصد لقاح تخمک‌ها تا مرحله دوسلولی و هم چنین تاثیر دوستاکسل بر ساختار اسکلت سلولی تخمک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی واقع در برج پژوهشی محمد رسول الله دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد. بدین ترتیب که تعداد ۵۰ سر موش NMRI با سن ۸ تا ۱۰ هفته‌ای از انستیتوپاستور تهیه و به اتاق حیوانات منتقل شد. پس از گذشت دو هفته و سازگاری موش با شرایط آزمایشگاه، برای تحریک تخمک گذاری به موش‌های ماده ۱۰ واحد هورمون pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) و سپس ۱۰ واحد HCG(human chorionic gonadotropin) به صورت داخل صفاقی تزریق کرده و برای برداشت تخمک بالغ در مرحله متافاز دوم ۱۲تا ۱۵ ساعت بعد از تزریق HCG، حیوان را قطع نخاع کرده و کمپلکس تخمک‌ها و کومولوس‌ها از لوله فالوپ خارج شدند. سپس توده تخمک‌ها به همراه کومولوس را در معرض آنزیم هیالورونیداز ۰/۰۱ درصد قرار داده، تا کومولوس‌ها از اطراف تخمک‌ها جدا شوند. تخمک‌های به دست آمده ۳ بار در محیط پایه G-MOPS شستشو داده شده و تنها تخمک‌های دارای ظاهر طبیعی که در مرحله متافاز دوم قرار داشتند، برای ادامه بررسی انتخاب شدند(۲۰). جهت بررسی‌های مقایسه‌ای دو محلول انجمادی اتیلن گلیکول و دی متیل سولفوکساید با غلظت ۱۵ درصد و ساکارز ۰/۵ مولار(گروه اول) و اتیلن گلیکول ۷/۵٪، گلیسرول ۷/۵٪ و سوکروز ۰/۵ مولار(گروه دوم) تهیه گردید. سپس تخمک‌ها به ۸ گروه آزمایشی به ترتیب زیر تقسیم شدند:

۱)گروه کنترل: تخمک‌ها در معرض هیچ ماده‌ای قرار نگرفتند.

۲)گروه دوستاکسل: تخمک‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار پیش انکوبه شدند(۷).

۳)دوستاکسل + محلول انجمادی ۱: تخمک‌ها با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار برای ۲۰ دقیقه پیش انکوبه شده و سپس در معرض محلول‌های انجمادی گروه اول(اتیلن گلیکول و دی‌متیل‌سولفوکساید با غلظت ۱۵ درصد و ساکارز ۰/۵ مولار) قرار داده شدند، اما منجمد نشدند.

۴)دوستاکسل + انجماد شیشه‌ای ۱: تخمک‌ها با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار برای ۲۰ دقیقه پیش انکوبه شده، سپس در معرض محلول‌های انجمادی گروه اول قرار داده شده و منجمد شدند.

۵)انجماد شیشه‌ای۱: تخمک ها بدون این که در معرض دوستاکسل قرار بگیرند در محیط‌های انجمادی گروه اول انجماد شیشه‌ای شدند.

۶)دوستاکسل + محلول انجمادی ۲: تخمک‌ها با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار برای ۲۰ دقیقه پیش انکوبه شده و سپس در معرض محلول‌های انجمادی گروه دوم(اتیلن گلیکول ۷/۵ ٪، گلیسرول ۷/۵٪ و سوکروز ۰/۵ مولار) قرار داده شدند، اما منجمد نشدند.

۷)دوستاکسل + انجماد شیشه‌ای ۲: تخمک‌ها با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار برای ۲۰ دقیقه پیش انکوبه شده، سپس در معرض محلول‌های انجمادی گروه دوم قرار داده شده و منجمد شدند.

۸)انجماد شیشه‌ای۲: تخمک‌ها بدون اینکه در معرض دوستاکسل قرار بگیرند در محیط‌های انجمادی گروه دوم انجماد شیشه‌ای شدند(۷).

انجماد شیشه‌ای و ذوب

جهت انجماد شیشه‌ای از کرایوتاپ به عنوان یک ابزار ویژه که از نوار فیلمی نازک و باریک ساخته شده و به یک نگه دارنده پلاستیکی سخت متصل است، استفاده شد. در انجماد شیشه‌ای، از محلول انجمادی

حاوی محلول‌های ضد یخ با غلظت ۱۵٪ اتیلن گلیکول + ۱۵٪ دی‌متیل‌سولفوکسید + ۰/۵مولار ساکارز در محیط پایه در گروه اول و و اتیلن گلیکول ۷/۵٪، گلیسرول ۷/۵ ٪ و سوکروز ۰/۵ مولار درگروه دوم استفاده شد. محلول‌های تعادلی حاوی نیمی از غلظت ضد یخ‌ها بدون ساکارز بود. به طور خلاصه، ۱۵ تخمک در محیط پایه(G-Mops) حاوی ۰/۰۵ میکرومولار دوستاکسل به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. تخمک‌ها در اولین قطره تعادلی به مدت ۳ دقیقه قرار داده شدند. سپس، آن ها به مدت ۱ دقیقه در محلول انجمادی نگهداری شدند. سرانجام، تخمک‌ها به سرعت در سطح کرایوپ قرار گرفتند. تخمک‌ها در گروه‌های ۱۵ تایی بر روی کرایوتوپ قرار گرفتند. محلول‌های اضافی اطراف تخمک‌ها به طور کامل برداشته شد. سپس، کرایوتاپ به سرعت درون نیتروژن مایع غوطه‌ور شد.پروسه ذوب کردن تخمک‌ها پس از انجماد با قرار دادن مستقیم کرایوتاپ در محلول حاوی ساکارز ۱ مولار به مدت یک دقیقه و سپس غلظت‌های رقیق شده ساکارز(۰/۷۵ ، ۰/۵ و ۰/۲۵مولار) هر کدام به مدت سه دقیقه انجام شد. جهت جدا کردن تخمک‌های سالم از انواع آسیب دیده پس از ذوب، تخمک‌ها در زیر استریومیکروسکوپ بررسی شدند. تخمک‌هایی که دارای اووپلاسم یک دست، فضای مناسب زیر زرده‌ای و لایه شفاف بودند، برای انجام لقاح آزمایشگاهی انتخاب و تخمک‌های با اووپلاسم تیره کنار گذاشته شدند(۳).

لقاح آزمایشگاهی

برای انجام لقاح آزمایشگاهی ابتدا اسپرم‌ها از دم اپیدیدیم موش‌های نر(۱۲ تا ۸ هفته) جدا شدند. اسپرم‌ها به مدت یک ساعت و نیم در محیط کشتHam ‘s F10 حاوی ۵ میلی گرم سرم آلبومین گاوی(سیگما) در ۳۷ درجه سانتی گراد برای انجام واکنش ظرفیت‌پذیری قرار داده شدند. سپس غلظت نهایی یک میلیون اسپرم در یک میلی لیتر به محیط G-IVF حاوی ۱۵ تخمک اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۶ ساعت انکوبه شد. تخمک‌ها در محیط کشت تا مرحله پرونوکلئوس پیش برده و پس از انجام لقاح آزمایشگاهی، درصد تشکیل جنین‌های دو سلولی بررسی شد(۲۰).

رنگ آمیزی اسکلت سلولی تخمک با آلفاتوبولین

امروزه متداول‌ترین روش ارزیابی مورفولوژیکی اووسیت میکروسکوپ نوری می‌باشد، ولی این روش جهت تشخیص صلاحیت لقاح و تکامل اووسیت روش کافی نمی‌باشد(۲۵). لذا تکنیک‌های میکروسکوپ الکترونی از آن جهت که می‌توانند اطلاعات وسیعی را از فراساختار سلول و ارگانل‌های آن فراهم نمایند بسیار ارزشمند است(۳۷). تغییرات فراساختاری گرانول‌های قشری، زوناپلوسیدا و سیتوپلاسم اووسیت‌های انسانی که در معرض آب‌گیری و آب‌دهی مجدد قرار گرفتند گزارش شده است و این نشان‌دهنده این است که میکروسکوپ الکترونی می‌تواند خط اول ابزار مورد بررسی باشد(۱۶). در پژوهش حاضر رنگ‌آمیزی تخمک‌ها مطابق روش آدونا و همکاران در سال ۲۰۰۸ با اندکی تغییر انجام گرفت. جهت رنگ‌آمیزی، ۲ ساعت پس از ذوب تخمک‌ها را در انکوباتور قرار داده، سپس با محلول حاوی پارافرمالدهید ۴٪ و تریتون X100 6/0 ٪ + بافر فسفات به مدت ۳۰ دقیقه ثابت سازی شدند. پس از آن، تخمک‌ها در ترکیبی از سرم بز ۵٪ + سرم آلبومین گاوی ۲٪ + بافر فسفات به مدت ۴۵ دقیقه برای از بین بردن باندهای غیر اختصاصی قرار داده شدند(تمامی مراحل ذکر شده تاکنون در روشنایی انجام شد، اما از این مرحله به بعد آزمایش باید در تاریکی ادامه یابد). سپس تخمک‌ها با آنتی بادی آلفاتوبولین که به میزان ۱ به ۱۰۰ در بافر فسفات رقیق شده به مدت یک ساعت انکوبه شدند. شستشو با توین۲۰ با غلظت ۰/۱ درصد انجام شد(۳ بار تکرار). در نهایت تخمک‌ها با پروپیدیوم

یدید با غظت ۱۰ میکروگرم در یک میلی‌لیتر به مدت ۱۵ دقیقه مجدداً رنگ‌آمیزی و تخمک‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)(Tukey) برای تعیین تفاوت بین میانگین مقادیر بقای تخمک‌ها و لقاح استفاده شد.

نتایج

پس از ذوب شدن تخمک‌ها، نرخ بقاء و لقاح هر گروه به طور جداگانه با گروه کنترل مقایسه شدند. جدول ۱ نتایج به دست آمده از انجماد شیشه ای تخمک ها را در گروه انجمادی اول به طور خلاصه نشان می دهد. نتایج نشان می دهد درصد بقاء گروه کنترل با گروه vitrification 1 دارای اختلاف معنی‌دار بوده(P<0.05) و میزان بقا در گروه انجمادی، به طور قابل توجهی پایین تر از گروه کنترل بود(P = ۰/۰۳۳) ولی بقیه گروه ها از نظر درصد بقاء اختلاف معنی داری با یک دیگر نداشتند(P>0.05). مطابق جدول ۱ نرخ بقاء تخمک های منجمد-ذوب شده در گروه D+Vitrification در مقایسه با گروه Vitrification به طور معنی داری بالاتر بود(P=0.001). میزان بقای تخمک‌های منجمد / ذوب شده در گروه دوستاکسل + انجمادی نسبت به گروه انجماد(P = ۰/۹۴۷) بیشتر بود ، اما تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. هم چنین در بقای تخمک‌ها بین گروه دوستاکسل و گروه دوستاکسل + محلول انجمادی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت(P=۰/۵۳۳). تخمک ها پس از انجماد- ذوب در گروه های آزمایشی و کنترل تحت عمل لقاح آزمایشگاهی قرار داده شدند. پس از انجام لقاح آزمایشگاهی، درصد تشکیل جنین های دو سلولی بررسی شد. جدول ۱ نشان می دهد که کاهش معنی‌داری در نرخ لقاح هر گروه در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد(P≤۰/۰۵). نتایج نشان داد که میزان لقاح هر گروه نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد(P= ۰/۰۰۱)، میزان تشکیل جنین‌های ۲ سلولی بعد از لقاح آزمایشگاهی در هر دو گروه انجماد(دوستاکسل + انجماد شیشه‌ای و انجماد شیشه‌ای) نسبت به گروه‌های غیر انجمادی(کنترل و دوستاکسل) به طور معنی داری پایین تر بود(جدول ۱). در مجموع می توان گفت زیر گروه های انجمادی از نظر درصد بقاء فاقد اختلاف معنی دار و از نظر درصد لقاح دارای اختلاف معنی دار می‌باشند. جدول ۲ نتایج انجماد شیشه‌ای تخمک در گروه انجمادی دوم را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می کنید درصد بقاء گروه های Docetaxel, Vitrification2, D+VS2, D+Vitrification2 نسبت به گروه کنترل کاهش یافته و دارای اختلاف معنی داری با گروه کنترل می باشند(P<0.05). درصد زنده مانی گروه Docetaxel+ Vitrification2 با گروه کنترل، دوستاکسل و Vitrification2 (P=0.05 دارای اختلاف معنی دار بوده(P<0.05)، در حالی که گروه Vitrification2 با گروه کنترل، دوستاکسل،(P<0.05) D+VS2 و D+Vitrification2 (P=0.05) دارای اختلاف معنی دار بود(P<0.05). گروه کنترل از نظر درصد لقاح آزمایشگاهی دارای تفاوت معنی دار با بقیه گروه ها (D+vitrification 2 و Vitrification2 و D+VS2 و دوستاکسل) میباشد(P<0.05). گروه دوستاکسل دارای اختلاف معنی دار با گروه های کنترل، D+ Vitrification2,Vitrification 2 می‌باشد(P<0.05)، در حالی که با گروه های Vitrification2 و D+Vitrification2 دارای اختلاف معنی دارتری می باشد(P<0.001). گروه D+ VS2 دارای اختلاف معنی دار با گروه های D+ Vitrification2,Vitrification2 می باشد(P<0.05). گروه D+Vit2 دارای اختلاف معنی

دار با گروه های کنترل، دوستاکسل و D+VS2 می باشد(P<0.001) و گروه Vitrification2 با گروه های کنترل، دوستاکسل و D+VS2 دارای اختلاف معنی دار می باشد(P<0.001). جدول ۳ مقایسه درصد بقاء و لقاح گروه های مختلف آزمایشی با یک دیگر را نشان می‌دهد مطابق جدول ۳ درصد بقاء گروه های مختلف آزمایشی دارای اختلاف معنی دار با یک دیگر می باشد(P<0.05). هم چنین درصد لقاح گروه ها نیز دارای اختلاف معنی دار با یک دیگر می باشد(P<0.001). همان طور که در جداول ۱و ۲ و۳ مشاهده می شود درصد بقاء تخمک های منجمد شده در گروه آزمایشی اول(۸۱/۱) نسبت به گروه دوم(۸۲/۷۵) کمتر بود اما این دو گروه از نظر آماری تفاوت معنی داری با یک دیگر نداشتند(P>0.05). هم چنین درصد تشکیل جنین های دو سلولی در گروه های انجمادی اول و دوم به ترتیب (۲.۱۵ ±۶۲.۲۶ و ۴.۶± ۶۰.۴) می باشد. این درصد نیز در گروه انجمادی اول نسبت به دوم کمتر بوده و از نظر آماری تفاوت معنی داری با یک دیگر نداشتند(P>0/05).

رنگ آمیزی اسکلت سلولی تخمک با آلفاتوبولین

رنگ آمیزی تخمک در گروه‌های کنترل و آزمایشی انجام گرفت. آرایش میکروتوبول و کروموزوم‌های واقع بر دوک تقسیم در گروه های کنترل و آزمایش در شکل ۱ آورده شده است. همان‌گونه که در شکل نشان داده شده است، انجماد شیشه‌ای باعث به هم ریختگی ساختار دوک و کروموزوم‌ها در تخمک موش می گردد(شکل ۱ B,C). با توجه به شکل در گروه کنترل کروموزوم‌ها به صورت خوشه‌ای قرار گرفته و میکروتوبول‌ها از یک قطب به قطب دیگر با آرایش نرمال کشیده شده اند و هم چنین از قطب‌های دوک به سمت کروموزوم‌ها امتداد پیدا کرده اند. در گروه انجمادی اول دوک تقسیم آرایش غیر نرمال نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهند که میکروتوبول‌ها به صورت یک دوک تیپیک سازمان‌دهی نشده‌اند و کروموزوم‌ها به صورت غیر نرمالی پراکنده شده‌اند. در گروه انجمادی دوم دوک تقسیم آرایش نرمال ولیکن با فشردگی بیشتر نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهند. کروموزوم‌ها به صورت خوشه‌ای قرار گرفته اما نسبت به گروه کنترل پخش شدگی دارند، میکروتوبول‌ها از یک قطب به قطب دیگر با آرایش نرمال کشیده شده اند و هم چنین از قطب‌های دوک به سمت کروموزوم‌ها امتداد پیدا کرده که پیش انکوبه کردن تخمک‌ها با دوستاکسل ۰/۰۵میکرومولار به مدت ۲۰ دقیقه قبل از انجماد در هر دو گروه انجمادی در ممانعت از آسیب‌های وارده به سیتواسکلتن تخمک موثر می‌باشد(شکل ۱-C,D). نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد نسبت تخمک‌های با آرایش نرمال میکروتوبول در گروه‌های پیش انکوبه شده با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار(دوستاکسل+ انجماد شیشه ای) قبل از انجماد شیشه‌ای به طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های انکوبه نشده(انجماد شیشه‌ای) می‌باشد(P>۰/۰۵). هم چنین نسبت تخمک‌های با کروموزوم پراکنده در گروه‌های پیش انکوبه شده با دوستاکسل به طور معنی‌داری پایین تر از گروه‌های انکوبه نشده می‌باشد(P>۰/۰۵).در واقع نسبت تخمک‌های با آرایش نرمال میکروتوبول به طور معنی‌داری در گروه‌های غیر انجمادی بالاتر از گروه‌های انجمادی می‌باشد(۰/۰۵> P) و نسبت تخمک‌های با کروموزوم پراکنده در گروه‌های غیر انجمادی پایین تر از گروه‌های انجمادی می‌باشد(P>۰/۰۵) ولی بین دو گروه انجمادی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد(P<۰/۰۵)(جدول۴).

جدول۱- نتایج انجماد شیشه‌ای تخمک با استفاده از کرایوتاپ در گروه انجمادی اول.

	Treatment group	No. (%) of surviving oocytes after vitrification	No. (%) of oocytes fertilization (two cell)
1	Fresh Control	126/124 (98.4 ± 1.5) [a]	80/71(88.6 ± 3.2) [a]
2	Docetaxel	132/122 (92.6 ± 3.2) [ab]	99/83(82.8 ± 5.2) [b]
3	Docetaxel + VS1	134/113 (84.1 ± 3.3) [ab]	150/115 (76.95 ± 2.03) [b]
4	Docetaxel + Vitrification 1	132/111(85 ± 3.8) [ab]	115/75 (65.3 ± 3.2) [b]
5	Vitrification 1	123/98(81.1 ± 5.8) [b]	105/61(60.4 ± 4.6) [b]
	P valu	0.028	0.001

* حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف در($P<0.05$) می‌باشد.

جدول۲-نتایج انجماد شیشه‌ای تخمک در گروه انجمادی دوم.

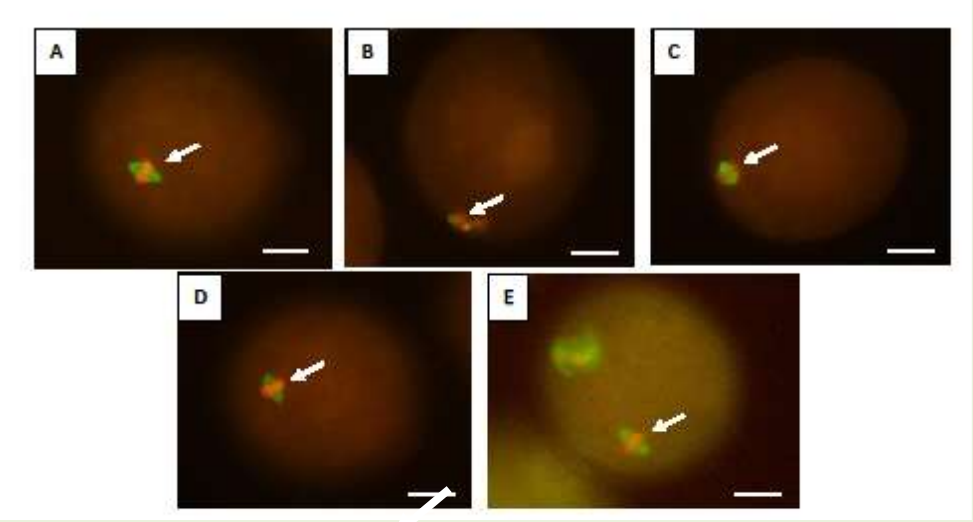
	Treatment group 2	No. (%) of surviving oocytes after vitrification	No. (%) of oocytes fertilization (two cell)
1	Fresh Control	133/130 (97.79 ± 0.73) [a]	94/84 (89.47 ± 2.003) [a]
2	Docetaxel	136/124 (91.15±1.23) [b]	99/83(83.86±1.55) [b]
3	Docetaxel + VS2	146/130 (88.99±1/27) [b]	121/97 (80.22± 0.83) [b]
4	Docetaxel + Vitrification2	138/121 (87.68± 0.43) [b]	98/65 (66.26±1.45) [b]
5	Vitrification 2	145/120 (82.75±1.33) [b]	98/61 (62.26± 2.15) [b]
	P valu	0.000	0.000

* حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف در($P<0.05$) می‌باشد.

جدول۳ -مقایسه درصد بقا و درصد لقاح گروه های مختلف آزمایشی با یکدیگر.

ANOVA

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
survival.rate	Between Groups	856.609	7	122.373	2.580	.036
	Within Groups	1280.700	27	47.433		
	Total	2137.309	34			
Fertilization	Between Groups	5015.362	7	716.480	22.388	.000
	Within Groups	864.068	27	32.003		
	Total	5879.431	34			



شکل ۱- در این تصویر فلش نشان دهنده کروموزوم‌ها به رنگ قرمز و میکروتوبول‌ها(دوک تقسیم) به رنگ سبز می‌باشد .A :کنترل کروموزوم‌ها به صورت خوشه‌ای قرار گرفته و میکروتوبول‌ها از یک قطب به قطب دیگر با آرایش نرمال کشیده شده‌اند و هم چنین از قطب‌های دوک به سمت کروموزوم‌ها امتداد پیدا کرده اند. B: گروه انجمادی اول میکروتوبول‌ها به صورت یک دوک تیپیک سازمان‌دهی نشده‌اند و کروموزوم‌ها به صورت غیر نرمالی پراکنده شده‌اند. C: گروه انجمادی دوم D:دوستاکسل +گروه انجمادی اول E: دوستاکسل + گروه انجمادی دوم.

جدول ٤- نتایج حاصل از رنگ آمیزی تخمک با آنتی بادی آلفاتوبولین.

گروه‌ها	٪ میکروتوبول نرمال	٪میکروتوبول غیرنرمال	٪کروموزم پراکنده	٪کروموزم فشرده
کنترل	۹۴±۱	۵/۵± ۰/۳۳	۲۰/۷۳±۱/۱۵	۴/۱±۰/۵۷
دوستاکسل	۹۴±۲/۹	۵/۱± ۰/۳۳	۲۱/۰۱±۱/۸۵	۵/۱±۰/۳۳
دوستاکسل+ محلول انجمادی اول	۸۲±۰/۵۷	۱۲/۰۸ ± ۱	۱۹/۴۵±۰/۳۳	۷/۳۷±۰/۳۳
دوستاکسل+ محلول انجمادی دوم	۸۳±۰/۶۱	۱۲/۱±۰/۱۵	۱۸/۲±۰/۲۱	۷/۲۱±۰/۱۸
انجماد شیشه‌ای اول	۵۷±۱ [a]	۳۹/۵±۰/۶۶	۳۸/۱±۰/۳۳ [a]	۱۶/۶۶±۰/۳۳ [a]
انجماد شیشه‌ای دوم	۵۶±۰/۵۱ [a]	۳۸/۹±۰/۱۱	۳۷/۱۲±۰/۲۳ [a]	۱۵/۵۵±۰/۱۸ [a]
دوستاکسل+ انجماد شیشه‌ای اول	۶۶±۰/۵۷ [b]	۳۴/۱±۰/۳۳	۲۱/۱۸ [b]	۷/۸±۰/۳۳ [b]
دوستاکسل+ انجماد شیشه‌ای دوم	۶۶±۰/۴۴ [b]	۳۴/۲±۰/۱۱	۱۹/۶۶ [b]	۷/۱±۰/۱۲ [b]

* حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف در($P<0.05$) می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات انجماد شیشه‌ای روی زنده ماندن، لقاح آزمایشگاهی و فراساختار تخمک‌های بالغ موش در مرحله متافاز دوم انجام شد. منجمد کردن تخمک یک روش حفظ باروری در خانم‌ها می‌باشد. هر چند که میزان حاملگی اندک و تعداد محدودی تولد زنده از تخمک‌های منجمد شده گزارش شده است. یکی از مشکلاتی که در مورد انجماد تخمک‌های بالغ وجود دارد، مقاومت کمتر غشای این اووسیت‌ها نسبت به کاهش درجه حرارت و آسیب‌های ناشی از سرما به‌دلیل داشتن ترکیب لیپیدی متفاوت در مقایسه با اووسیت‌های نابالغ و در نتیجه به هم ریختگی آرایش اندامک‌های سلولی بویژه اسکلت سلولی می‌باشد(۸). این عامل منجر به کاهش توانایی زنده مانی تخمک و جنین پس از انجماد می‌گردد. به‌علاوه نتایج نشان داده است که غشای اووسیت‌های بالغ دارای یک ترکیب لیپیدی متفاوت در مقایسه با اووسیت‌های نابالغ بوده و نسبت به کاهش درجه حرارت و آسیب‌های ناشی از سرما دارای مقاومت کمتری هستند(۲۹). بنابراین با انجماد اووسیت‌های نابالغ می‌توان بر این مشکلات غلبه نمود. مطالعات فراساختاری نشان دادند که انجماد سبب کاهش تعداد گرانول‌های قشری در اووسیت‌های بالغ انسانی می‌شود(۲۷). در یک مطالعه انسانی نشان داده شده است که فرآیند انجماد سبب کاهش تعداد گرانول‌های قشری در ناحیه قشری و ظهور واکوئل‌ها در سیتوپلاسم اووسیت‌های بالغ و نابالغ می‌شود که ممکن است نشان دهنده آسیب ساختاری به آن‌ها باشد(۱۳). اگزوسیتوز زودرس گرانول‌های قشری در اووسیت‌های انسانی که در معرض PrOH و یا DMSO قرار گرفتند نشان داده شده است. مشخص شده است که در تخمک‌ها در اثر انجماد شیشه ای سطح رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و ظرفیت آنتی اکسیدانی کاهش می‌یابد؛ هم چنین میکروتوبول‌ها دچار آسیب شده و در نتیجه توزیع میتوکندری‌ها در سطح تخمک دچار اختلال می‌شود. با توجه به این که میکروتوبول‌ها و دیگر فیبرهای اسکلت سلولی ممکن است در طول انجماد شیشه‌ای دچار آسیب شده و در نتیجه باعث شکست در پروسه لقاح پس از ذوب شدن گردند، پایداری رشته‌های دوکی برای انجماد شیشه‌ای موفق تخمک ها بسیار مهم می‌باشد. دوستاکسل یک عامل پایدار کننده است که می‌تواند با مهار تجمع میکروتوبول‌های توبولین در طی انجماد، باعث تثبیت میکروتوبول‌ها شود(۳۵). در این مطالعه، میزان بقا و لقاح تخمک‌های منجمد و ذوب شده که قبل از انجماد با دوستاکسل پیش انکوبه شدند، بهتر

از تخمک‌های پیش انکوبه نشده بود. بنابراین، آرایش نرمال اسکلت سلولی، گرانول‌های قشری تخمک و میتوکندری پس از انجماد و ذوب می‌تواند با سطح متابولیسم، تکثیر و تمایز سلولی وابسته باشد. یکی از مهم ترین آسیب‌های مرتبط با انجماد آسیب به سیستم اسکلت سلولی تخمک است. بر اساس نتایج مطالعات قبلی، پس از انجماد شیشه‌ای و ذوب، دوک‌های میتوزی در زمان مشخص بازسازی شده و تکوین جنینی بهبود می‌یابد(۱۱،۳۴). نظم آرا و همکاران در سال ۱۳۹۰ نشان دادند روش انجماد شیشه ای با استفاده از کرایوتاپ و ضدیخ اتیلن گلیکول، دی متیل سولفوکساید و سوکروز تأثیری بر پتانسیل تکوینی و میزان ATP تخمک موش در مراحل مختلف تکوینی نداشت اما بر روی پراکندگی میتوکندری اثر گذار بود. Giaretta و همکاران در ۲۰۱۳ برای اولین بار اهمیت Resveratrol را در انجماد شیشه ای تخمک بررسی کردند. نتایج آن ها نشان داد ۲ µM R در IVM و فازهای منجمد ذوب شده توانایی زنده مانی تخمک‌ها را افزایش داده و فرایند آپاپتوز را تعدیل می‌کند.رنگ آمیزی TITC-VAD-FMK تمایل به افزایش اووسیت های زنده با کاسپازهای غیر فعال در همه گروه‌های Resveratrol در مقایسه با CTR را نشان می‌دهد و یک تفاوت معنی دار فقط بین A و گروه‌های CTR وجود دارد. به هر حال درصد زنده مانی اووسیت ها با کاسپاز فعال با وجود Resveratrol تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که با واسطه PS فاگوسیتوز می‌تواند بدون فعال شدن کاسپازها رخ دهد. نتایج Giaretta و همکاران در ۲۰۱۳ نشان داد ترکیبات Resveratrol در فازهای مختلف IVM و فرایند انجماد شیشه ای- ذوب می‌تواند فرایند آپاپتوز را تعدیل کند و پایداری اووسیت های خوک را در مقابل آسیب های انجمادی بهبود ببخشد. آسکوربات(۰/۰۱ mMol/L) شرح داده شده که ترازهای پراکسید هیدروژن را در جنین های موش کاهش می‌دهد و وقتی به محلول های انجماد شیشه ای یا انجماد آهسته اضافه می‌شود توده سلولی داخلی را بالا می‌برد و β مرکاپتو اتانول (۵۰ mMol/L) فعالیت Ros را پایین می‌آورد اما نمی‌تواند توانایی لقاح و زنده مانی را در اووسیت های M II منجمد ذوب شده بهبود ببخشد در حالی که به طور معنی داری قابلیت تشکیل بلاستوسیست را در اووسیت های انجمادی خوک بعد از لقاح آزمایشگاهی را افزایش می‌دهد(۱۴). نتایج ما نیز تایید کننده این مطلب می‌باشد که می‌توان با استفاده از دوستاکسل میزان آسیب را به حداقل رسانده تا سیتواسکلتون و دوک میتوزی تخمک‌ها در مدت زمان کوتاه‌تری به آرایش نرمال بازگردند. در مطالعه حاضر میزان تکامل به جنین دوسلولی پس از انجماد شیشه ای در هر گروه(انجمادی و غیر انجمادی) کاهش معنی‌داری را با گروه کنترل نشان داد. در تایید این نتایج عابدپور و همکارانشدر سال ۲۰۱۵ ثابت کردند که انجماد شیشه‌ای باعث کاهش معنی‌داری در سرعت بلوغ تخمک‌ها می‌شود(۱). در مطالعه آن ها سرعت لقاح تخمک‌های منجمد شده اختلاف معنی‌داری با یک دیگر نداشتند اما هر کدام از آن ها به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بودند. عابدپور و همکارانش هم چنین در سال ۲۰۱۵ نشان دادند انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ باعث آسیب به تخمک از طریق کاهش سرعت بلوغ و لقاح می‌شود. در مطالعه حاضر درصد لقاح در گروه‌های پیش انکوبه شده با دوستاکسل بیشتر از گروه‌های انکوبه نشده بود(۱).در تحقیق چزمبت و همکاران(۷) بر روی تخمک گاو، درصد بقاء تخمک ها بیشتر از نتایج به دست آمده از تحقیق ما بوده که این می تواند ناشی از تفاوت در گونه حیوانی، حساسیت متفاوت گونه های مختلف به انجماد، درصد متفاوت ضدیخ، استفاده از ضدیخ ها و پروتوکل‌های انجمادی متفاوت باشد.

گزارش شده که نگهداری تخمک‌ها در دمای فوق پایین(۱۹۶- درجه سانتی گراد) باعث القا دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها در تخمک ها می‌شود(۲۶). به علاوه دمای فوق پایین باعث شکسته شدن اسکلت سلولی و کروموزوم‌های تخمک می‌گردد که منجر به تکوین سلولی ناکامل و شکست در پروسه لقاح پس از ذوب می‌شود(۵،۶). این مطلب پیشنهاد می‌کند پایداری فیبرهای دوک با دوستاکسل می‌تواند در موفقیت انجماد شیشه‌ای تخمک ها در دماهای فوق پایین مهم باشد. نتایج مطالعات قبلی نشان دادند پیش انکوبه کردن تخمک‌های گاو با تاکسان‌هایی از قبیل پاکلیتاکسل در غلظت پایین(۱ میکرومولار) برای ۳۰ دقیقه قبل از انجماد شیشه‌ای می‌تواند از شکست اسکلت سلولی در طول انجماد شیشه‌ای ممانعت کرده و در نتیجه باعث افزایش نرخ بقا پس از ذوب شده و تکوین جنینی متعاقب آن را بهبود می‌بخشد(۲۶،۳۳). هم چنین مطالعات قبلی نشان دادند که دوستاکسل نرخ گسترش توبولین به میکروتوبول‌های پایدار را افزایش داده و مانع از دپلیمریزاسیون آن ها به هنگام مواجهه با سرما می‌شوند(۱۸،۳۰).در مطالعه دیگری گزارش شد که دوستاکسل می‌تواند میکروتوبول را توسط اتصالات محکم بین دیمرهای αوβ –توبولین و تغییرات بعدی در اتصال MAP پایدار کند که این از آسیب یا دپلیمریزاسیون در طول انجماد شیشه‌ای تخمک‌ها جلوگیری می‌کند(۱۱). در مطالعه حاضر تخمک‌های پیش انکوبه شده با دوستاکسل به مدت ۲۰ دقیقه قبل از انجماد شیشه‌ای سهم بیشتری از تخمک‌های منجمد ذوب شده با آرایش میکروتوبول و کروموزوم نرمال و هم چنین نرخ بالاتر بقا و تسهیم را در مقایسه با تخمک‌های پیش انکوبه نشده را دارند. این نتایج به خوبی بر این مطلب دلالت دارد که پایداری اسکلت سلولی تخمک ها توسط دوستاکسل می‌تواند آسیب القا شده توسط انجماد شیشه‌ای را کاهش دهد. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به کمبود هزینه‌ها و دسترسی سخت به مواد اولیه که از خارج از کشور تامین می‌شود، اشاره کرد. در صورت تامین هزینه کافی می‌توانارزیابی‌های بیشتری در زمینه فراساختار و تغییرات ژنتیکی تخمک انجام گرفته شود. در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت با انکوبه کردن تخمک‌های بالغ مرحله متافاز دوم موش با دوستاکسل به مدت ۲۰ دقیقه قبل از انجماد شیشه‌ای در غلظت ۰/۰۵ میکرومولار، درصد بقاء و لقاح تخمک‌ها بهبود یافته و آسیب اسکلت سلولی مهار می‌شود. از این نتایج می‌تواند جهت بهبود تکنیک‌های کمک باروری و افزایش نرخ موفقیت در لقاح آزمایشگاهی استفاده کرد.

منابع

1.Abedpour, N., Rajaei, F. (2015). Vitrification by cryotop and the maturation, fertilization, and developmental rates of mouse oocytes. Iranian Red Crescent Medical Journal, 17(10); e18172.

2.Almasi- turk, S., Roozbehi, A. (2013). Mouse oocytes and embryos cryotop-vitrification using low concentration solutions: Effect of meiotic spindle, genetic material array and developmental ability. Iranian Journal of Basic Medial Science, 16; 599-609.

3.Amidi, F., Khodabandeh, Z/, Mogahi, MHN. (2018). Comparison of the effects of vitrification on gene expression of mature mouse oocytes using cryotop and open pulled straw. International Journal of Fertility & Sterility, 12(1); 61.

4.Bissery, M-C. (1995). Preclinical pharmacology of docetaxel. European Journal of Cancer 31; S1-S6.

5.Boiso, I., Martí, M., Santaló, J., Ponsá, M., Barri, P.N., Veiga, A. (2002). A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. Human Reproduction, 17(7); 1885-1891.

6.Bouquet, M., Selva, J., Auroux, M. (1992). The incidence of chromosomal abnormalities in

frozen thawed mouse oocytes after in-vitro fertilization. Human Reproduction, 7(1); 76-80.
7.Chasombat, J., Nagai, T., Parnpai, R., Vongpralub, T. (2015). Pretreatment of in vitro matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. Cryobiology, 71(2); 216-223.
8.Ciotti, P. M., Porcu, E., Notarangelo, L., Magrini, O., Bazzocchi, A., Venturoli, S. (2009). Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. Fertility and Sterility, 91(6); 2399-2407.
9.Cetin, Y., Bastan, A. (2006). Cryopre servation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. Anim Reprod Sci, 92 (1); 29-36.
10. Dehghani, N., Dianatpour, M., Hosseini, S. E., Khodabandeh, Z., Daneshpazhouh, H. (2019). Over expression of mitochondrial genes (mitochondrial transcription factor a and cytochrome c oxidase subunit 1) in mouse metaphase ii oocytes following vitrification via cryotop. Iran J Med Sci, 44(5); 406-414.
11. Devillard, L., Vandroux, D., Tissier, C., Dumont, L., Borgeot, J., Rochette, L. (2008). Involvement of microtubules in the tolerance of cardiomyocytes to cold ischemia-reperfusion. Molecular and Cellular Biochemistry, 307(1-2); 149-157.
12. Fuchinoue, K.,Fukunaga, N., Chiba, S., Nakajo, Y., Yagi, A., Kyono, K. (2004). Freezing of human immature oocytes using cryoloops with taxol in the vitrificationsolution. J. Assist.Reprod.Genet, 21; 307-309.
13. Ghetler, Y., Skutelsky, E., Ben Nun, I., Ben Dor, L. (2006). Huma oocyte cryopreservation and the fate of cortical granoles. Fertil and Steril, 86;210-216.
14. Giaretta, E., Spinaci, M., Bucci, D., Tamanini, C., Galeati, G. (2013). Effect of resveratrol on vitrified porcine oocytes. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 1-7.
15. Gook, DA., Edgar, DH. (2007). Human oocyte cryopreservation. Hum Reprod Update, 13(6); 591–605.
16. Gualtieri, R., Iaccarino, M., Mollo, V., Prisco, M. (2009). Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. Fertil Steril, 91(4); 1023-34.
17. Gueritte-Voegelein, F., Guenard, D., Lavelle, F., Le Goff, M.T., Mangatal, L., Potier, P. (1991). Relationships between the structure of taxol analogs and their antimitotic activity. Journal of Medicinal Chemistry, 34(3); 992-998.
18. Huang, J., Li, Q., Zhao, R., Li, W., Han, Z. (2007). Effect of sugars on maturation rate of vitrified-thawed immature porcine oocytes. Anim Reprod Sci, Mar 30.
19. Huang, J. Y., Chen, H, Y., Park, J. Y. S., Tan, S. L., Chian, R-C. (2008). Comparison of spindle and chromosome configuration in in vitro-and in vivo-matured mouse oocytes after vitrification. Fertility and Sterility, 90(4); 1424-1432.
20. Jahromi, Z, K., Amidi, F., Mugehe, S., Sobhani, A., Mehrannia, K., Abbasi, M., et al. (2010). Expression of heat shock protein (HSP A1A) and MnSOD genes following vitrification of mouse MII oocytes with cryotop method. Yakhteh Med J, 12(1); 113-119.
21. Jain, J., Paulson, RJ. (2006). Oocyte cryopreservation. Fertil Steril, 86(3);1038-1046.
22. Jimenez-Trigos, E., Naturil-Alfonso, C., Marco-Jimenez, F. (2013). Post warming competence of in vivo matured rabit oocytes treated with cytoskeletal stabilization (taxol) and cytoskeletal relaxant(cytochalasin B) befor vitrification. Reprod. Domest.Anim,45;15-19.
23. Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. Theriogenology, 67(1); 73-80.
24. Khodabandeh, JZ., Amidi, F., Nouri, MS., Sobhani, A., Mehranian, KM., Abbasi, M. (2010). Expression of heat shock protein(HSP A1A) and MnSOD genes following vitrification of mouse MII oocytes with cryotop method Cell Journal, 12(1); 1-119.
25. Lassalle, B., Testart, J., Renard, JP. (1985). Human embry features that influence the success of cryopre servation with the use of 1, 2 propanediol. Fertil Steril., 44(5); 645-651.
26. Morató, R., Izquierdo, D., Albarracín, J. L., Anguita, B., Palomo, M.J. (2008). Effects of pre-treating in vitro-matured bovine oocytes with the cytoskeleton stabilizing agent taxol prior to vitrification. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 75(1); 191-201.
27. Nottola, SA., Coticchio, G., Sciajno, R., Gambardella, A. (2009). Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop. Reprod BioMed Online, 19;17-27.

28. Park, SE., Chung, H.M., Cha, K.Y., Hwang, W.S. (2001). Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using Taxol, a cytoskeleton stabilizer, fertil. Steril, 75; 1177-1184.

29. Rao, GD., Tan, SL. (2005). In vitro maturation of oocytes. Semin Reprod Med, 23(3); 242-247.

30. Ringel, I., Horwitz, S. B. (1991). Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 83(4); 288-291.

31. Roozbehi, A. (2013). Mouse oocytes and embryos cryotop-vitrification using low concentrated solutions: Effects on meiotic spindle, genetic material array and developmental ability. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 16(4); 590.

32. Rienzi, L., Martinez, F., Ubaldi, F., Minasi, MG., Iacobelli, M., Tesarik, J. (2004). Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. Hum Reprod, 19; 655–9.

33. Schmidt, D., Nedambale, T., Kim, C., Maier, D., Yang, X., Tian, X. (2004). Effect of cytoskeleton stabilizing agents on bovine matured oocytes following vitrification. Fertility and Sterility, 82; S26.

34. Shaw, JM., Oranratnachai, A., Trounson, AO. (2000). Cryopreservation of oocytes and embryos, Handbook of in Vitro Fertilization ;chapter sixteen.

35. Shi, W-Q., Zhu, S-E., Zhang, D., Wang, W-H., Tang, G-L., Hou, Y-P. (2006). Improved development by Taxol pretreatment after vitrification of in vitro matured porcine oocytes. Reproduction, 131(4); 795-804.

36. Sparreboom, A., Nooijen, W., Beijnen, J. (1998). Preclinical pharmacokinetics of paclitaxel and docetaxel. Anti-Cancer Drugs, 9(1); 1-17.

37. Vajta, GC., Nagy, ZP. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. Reprod Biomed Online, 12(6); 779-796.

38. Zhou, C-J., Wang, D-H., Niu, X-X., Kong, X-W., Li, Y-J., Ren, J. (2016). High survival of mouse oocytes using an optimized vitrification protocol. Scientific Reports, 6; 19465..

Comparative Study of Impact of Docetaxel on the Cytoskeleton of Mouse Oocytes after Vitrification with Two Different Cryopreservation Solutions

H. Daneshpazhouh[1], N. Hayati Roodbari[2], **M. Dianatpour[3]**, Z. Khodabandeh4, Y. Tahamtani[5]

1.Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2.Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3.Stem Cells Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

mdianatpur@gmail.com

4. Stem Cells Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

5.Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran. Iran.

Received:2022.29.1 **Accepted: 2022.10.2**

Abstract

Inroduction & Objective: The aim of the present study was to investigate the effect of docetaxel on the survival rate and in vitro fertilization of oocytes after vitrification by two cryopreservation solution.

Materials and Methods: For this NMRI mice (8-10 weeks old) were superovulated by injecting PMSG and HCG. Oocytes are surrounded by cumulus and corona cells and must be denuded by 0.1% hyaluronidase enzyme. The oocytes were then divided into 8 experimental groups including control, docetaxel, docetaxel + vitrification 1 solution; docetaxel + vitrification1; vitrification1; docetaxel + vitrification 2 solution; docetaxel + vitrification2; vitrification2. Mature oocytes were vitrified in ethylene glycol and dimethyl sulfoxide solutions at 15% concentration and 0.5 M sucrose in cryopreservation solution1 and ethylene glycol and glycerol at 7.5 concentration and 0.5 M sucrose in cryopreservation solution2. After thawing, their survival and fertilization rates were assessed up to the two-cell stage. Staining of the microtubules in the oocytes was performed with alpha-tubulin antibody.

Results: The results showed a significant difference in survive and fertilization rates compared to the control group (P<0.05). The rate of survival and formation of 2-cell embryos in the first cryopreservation group decreased compared to the second cryopreservation group but the two groups were not statistically significant. The results showed that survival and fertilization rates in pre-incubated groups with docetaxel were higher than non-incubated groups.

Conclusion: Docetaxel could improve reproductive techniques by reducing the damage to the oocyte cytoskeleton.

Keywords: Vitrification, Oocytes, Cryopreservation Solution, Docetaxel, Cryotop.