



Optimization of Ovine-Oocyte Vitrification Utilizing Calcium Depletion by Adding EGTA to Freezing Solution

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Sanaei B.¹ PhD,
Movaghar B.^{*1} PhD,
Rezazadeh Valojerdi M.² PhD,
Ebrahimi B.¹ PhD,
Bazrgar M.¹ PhD,
Hajiyani M.⁴ PhD,
Jafarpour F.⁴ PhD,
Nasr-Esfahani M.H.⁴ PhD

How to cite this article

Sanaei B, Movaghar B, Rezazadeh Valojerdi M, Ebrahimi B, Bazrgar M, Hajiyani M, Jafarpour F, Nasr-Esfahani M.H. Optimization of Ovine-Oocyte Vitrification Utilizing Calcium Depletion by Adding EGTA to Freezing Solution. Pathobiology Research. 2020;23(2):91-99.

¹Embryology Department, Reproductive Biomedicine Institute, Royan Institute (ACECR), Tehran, Iran

²Anatomy Department, Medical Science Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Genetic Department, Reproductive Biomedicine Institute, Royan Institute (ACECR), Tehran, Iran

⁴Reproductive Biotechnology Department, Reproductive Biomedicine Institute, Royan Institute (ACECR), Isfahan, Iran

*Correspondence

Address: Royan Institute, No.2, Hafez Street, Banihashem Square, Resalat HI way, Tehran, Iran

Phone: -

Fax: -

b.movaghar@royaninstitute.org

Article History

Received: June 9, 2019

Accepted: June 23, 2020

ePublished: July 29, 2020

ABSTRACT

Aims Vitrification affects intracellular calcium, fertilization ability, and developmental competence of mammalian oocytes. This effect may be more closely associated with an intracellular calcium rise induced by cryoprotectants. The present study aimed to assess whether reducing calcium of vitrification solution could improve the fertilization and developmental competence of ovine oocytes.

Materials & Methods COCs were collected from the ovine ovary. MII oocytes were divided into 5 groups, one non-vitrified (control) and four vitrified groups 24 hours after COC culture. Vitrified groups were designed according to the presence or absence of EGTA (a calcium chelator) and/or calcium in base media, including mPB1+ (modified PBS with Ca^{2+}), mPB1- (modified PBS without Ca^{2+}), mPB1+/EGTA (mPB1+ containing EGTA), mPB1-/EGTA (mPB1- containing EGTA). Fertilization rate and *in vitro* development were evaluated after embryo thawing. Also, blastocyst quality was assessed using differential staining. Data analysis was carried out using one-way analysis variance.

Findings There was no significant difference in the viability rate between vitrified groups. Fertilization and the developmental rate decreased in the presence of calcium ($p < 0.05$) but in the calcium-free medium with the EGTA supplementation group, the developmental rate obviously increased. On the other hand, blastocyst cell count in the control group was similar to vitrified groups.

Conclusion Using a calcium-free cryoprotectant by adding EGTA can improve the quality of vitrified-thawed ovine MII oocyte and also a higher developmental rate in obtained embryos.

Keywords Vitrification; Ovine Oocyte; Calcium Chelator; Embryo Development

CITATION LINKS

[1] Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a ... [2] Cryopreservation in mammalian conservation ... [3] Developmental competence of ovine oocytes after ... [4] Analysis of oocyte physiology to improve ... [5] Meiotic spindle dynamics in human oocytes following ... [6] Vitrification may increase the rate of chromosome ... [7] Assessment of aneuploidy formation in ... [8] Morphological and biochemical analysis of ... [9] Calcium-free vitrification reduces ... [10] Vitrification solution containing DMSO ... [11] High developmental rates of mouse ... [12] 1, 2-propanediol and the type of cryopreservation ... [13] Repetitive calcium transients and the role ... [14] Dynamics of cortical granule exocytosis at fertilization ... [15] Calcium concentration in vitrification medium affects ... [16] Calcium ion regulation by BAPTA-AM and ... [17] Vitrification of in vitro matured ovine ... [18] Nuclear transfer technique affects mRNA ... [19] Vitrification has detrimental effects on maturation, viability, and ... [20] Effect of vitrification on the zona pellucida ... [21] Evaluation of the impact of vitrification ... [22] The impact of vitrification on immature oocyte cell cycle and ... [23] Impact of vitrification on the meiotic spindle and components ... [24] Ultrastructural changes and methylation of human oocytes ... [25] A modified vitrification method reduces spindle and ... [26] Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse ... [27] Mitochondrial distribution and ATP content of vitrified, in vitro ... [28] A recovery time after warming restores ... [29] Morphological, biochemical and functional studies to ... [30] Effect of oocyte vitrification on DNA damage in metaphase II oocytes and the resulting ... [31] Tolerance of lamb and mouse oocytes ... [32] Positive effects of taxol pretreatment on ... [33] Improvement of the efficacy of buffalo ... [34] Effects of partial removal of cytoplasmic lipid ... [35] The effect of liposomes on thermotropic ... [36] Control of mitochondrial motility ... [37] Effect of intracellular Ca^{2+} chelation with the ...

بهینه‌سازی انجماد شیشه‌ای تخمک گوسفندی از طریق کاهش کلسیم با افزودن EGTA به محلول انجمادی

بتول صناعی PhD

گروه جنین‌شناسی، پژوهشکده علوم تولید مثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

بهار موقر* PhD

گروه جنین‌شناسی، پژوهشکده علوم تولید مثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

مجتبی رضازاده ولوجردی PhD

گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

بی‌نا ابراهیمی PhD

گروه جنین‌شناسی، پژوهشکده علوم تولید مثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

مسعود بندرگر PhD

گروه ژنتیک، پژوهشکده علوم تولید مثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

مهدی حاجیان PhD

گروه زیست‌فناوری تولید مثل، پژوهشکده علوم تولید مثل، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران

فرنوش جعفرپور PhD

گروه زیست‌فناوری تولید مثل، پژوهشکده علوم تولید مثل، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران

محمدحسین نصرافهانی PhD

گروه زیست‌فناوری تولید مثل، پژوهشکده علوم تولید مثل، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران

چکیده

اهداف: در فرآیند انجماد شیشه‌ای، کلسیم داخل سلولی تحت تأثیر مواد محافظ انجماد افزایش و توانایی تکوین تخمک کاهش می‌یابد. مطالعه حاضر با هدف کاهش کلسیم محیط پایه انجماد به منظور بهبود میزان لقاح و توانایی تکوین تخمک انجام شد.

مواد و روش‌ها: مجموعه تخمک و سلول‌های کومولوسی از تخمدان گوسفند جمع‌آوری و پس از ۲۴ ساعت کشت در محیط بلوغ، تخمک‌های متافاز II به پنج گروه شامل یک گروه کنترل (غیرانجمادی) و چهار گروه انجمادی تقسیم شدند. گروه‌های انجمادی براساس حضور یا عدم حضور اتیلن‌گلیکول‌تترا استیک‌اسید (EGTA) و کلسیم در محیط پایه طراحی شدند. به این منظور از چهار نوع محیط پایه شامل فسفات‌بافرسالین با و بدون کلسیم، همچنین فسفات‌بافرسالین دارای EGTA، با و بدون کلسیم استفاده شد. پس از ذوب، میزان لقاح و تکوین جنین تا تشکیل بلاستوسیست اندازه‌گیری شد. کیفیت بلاستوسیست با استفاده از رنگ‌آمیزی افتراقی و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام شد.

یافته‌ها: بین گروه‌های انجمادی از لحاظ میزان زنده‌مانی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. میزان لقاح در محیط فاقد کلسیم بالاتر از سایر گروه‌های انجمادی ($68/81 \pm 0/05$ و $77/77 \pm 0/67$) به ترتیب در حضور و عدم حضور EGTA بود. در محیط فاقد کلسیم و حاوی EGTA تکوین جنین ۳ و ۵ روزه، به ترتیب $60/53 \pm 1/38$ و $67/21 \pm 2/85$ نسبت به سایر گروه‌های انجمادی بالاتر بود ($p < 0/05$). شمارش سلولی بلاستوسیست تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های انجمادی و گروه کنترل نشان نداد.

نتیجه‌گیری: استفاده از سیستم انجمادی بدون کلسیم از طریق افزودن EGTA می‌تواند سبب بهبود کیفیت تخمک بالغ گوسفندی پس از انجماد و بهبود تکوین جنین‌های حاصل شود.

کلیدواژه‌ها: انجماد شیشه‌ای، تخمک گوسفندی، چیلاتور کلسیمی، تکوین جنین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۳

*نویسنده مسئول: b.movaghar@royaninstitute.org

مقدمه

انجماد تخمک، یکی از تکنیک‌های رایج در روش‌های درمان ناباروری است که علاوه بر کاربردهای بالینی، در حفظ منابع ژنتیکی و تنوع زیستی، نگهداری گونه‌های بارزش و در حال انقراض و ایجاد بانک تخمک برای کاربردهای پژوهشی مانند مهندسی ژنتیک یا کلونینگ جنین اهمیت قابل ملاحظه‌ای دارد^[1].
 ۲. علی‌رغم گزارش‌های تولد نوزادان پس از انتقال جنین‌های حاصل از تخمک‌های منجمد-ذوب‌شده در گونه‌های مختلف پستانداران، میزان تکوین تخمک‌ها پس از انجماد همچنان پایین است^[3]. تخمک پستانداران دارای ویژگی‌های خاصی از لحاظ ساختاری و عملکردی است که این ویژگی‌ها سبب می‌شود انجماد آن تبدیل به یک چالش واقعی در روش‌های حفظ انجمادی شود. بررسی‌هایی که بر روی ساختار و فیزیولوژی تخمک پس از انجماد انجام شده، نشان‌دهنده آسیب‌پذیری بیشتر این سلول در مقایسه با جنین است^[4]. نسبت پایین سطح تخمک به حجم آن، ویژگی‌های غشا و نفوذپذیری پایین آن به ضدیخ‌ها و آب، حساسیت زیاد دوک‌های تقسیم و گرانول‌های قشری به دماهای پایین و ضدیخ‌ها، سبب افزایش حساسیت و آسیب‌پذیری تخمک در فرآیند انجماد می‌شوند^[5-8]. مطالعات متعددی نشان داده‌است که انجماد شیشه‌ای از طریق افزایش وقوع پدیده سخت‌شدن زوناپلوسیدا سبب کاهش نفوذ اسپرم و متعاقب آن کاهش میزان لقاح و توانایی تکوین تخمک می‌شود^[9, 10]. یکی از دلایلی که برای سخت‌شدن زوناپلوسیدای تخمک پس از انجماد مطرح شده است، افزایش میزان کلسیم داخل سلولی تحت تأثیر ضدیخ‌های مانند دی‌متیل‌سولفوکساید، اتیلن‌گلیکول و پروپاندیول است که خود منجر به آگروسیتوز زودرس گرانول‌های قشری و در نتیجه سخت‌شدن زوناپلوسیدا می‌شود^[9, 11, 12]. با در نظر گرفتن اینکه آگروسیتوز گرانول‌های قشری تخمک پدیده‌ای وابسته به کلسیم است، مطالعات متعددی به منظور کاهش غلظت یا حذف کلسیم محیط انجمادی در گونه‌های مختلف پستاندار انجام شده که همه آنها بیانگر افزایش میزان لقاح و تکوین تخمک بوده است^[9, 11, 13].
 ۱۶. از طرفی، لارمن و همکاران^[9] در مطالعه خود نشان دادند که ضدیخ‌ها با روشی متفاوت منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی می‌شوند. همچنین اتیلن‌گلیکول سبب افزایش ورود کلسیم از محیط خارج سلولی به درون سیتوپلاسم تخمک می‌شود، در حالی که دی‌متیل‌سولفوکساید با تأثیر بر منابع داخل سلولی مانند شبکه آندوپلاسمی و افزایش نفوذپذیری غشاهای درون سلولی باعث افزایش کلسیم داخل سلول می‌شود. از این رو به نظر می‌رسد استفاده از چیلاتورهای (حذف‌کننده‌ها) یون کلسیم در محیط انجمادی تخمک با به حداقل رساندن اثرات منفی ناشی از افزایش کلسیم داخل سلولی، راهکاری مناسب برای بهبود زنده‌مانی، لقاح و تکوین تخمک باشد^[16]. اثرات مثبت استفاده از چیلاتور BAPTA در محیط انجمادی تخمک موش و گاو بر کاهش سخت‌شدن زوناپلوسیدا، افزایش میزان لقاح و تکوین اثبات شده

سیستئامین) پوشیده با روغن و از قبل انکوبه منتقل شدند. پتری‌دیش‌ها حاوی قطرات محیط کشت، ۱۰ تا ۱۵ عدد تخمک در هر قطره ۵۰ میکرولیتری، به مدت ۲۴ ساعت، در انکوباتور با دمای 38.5°C ، ۵٪ CO_2 و رطوبت حداکثر برای انجام مراحل بلوغ آزمایشگاهی قرار داده می‌شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، مجموعه‌های تخمک-کومولوس از پتری‌دیش بلوغ به محیط شست‌وشوی FBS ۱۰٪+H-TCM که حاوی ۳۰۰ واحد در میلی‌لیتر آیزیم هیالورونیداز بود منتقل و به وسیله پی‌پت‌کردن ملایم، چند لایه بیرونی سلول‌های کومولوس اطراف تخمک به‌طور نسبی جدا شد. تخمک‌های با کیفیت خوب که دارای سیتوپلاسم یکنواخت و غشای سالم بودند انتخاب و به‌صورت تصادفی در گروه‌های آزمون و کنترل توزیع شدند.

گروه‌های مورد بررسی شامل یک گروه کنترل (غیرانجمادی) و چهار گروه انجمادی که براساس حضور یا عدم حضور کلسیم و/یا EGTA در محیط پایه طراحی شدند، بودند. گروه‌های انجمادی نیز شامل گروه آزمایشی ۱ (فسفات‌بافرسالین دارای کلسیم به علاوه ۲۰٪ FBS)، گروه آزمایشی ۲ (فسفات‌بافرسالین بدون کلسیم به علاوه ۲۰٪ FBS)، گروه آزمایشی ۳ (فسفات‌بافرسالین دارای کلسیم به علاوه ۲۰٪ FBS درحضور اتیلن‌گلیکول‌تترا استیک‌اسید/EGTA) و گروه آزمایشی ۴ (فسفات‌بافرسالین بدون کلسیم به علاوه ۲۰٪ FBS در حضور اتیلن‌گلیکول‌تترا استیک‌اسید/EGTA) بودند.

به‌منظور انجماد شیشه‌ای تخمک‌ها، ابتدا در کف یک پتری‌دیش استریل، قطرات ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتری محیط پایه (براساس گروه آزمایشی مورد نظر)، محلول تعادلی (محیط پایه به همراه ۲۰٪ FBS، ۷/۵٪ DMSO، ۷/۵٪ اتیلن‌گلیکول) و محلول انجمادی (محیط پایه به همراه ۲۰٪ FBS، ۱۵٪ DMSO، ۱۵٪ اتیلن‌گلیکول و ۵/۵ مول‌برلیتر ترهالوز) قرار داده شد. ۵ تا ۷ عدد تخمک توسط پی‌پت پاستور نازک به قطره محیط پایه منتقل و به مدت یک دقیقه انکوبه شد. سپس تخمک‌ها در قطرات محلول تعادلی شست‌وشو و پس از گذشت ۳ دقیقه، به محلول انجمادی منتقل شدند. سپس با کمک پی‌پت دهانی به سطح کرایوتاپ منتقل شدند و کرایوتاپ به‌سرعت در نیتروژن مایع غوطه‌ور شد. به‌منظور به‌حداقل رساندن آسیب ناشی از غلظت بالای محلول انجمادی، کل فرآیند ورود تخمک به محلول انجمادی تا غوطه‌ورسازی در نیتروژن مایع در مدت زمانی کمتر از یک دقیقه و تمامی مراحل فرآیند انجماد در دمای محیط (۲۳ تا 25°C) انجام شد.

برای انجام فرآیند ذوب، کرایوتاپ حاوی تخمک‌های منجمدشده، پس از خارج کردن از تانک نیتروژن مایع، بلافاصله از ناحیه نوک آن در قطرات ۳۰۰ میکرولیتری محیط پایه با غلظت یک‌مول در لیتر ترهالوز در دمای 38°C قرار گرفت و با حرکت آرام سر کرایوتاپ در این محلول، تخمک‌ها وارد محیط ذوب شدند. پس از یک دقیقه، تخمک‌ها به‌منظور انجام فرآیند آبدی و کاهش فشار اسمزی اعمال‌شده از طرف محلول، به‌صورت متوالی به غلظت‌های

است [9, 16]. با این حال تاکنون استفاده همزمان از محیط پایه بدون کلسیم و اتیلن‌گلیکول‌تترا استیک‌اسید (EGTA) به‌عنوان چیلاتور یون کلسیم در محلول انجمادی تخمک مورد ارزیابی قرار نگرفته است. اتیلن‌گلیکول‌تترا استیک‌اسید یک چیلاتور اختصاصی یون کلسیم است که به‌دلیل شباهت ساختاری زیادی که به اتیلن‌گلیکول دارد، به نظر می‌رسد جایگزین مناسبی برای سایر چیلاتورها باشد و بتواند از طریق کاهش غلظت کلسیم درون سلولی، اثرات افزایش ناگهانی کلسیم درون سلول در زمان انجماد را به حداقل برساند. هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر کاهش کلسیم محیط انجماد با استفاده از محیط پایه بدون کلسیم و افزودن EGTA، بر میزان لقاح و تکوین جنین‌های حاصل از تخمک منجمد-ذوب‌شده گوسفندی است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی از شرکت سیگما (ایالات متحده) و محیط‌های کشت از شرکت USA GIBCO (ایالات متحده) خریداری شدند. تخمدان‌های گوسفند بلافاصله پس از کشتار در کشتارگاه محلی اصفهان از بدن دام جدا شدند و در محلول نمکی نرمال (۹۰٪ کلریدسديم) حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین و استرپتومایسین؛ ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر) در مدت کمتر از ۲ ساعت پس از کشتار به آزمایشگاه منتقل می‌شدند. در آزمایشگاه پس از حذف بافت‌های اضافی و شست‌وشو، تخمدان‌های مناسب برای جمع‌آوری تخمک انتخاب شدند. تمام فولیکول‌های سطحی و غیرخونی با قطر ۲ تا ۸ میلی‌متر با استفاده از سوزن ۲۱ متصل به پمپ خلا (با فشار ۸۰ میلی‌متر جیوه) آسپیره و در لوله‌های ته‌مخروطی ۱۵ میلی‌لیتری حاوی محیط آسپیراسیونی که از قبل گرم شده بود جمع‌آوری شد. محیط آسپیراسیون شامل HEPES-TCM حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر هپارین بود. پس از اتمام آسپیراسیون، محتویات ته‌نشین شدند و بخش پایینی لوله حاوی محتویات فولیکولی با استفاده از پی‌پت بلند به سطح درب پتری‌دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری منتقل شد. سپس در زیر استریومیکروسکوپ مجهز به صفحه گرم 38°C و با استفاده از پی‌پت دهانی، مجموعه‌های تخمک-سلول‌های کومولوس که دارای کیفیت مناسب بودند (داشتن حداقل سه لایه سلول کومولوس و تخمک با سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت) جدا و به قطرات محیط شست‌وشو (HTCM حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو) منتقل شدند.

به‌منظور ارزیابی بلوغ آزمایشگاهی تخمک، پس از شست‌وشوی کامل، مجموعه‌های تخمک-کومولوس به قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط بلوغ آزمایشگاهی (محیط کشت TCM199 حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو، ۲/۵ میلی‌مولار سدیم-پیرووات، ۱ میلی‌مولار آل-گلوتامین، ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هورمون‌های FSH و LH، یک میکروگرم در میلی‌لیتر بتا-استرادیول و ۱/۸ میلی‌مولار

کاهشی ترهالوز (به ترتیب ۵/۰، ۲۵/۰ و ۱۲۵/۰ مول در لیتر) منتقل شدند و در هر یک به مدت ۳ دقیقه قرار گرفتند. تخمک‌ها پس از طی مراحل آبدی در محیط پایه به‌طور کامل شسته و پس از ۵ دقیقه به پتری‌دیش حاوی محیط لقاح منتقل شدند. دیش مربوطه به مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت قبل از لقاح در انکوباتور با دمای $38/5^{\circ}\text{C}$ و ۵٪ CO_2 و حداکثر رطوبت انکوبه شد [15, 17].

حدود ۱/۵ تا ۲ ساعت پس از انکوباسیون، تخمک‌های منجمد-ذوب‌شده متعلق به هر یک از گروه‌های آزمایشی براساس فاکتورهای زنده‌مانی شامل شکل طبیعی کروی، سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت، زوناپلوسیدا و غشای پلاسمایی سالم، بررسی شدند و تخمک‌های زنده مورد لقاح آزمایشگاهی قرار گرفتند. همچنین تخمک‌های غیرمنجمد به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

میزان لقاح و تشکیل پیش‌هسته‌ها، همچنین تشکیل جنین تا مرحله بلاستوسیست مورد ارزیابی قرار گرفت. اسپرم مورد نیاز برای تلقیح تخمک با استفاده از واژن مصنوعی از قوچ نگهداری‌شده در مزرعه حیوانات پژوهشکده زیست‌فناوری رویان واقع در اصفهان جمع‌آوری شد. بلافاصله پس از جمع‌آوری سیمن و انتقال آن به آزمایشگاه، اسپرم مورد نظر از لحاظ زنده‌مانی، تعداد و حرکت پیش‌رونده بررسی و اسپرم‌های مورد نظر برای ظرفیت‌پذیری به محیط مناسب (swim up) منتقل و به مدت ۴۵ دقیقه در شرایط $38/5^{\circ}\text{C}$ و ۵٪ CO_2 و رطوبت حداکثر انکوبه شد. پس از شمارش کلی تعداد اسپرم‌ها و رقیق‌سازی سیمن، غلظت اسپرم در هر میلی‌لیتر تعیین شد. سپس سیمن آماده‌سازی‌شده (بر مبنای محاسبه دو میلیون اسپرم به ازای یک میلی‌لیتر محیط لقاح) به تخمک‌های موجود در محیط لقاح اضافه شد.

حدود ۱۸ ساعت پس از لقاح، سلول‌های کومولوس و اسپرم‌های چسبیده به تخمک که در این مرحله، جنین فرضی خوانده می‌شوند به‌طور کامل جدا شدند. سپس به‌منظور ارزیابی میزان لقاح، ۲۵ تا ۳۰ عدد از جنین‌های فرضی هر گروه آزمایشی (انجمادی) و نیز گروه کنترل (غیرانجمادی) در محلول پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط فیکس شدند و پس از سه بار شست‌وشوی کامل در محلول PBS/PVA، به قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محلول PBS/PVA حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ هوخست (Hoechst 33342) به مدت ۱۰ دقیقه منتقل شدند. زیگوت‌های فرضی رنگ‌آمیزی‌شده پس از شست‌وشوی کامل در محلول PBS/PVA، بر روی لام تمیز، با استفاده از لامل و محلول مخصوص، قرار گرفتند و برای مشاهده توسط میکروسکوپ فلورسنت به اتاق تاریک منتقل شدند. تقسیم‌بندی زیگوت‌های فرضی براساس وقوع لقاح به‌صورت تخمک‌های لقاح‌یافته (آنهایی که دارای یک سر غیرمتراکم اسپرم و یا دو پیش‌هسته نر و ماده در سیتوپلاسم خود بودند) و تخمک‌های تلقیح‌نشده (آنهایی که هیچ علامتی از نفوذ اسپرم نداشتند) بود.

توانایی تکوین تخمک‌های لقاح‌یافته براساس میزان جنین‌های تسهیم‌شده در روز سوم و پنجم پس از لقاح ارزیابی شد. محیط کشت جنین‌ها هر ۴۸ ساعت یک‌بار تعویض و با محیط جدید جایگزین می‌شد. جنین‌های مرده در زمان ارزیابی از قطرات کشت حذف و جنین‌های زنده تا روز هشتم پس از لقاح در محیط جدید و شرایط انکوباتور مذکور کشت شدند. میزان تشکیل بلاستوسیست نیز در روزهای ششم، هفتم و هشتم پس از لقاح ارزیابی شد. نحوه گزارش‌دهی میزان رشد و توان تکوین جنین‌ها در شرایط آزمایشگاهی به شرح زیر بود:

درصد تقسیمات سلولی (درصد تسهیم): نسبت تعداد جنین‌های تقسیم‌شده به کل تخمک‌های تلقیح‌شده (به‌جز جنین‌های دژنره) درصد بلاستوسیست: نسبت تعداد بلاستوسیست‌های به‌دست‌آمده در روز ششم تا هشتم پس از لقاح به کل تخمک‌های تلقیح‌شده برای بررسی تعداد سلول‌های بلاستوسیست‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی تخمک‌های منجمد-ذوب‌شده، از روش رنگ‌آمیزی افتراقی براساس دستورالعمل مورد استفاده در مطالعات قبلی استفاده شد [18]. به این منظور تعدادی از بلاستوسیست‌های روز هشتم که به‌طور کامل از لایه زونای اطراف خارج شده بودند پس از شست‌وشو در محلول H-TCM حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سرم BSA، به محلول ۵٪ تریتون ایکس-۱۰۰ منتقل و پس از ۳۰ ثانیه در محلول ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ پروپیدیومیدید (PI) قرار گرفتند. بلاستوسیست‌ها پس از ۳۰ ثانیه به محلول اتانول سرد حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ هوخست منتقل شدند. پس از حدود ۱۵ دقیقه، بلاستوسیست‌های رنگ‌آمیزی‌شده در محلول H-TCM حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سرم BSA، کاملاً شسته و پس از پوشیده‌شدن با لام برای مشاهده توسط میکروسکوپ فلورسنت به اتاق تاریک منتقل شدند. سپس تعداد سلول‌های تروفوکتودرم و توده سلولی داخلی شمارش و نسبت توده سلولی داخلی به کل سلول‌های بلاستوسیست و همچنین به تروفوکتودرم محاسبه شد. این روش ارزیابی در سه تکرار انجام شد و هر تکرار شامل ۱۰ تا ۱۵ بلاستوسیست برای هر گروه (کنترل و گروه‌های انجمادی) بود.

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه انجام شد. میانگین داده‌ها بین گروه‌های مورد مطالعه به‌وسیله آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفت و به‌صورت میانگین آماری بیان شد. برای تمامی گروه‌های آزمایشی و کنترل، حداقل سه تکرار انجام و سطح معنی‌داری برابر ۵/۰٪ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان زنده‌مانی تخمک در گروه‌های مختلف انجمادی، اختلاف آماری معنی‌داری نداشت، ولی انجماد در محیط پایه حاوی کلسیم، سبب کاهش معنی‌دار میزان لقاح، هم در حضور $(44/21 \pm 1/18)$ و هم در عدم حضور EGTA $(40/67 \pm 0/88)$ نسبت

($48/60 \pm 2/87$) به ترتیب، جنین روز سوم و روز پنجم بود. از لحاظ تشکیل بلاستوسیست نیز به‌طور کلی گروه‌های انجمادی درصد پایین‌تری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($p < 0/05$; جدول ۲)، هرچند درصد بلاستوسیست در گروه چهارم نسبت به سایر گروه‌های انجمادی افزایش یافت اما این اختلاف، از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

محاسبه میانگین نسبت توده سلولی داخلی به سلول‌های تروفوبلاست (تروفوکتودرم) و به کل سلول‌های تشکیل‌دهنده بلاستوسیست، نشان داد که بین گروه‌های انجمادی و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۳ و نمودار ۱). شکل ۲ تصویر بلاستوسیست رنگ‌آمیزی‌شده با روش افتراقی را نشان می‌دهد.

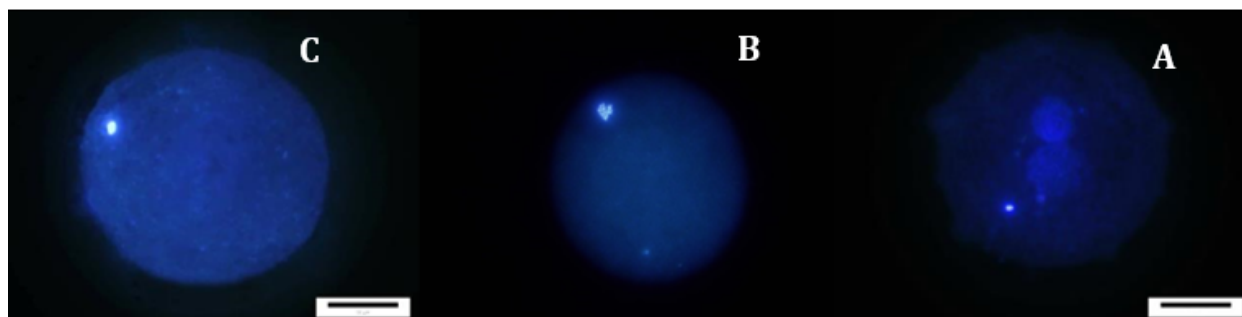
به گروه غیرانجمادی ($72/26 \pm 0/52$) شد. البته میزان لقاح پس از حذف کلسیم خارج سلولی، یعنی در گروه‌های فاقد چیلاتور ($77/77 \pm 0/67$) و دارای چیلاتور ($78/81 \pm 0/50$) به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌های انجمادی بود ($p < 0/05$; جدول ۱). شکل ۱ وضعیت‌های مختلف زیگوت فرضی در رنگ‌آمیزی هسته را نشان می‌دهد.

میزان تکوین جنین در همه گروه‌های انجمادی به‌جز گروه حاوی چیلاتور و فاقد کلسیم (گروه ۴) به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه غیرانجمادی (کنترل) بود. به عبارتی افزودن چیلاتور EGTA به محیط پایه فاقد کلسیم، میزان تسهیم جنین روز سوم ($60/53 \pm 1/38$) و روز پنجم ($46/21 \pm 2/80$) را نسبت به سایر گروه‌های انجمادی به‌طور معنی‌داری افزایش داد که معادل گروه کنترل ($68/71 \pm 0/80$) و کلسیم خارج سلولی (+) و EGTA

جدول ۱) مقایسه لقاح تخمک‌های منجمد- ذوب‌شده در گروه‌های مختلف آزمایشی در محیط پایه با یا بدون کلسیم

گروه	تعداد تخمک تلقیح‌شده	تعداد تخمک لقاح‌یافته	تعداد تخمک لقاح‌نیافته	میزان لقاح (درصد)
غیرانجمادی (کنترل)	۸۳	$70 (72/26 \pm 0/52)^a$	$13 (27/70 \pm 0/69)^b$	
کلسیم خارج سلولی (+)	۸۶	$35 (40/67 \pm 0/88)^b$	$51 (59/31 \pm 0/70)^a$	
کلسیم خارج سلولی (-)	۹۰	$61 (67/77 \pm 0/67)^a$	$29 (32/22 \pm 0/87)^b$	
کلسیم خارج سلولی (+) و EGTA	۹۵	$42 (44/21 \pm 1/18)^b$	$53 (55/76 \pm 0/76)^a$	
کلسیم خارج سلولی (-) و EGTA	۹۳	$64 (68/81 \pm 0/50)^a$	$29 (31/18 \pm 0/84)^b$	

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است ($p < 0/05$).



شکل ۱) وضعیت مختلف پیش‌هسته‌های نر و ماده در رنگ‌آمیزی هوخست هسته زیگوت فرضی: A: تخمک لقاح‌یافته دارای پیش‌هسته نر و ماده (پرونوکلئوس، PN); B: تخمک لقاح‌یافته دارای سر غیرمتراکم اسپرم; C: تخمک لقاح‌نیافته

جدول ۲) مقایسه میزان تکوین جنین‌های حاصل از تخمک‌های منجمد- ذوب‌شده در محیط پایه با یا بدون کلسیم

گروه	تعداد تخمک منجمدشده	تعداد تخمک زنده و تلقیح‌شده (درصد)	تسهیم (درصد): نسبت به تخمک تلقیح‌شده	تسهیم (درصد): نسبت به تخمک تلقیح‌شده	بلاستوسیست (درصد): نسبت به تخمک تلقیح‌شده
غیرانجمادی (کنترل)	۱۶۰	$160 (100 \pm 0/00)^a$	$110 (68/71 \pm 0/80)^a$	$78 (48/60 \pm 2/87)^a$	$72 (45/05 \pm 0/77)^a$
کلسیم خارج سلولی (+)	۱۴۰	$129 (92/14 \pm 1/49)^b$	$70 (50/10 \pm 1/11)^b$	$52 (37/13 \pm 2/63)^b$	$42 (30/17 \pm 1/11)^{bc}$
کلسیم خارج سلولی (-)	۱۴۵	$133 (91/72 \pm 1/68)^b$	$70 (50/10 \pm 1/11)^b$	$50 (34/91 \pm 1/03)^b$	$43 (29/60 \pm 3/32)^{bc}$
کلسیم خارج سلولی (+) و EGTA	۱۵۶	$144 (92/30 \pm 2/76)^b$	$78 (50/10 \pm 1/11)^b$	$50 (30/24 \pm 1/67)^b$	$44 (28/18 \pm 0/88)^c$
کلسیم خارج سلولی (-) و EGTA	۱۴۵	$134 (92/41 \pm 2/36)^b$	$90 (60/53 \pm 1/38)^a$	$67 (46/21 \pm 2/80)^a$	$49 (33/23 \pm 3/54)^b$

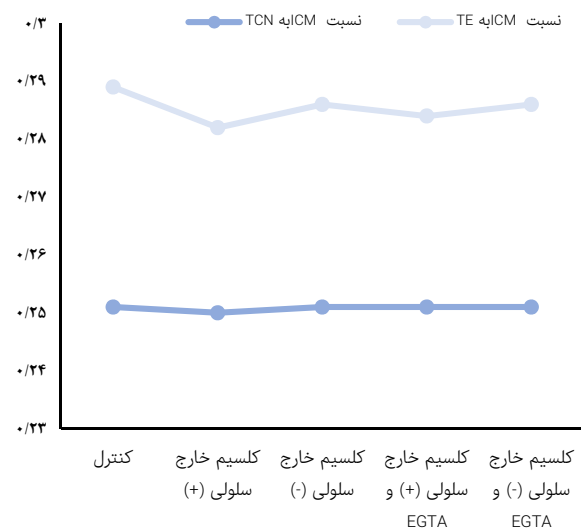
حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است ($p < 0/05$)

جدول ۳) مقایسه میانگین نسبی تعداد سلول‌های توده سلولی داخلی به تروفوکتودرم و کل سلول‌های تشکیل‌دهنده بلاستوسپست حاصل از تکوین تخمک منجمد-ذوب‌شده در محیط پایه با یا بدون کلسیم

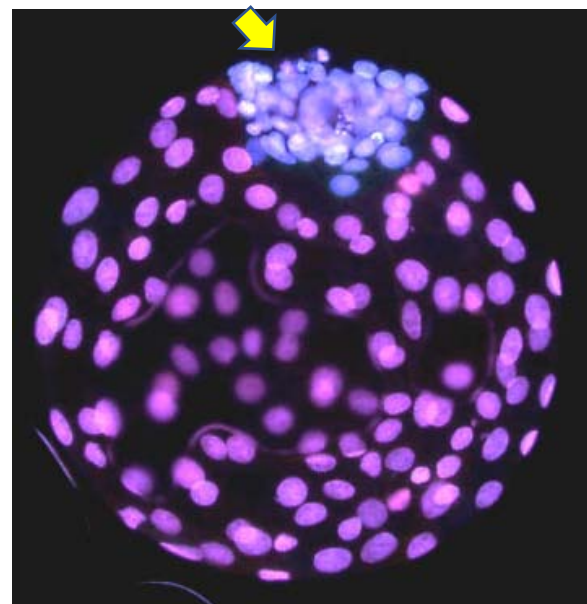
گروه	تعداد بلاستوسپست		شمارش سلولی پس از رنگ‌آمیزی افتراقی بلاستوسپست	
	مورد ارزیابی برای هر روش	نسبت توده سلولی داخلی به تروفوکتودرم	نسبت توده سلولی داخلی به کل سلول‌های تشکیل‌دهنده بلاستوسپست	نسبت توده سلولی داخلی به کل سلول‌های تشکیل‌دهنده بلاستوسپست
غیرانجمادی (کنترل)	۴۲	۱/۰±۸۳/۲۹	۱/۰±۴۲/۲۵	
کلسیم خارج سلولی (+)	۳۹	۲/۰±۰۶/۲۸	۱/۰±۲۴/۲۵	
کلسیم خارج سلولی (-)	۳۵	۲/۰±۶۶/۲۹	۱/۰±۵۸/۲۵	
کلسیم خارج سلولی (+) و EGTA	۳۷	۲/۰±۰۸/۲۸	۱/۰±۵۴/۲۵	
کلسیم خارج سلولی (-) و EGTA	۴۰	۱/۰±۴۹/۲۹	۱/۰±۳۹/۲۵	

بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>0.05$)

چ



نمودار ۱) مقایسه میانگین نسبی تعداد سلول‌های توده سلولی داخلی به تروفوکتودرم و کل سلول‌های تشکیل‌دهنده بلاستوسپست حاصل از تکوین تخمک منجمد-ذوب‌شده در محیط پایه با یا بدون کلسیم



شکل ۲) تصویر بلاستوسپست رنگ‌آمیزی‌شده با روش افتراقی؛ پیکان نشان‌دهنده موقعیت توده سلولی داخلی است (Scale bar برابر ۱۰۰ میکرومتر).

بحث

انجماد تخمک بالغ به‌ویژه در گونه‌های مزرعه‌ای همواره موضوعی چالش‌برانگیز و مورد بحث بوده است. ویژگی‌های خاص و آسیب‌پذیری بالای تخمک به فرآیند انجماد سبب بروز مشکلاتی از لحاظ نتایج زنده‌مانی، کیفیت و توانایی تکوین این سلول شده است. در این زمینه مطالعات متعددی بیانگر اثرات منفی انجماد شیشه‌ای بر ساختار و عملکرد تخمک پستانداران بوده است. فشار اسمزی و سمیت ناشی از غلظت بالای ضدیخ‌ها می‌تواند عواقبی مانند سخت‌شدن زوناپلوسید [19, 20]، اختلال در سیتواسکلت [21]، آسیب دوک تقسیم و دپلمریز شدن میکروتوبول‌های تشکیل‌دهنده دوک [19, 23, 24]، اختلالات کروموزومی [25]، تغییر در الگوی توزیع میتوکندری تخمک [26-28] و همچنین افزایش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) [29, 30] داشته باشد که در نهایت ممکن است منجر به کاهش میزان تکوین تخمک پس از انجماد شود [31]. علاوه بر ویژگی‌های مذکور، تخمک حیوانات مزرعه‌ای مانند گاو، گوسفند و بز به‌دلیل داشتن مقادیر بالای چربی در برابر فرآیند انجماد بسیار آسیب‌پذیر است و لازم است تا در این زمینه مطالعات بیشتری انجام شود [32, 33]. این واقعیات منجر به ایجاد تلاش‌های گسترده‌ای در جهت بهبود دستورالعمل انجماد شیشه‌ای تخمک شده است [34, 35]. در مطالعه حاضر، کاهش کلسیم خارج سلولی (استفاده از محیط پایه بدون کلسیم) سبب افزایش درصد لقاح و تکوین تخمک پس از انجماد شده است. به عبارتی حضور کلسیم در محیط انجمادی، میزان لقاح و همچنین توانایی تکوین تخمک را کاهش می‌دهد. این یافته با مطالعه ویساک و همکاران [36] مطابقت دارد که در آن، استفاده از محلول انجمادی دارای کلسیم سبب افزایش سخت‌شدن زوناپلوسید و کاهش تکوین جنین حاصل از تخمک منجمد ذوب‌شده گاو شده است [20]. یک توضیح برای این یافته مطالعه حاضر شاید این باشد که کم‌کردن کلسیم موجود در محیط انجمادی می‌تواند تا حدودی عواقب ناشی از افزایش کلسیم داخل سلولی مانند پدیده سخت‌شدن زوناپلوسیدی تخمک و متعاقب آن کاهش نفوذ اسپرم را به حداقل برساند. از طرفی مطالعه حاضر بیانگر این نکته است که حذف کلسیم خارج سلولی به‌تنهایی نمی‌تواند در حفظ کیفیت و

این دو، محیط پایه حاوی کلسیم خارج سلولی نیز مورد ارزیابی قرار داده شد که از این لحاظ با مطالعه و/تگ و همکاران متفاوت بود. بررسی کیفیت بلاستوسیست‌های حاصل از تخمک‌های انجمادی در این مطالعه می‌تواند بیانگر آسیب‌زایی بودن دستورالعمل انجمادی چه در هنگام حذف یا عدم حذف کلسیم باشد چون از لحاظ شمارش سلولی و وقوع آپوپتوز تفاوتی بین گروه‌های انجمادی و گروه کنترل وجود نداشت.

یکی از دلایل توجیه‌کننده کاهش میزان لقاح و تکوین تخمک پس از انجماد، تأثیری است که غلظت بالای ضدیخ‌های مورد استفاده در انجماد شیشه‌ای بر میزان کلسیم داخل سلولی می‌گذارد. بر این اساس تلاش‌های گسترده‌ای در جهت کاهش کلسیم محیط انجمادی و با هدف بهبود نتایج لقاح و تکوین تخمک گونه‌هایی مانند گوسفند و موش انجام شده است^[9, 15]. البته اهمیت کلسیم تنها محدود به پدیده سخت‌شدن زوناپلوسیدا نمی‌شود، چراکه یون کلسیم به‌عنوان یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های مسیریهای پیام‌رسانی سلول، نقش عمده‌ای در بسیاری از پدیده‌های مربوط به بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای تخمک نیز ایفا می‌کند. اهمیت کلسیم در توزیع سیتوپلاسمی میتوکندری و فرآیند پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌های تشکیل‌دهنده دوک تقسیم تخمک نیز اثبات شده است^[36, 37].

نتیجه‌گیری

کاهش و یا حذف کلسیم محیط انجمادی که به واسطه افزودن اتیلن‌گلیکول‌تتراستیک‌اسید رخ می‌دهد به شکل قابل توجهی سبب بهبود نتایج لقاح تخمک پس از انجماد می‌شود. از سوی دیگر اثرات مثبت این حذف‌کننده کلسیم بر توانایی تکوین جنین، در صورت استفاده از محیط کشت فاقد کلسیم در محلول انجمادی به‌وضوح دیده می‌شود. این موضوع بیانگر نقش و اهمیت منابع خارج و داخل سلولی کلسیم در موفقیت یا عدم موفقیت فرآیند انجماد تخمک است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از پژوهشگاه رویان برای تامین هزینه‌های پروژه و پژوهشکده علوم تولیدمثل و پژوهشکده زیست‌فناوری (اصفهان) پژوهشگاه رویان، به‌دلیل فراهم‌کردن امکانات لازم برای انجام این مطالعه ابراز می‌دارند. همچنین نویسندگان از آقای/حد علیزاده برای انجام آزمون‌های آماری این مطالعه سپاسگزار هستند.

تأییدیه اخلاقی: تمامی روش‌های اجرای مطالعه حاضر پس از تصویب کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی و براساس قوانین حاکم بر کار با حیوانات در گروه جنین‌شناسی پژوهشگاه رویان تهران و پژوهشکده زیست‌فناوری رویان در اصفهان انجام شدند.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: بتول صناعی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ بهار موقر (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۱۵٪)؛ مجتبی رضازاده ولجودی (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۱۰٪)؛

توانایی تکوین تخمک پس از انجماد موثر باشد، چون درصد تکوین جنین فقط در گروهی که علاوه بر محیط پایه بدون کلسیم از چیلاتور EGTA استفاده شده است، بهبود نشان می‌دهد. بنابراین یک فرضیه می‌تواند این باشد که کاهش توانایی تکوین مشاهده‌شده در گروه‌هایی که در غیاب چیلاتور منجمد شده‌اند، به دلیل افزایش رهاسدن کلسیم از منابع داخل سلولی است. از این رو می‌توان گفت که حفظ توانایی تکوین تخمک پس از انجماد، ارتباط مستقیم و تنگاتنگی با تنظیم کلسیم بیرون و درون سلولی دارد. یافته‌های قبلی نیز بیانگر افزایش کلسیم داخل سلولی تحت تأثیر ضدیخ‌های رایج مانند اتیلن‌گلیکول و دی‌متیل‌سولفوکساید، سخت‌شدن زوناپلوسیدا و در نتیجه کاهش میزان لقاح در تخمک موش و گاو بوده‌اند^[9, 20]. براساس این یافته‌ها، به نظر می‌آید که دی‌متیل‌سولفوکساید سبب رهاسازی کلسیم از منابع داخل سلولی مانند شبکه آندوپلاسمی، در حالی که اتیلن‌گلیکول باعث ورود کلسیم از محیط خارج سلول به درون آن می‌شود^[9]. از این رو در مطالعه حاضر، برای اینکه از ورود بیش از حد کلسیم به داخل تخمک ممانعت شود و از طرفی کلسیم آزادشده از منابع داخل سلولی به حداقل برسد، دو راهکار کلی اتخاذ شد. به این ترتیب که برای کاهش و یا حذف کلسیم خارج سلولی، از محیط پایه انجمادی بدون کلسیم استفاده شد و برای کاهش و یا حذف کلسیم داخل سلولی، چیلاتور یون کلسیم (EGTA) به محیط پایه اضافه شد و کارایی این پروتکل انجمادی بر میزان لقاح تخمک و توانایی تکوین آن مورد ارزیابی قرار گرفت. یکی از نکات قابل توجه در نتایج این مطالعه، تفاوت درصد لقاح و تکوین تخمک در گروه‌های فاقد کلسیم خارج سلولی (محیط پایه بدون کلسیم) است که نشان می‌دهد حذف کلسیم خارج سلولی اگرچه توانسته است میزان سخت‌شدن زوناپلوسیدا را کاهش و در نتیجه، لقاح را افزایش دهد، ولی تخمک‌هایی که در غیاب چیلاتور منجمد شده‌اند به نوعی دچار تاخیر در مراحل تسهیم شده‌اند و توانایی تکوین آنها کاهش یافته است. برخلاف یافته مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای نشان دادند که توانایی تکوین تخمک گوسفندی پس از کاهش کلسیم خارج سلولی افزایش می‌یابد^[15]. نکته قابل توجه این است که درصد تشکیل بلاستوسیست پس از حذف کلسیم خارج سلولی در مطالعه حاضر (۳۱٪) نسبت به مطالعه مذکور (۱۰٪) بالاتر بود، هرچند حذف کلسیم خارج سلولی به‌تنهایی نتوانست اثرات منفی انجماد شیشه‌ای بر تخمک را کاهش دهد. شاید بتوان علت این اختلاف را به تفاوت در دستورالعمل انجمادی، مانند استفاده از ترهالوز به جای ساکارز در مطالعه حاضر نسبت داد. مطالعه حاضر، یافته‌های و/تگ و همکاران را تأیید می‌کند که نشان داده است افزودن چیلاتور BAPTA به محیط انجمادی سبب بهبود نتایج تکوین تخمک منجمد-ذوب‌شده گاوی می‌شود^[16]، اگرچه از لحاظ نوع چیلاتور و گونه مورد نظر تفاوت‌هایی وجود دارد. همچنین در این مطالعه برای پی‌بردن به اهمیت نقش کلسیم داخل و خارج سلولی و تأثیر افزایش مقادیر

- 14- Tahara MA, Tasaka KE, Masumoto NO, Mammoto AK, Ikebuchi YO, Miyake AK. Dynamics of cortical granule exocytosis at fertilization in living mouse eggs. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1996;270(5):C1354-61.
- 15- Succu S, Berlinguer F, Leoni GG, Bebbere D, Satta V, Marco-Jimenez F, et al. Calcium concentration in vitrification medium affects the developmental competence of in vitro matured ovine oocytes. *Theriogenology*. 2011;75(4):715-21.
- 16- Wang N, Hao HS, Li CY, Zhao YH, Wang HY, Yan CL, et al. Calcium ion regulation by BAPTA-AM and ruthenium red improved the fertilisation capacity and developmental ability of vitrified bovine oocytes. *Sci Rep*. 2017;7(1):10652.
- 17- Succu S, Bebbere D, Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Leoni GG, et al. Vitrification of in vitro matured ovine oocytes affects in vitro pre-implantation development and mRNA abundance. *Mol Reprod Dev*. 2008;75(3):538-46.
- 18- Moulavi F, Hosseini SM, Hajian M, Forouzanfar M, Abedi P, Ostadhosseini S, et al. Nuclear transfer technique affects mRNA abundance, developmental competence and cell fate of the reconstituted sheep oocytes. *Reproduction*. 2013;145(4):345-55.
- 19- Mohsenzadeh M, Tabibnejad N, Vatanparast M, Anbari F, Khalili MA, Karimi-Zarchi M. Vitrification has detrimental effects on maturation, viability, and subcellular quality of oocytes post IVM in cancerous women: An experimental study. *Int J Reprod Biomed*. 2019;17(3):175-184.
- 20- Wiesak T, Wasielek M, Zlotkowska A, Milewski R. Effect of vitrification on the zona pellucida hardening and follistatin and cathepsin B genes expression and developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Cryobiology*. 2017;76:18-23.
- 21- Bogliolo L, Murrone O, Piccinini M, Ariu F, Ledda S, Tilocca S, et al. Evaluation of the impact of vitrification on the actin cytoskeleton of in vitro matured ovine oocytes by means of Raman microspectroscopy. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(2):185-93.
- 22- Kim SS, Olsen R, Kim DD, Albertini DF. The impact of vitrification on immature oocyte cell cycle and cytoskeletal integrity in a rat model. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(6):739-47.
- 23- Tamura AN, Huang TT, Marikawa Y. Impact of vitrification on the meiotic spindle and components of the microtubule-organizing center in mouse mature oocytes. *Biol Reprod*. 2013;89(5):112:1-10.
- 24- Liu MH, Zhou WH, Chu DP, Fu L, Sha W, Li Y. Ultrastructural changes and methylation of human oocytes vitrified at the germinal vesicle stage and matured in vitro after thawing. *Gynecol Obstet Investig*. 2017;82(3):252-61.
- 25- Liu M, Zhou W, Chu D, Fu L, Sha W, Liu S, et al. A modified vitrification method reduces spindle and chromosome abnormalities. *Syst Biol Reprod Med*. 2017;63(3):199-205.
- 26- Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, et al. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J Exp Med*. 2006;210(2):137-44.
- 27- Nazmara Z, Salehnia M, HosseinKhani S. Mitochondrial distribution and ATP content of vitrified, in vitro matured mouse oocytes. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2014;6(4):210-17.
- 28- Succu S, Gadau SD, Serra E, Zinellu A, Carru C, Porcu C, et al. A recovery time after warming restores

بی‌تا ابراهیمی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ مسعود بذرگر (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ مهدی حاجیان (نویسنده ششم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ فرنوش جعفرپور (نویسنده هفتم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ محمدحسین نصرآصفهانی (نویسنده هشتم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- Mara L, Casu S, Carta A, Dattena M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim Reprod Sci*. 2013;138(1-2):25-38.
- 2- Silva AR, Lima GL, Peixoto GC, Souza AL. Cryopreservation in mammalian conservation biology: Current applications and potential utility. *Res Rep Biodivers Stud*. 2015;4:1-8.
- 3- Hosseini SM, Asgari V, Ostadhosseini S, Hajian M, Ghanaei HR, Nasr-Esfahani MH. Developmental competence of ovine oocytes after vitrification: Differential effects of vitrification steps, embryo production methods, and parental origin of pronuclei. *Theriogenology*. 2015;83(3):366-76.
- 4- Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe M, Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*. 2007;67(1):64-72.
- 5- Bromfield JJ, Cotichio G, Hutt K, Sciajno R, Borini A, Albertini DF. Meiotic spindle dynamics in human oocytes following slow-cooling cryopreservation. *Hum Reprod*. 2009;24(9):2114-23.
- 6- Cotichio G, Bromfield JJ, Sciajno R, Gambardella A, Scaravelli G, Borini A, et al. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(Suppl 3):29-34.
- 7- Deng A, Wang WH. Assessment of aneuploidy formation in human blastocysts resulting from cryopreserved donor eggs. *Mol Cytogenet*. 2015;8(1):12.
- 8- Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Rosati I, Zedda MT, Leoni G, et al. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology*. 2007;68(8):1138-49.
- 9- Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction*. 2006;131(1):53-61.
- 10- Tian SJ, Yan CL, Yang HX, Zhou GB, Yang ZQ, Zhu SE. Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of in vitro matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. *Anim Reprod Sci*. 2007;101(3-4):365-71.
- 11- Kohaya N, Fujiwara K, Ito J, Kashiwazaki N. High developmental rates of mouse oocytes cryopreserved by an optimized vitrification protocol; The effects of cryoprotectants, calcium and cumulus cells. *Reprod Dev*. 2011;57(6):675-80.
- 12- Larman MG, Katz-Jaffe MG, Sheehan CB, Gardner DK. 1, 2-propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte physiology. *Hum Reprod*. 2007;22(1):250-9.
- 13- Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol*. 1992;149(1):80-9.

- efficacy of buffalo oocytes vitrification. *Glob Vet.* 2013;11(4):420-31.
- 34- Park KE, Kwon IK, Han MS, Niwa K. Effects of partial removal of cytoplasmic lipid on survival of vitrified germinal vesicle stage pig oocytes. *J Reprod Dev.* 2005;51(1):151-60.
- 35- Zeron Y, Tomczak M, Crowe J, Arav A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: Implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology.* 2002;45(2):143-52.
- 36- Yi M, Weaver D, Hajnóczy G. Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: A homeostatic circuit. *J Cell Biol.* 2004;167(4):661-72.
- 37- Vendrell FJ, Ten J, De Oliveira MN, Cano A, Tarin JJ. Effect of intracellular Ca²⁺ chelation with the acetoxymethyl ester-derived form of bis (o-Aminophenoxy) ethane-N, N, N, N', N'-Tetraacetic acid on meiotic division and chromosomal segregation in mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 1999;16(5):276-82.
- mitochondrial function and improves developmental competence of vitrified ovine oocytes. *Theriogenology.* 2018;110:18-26.
- 29- Gutnisky C, Morado S, Gadze T, Donato A, Alvarez G, Dalvit G, et al. Morphological, biochemical and functional studies to evaluate bovine oocyte vitrification. *Theriogenology.* 2020;143:18-26.
- 30- Chang H, Chen H, Zhang L, Wang Y, Xie X, Zhang Y, et al. Effect of oocyte vitrification on DNA damage in metaphase II oocytes and the resulting preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 2019;86(11):1603-14.
- 31- Sudiman J, Lee A, Ong KL, Yuan WZ, Jansen S, Temple-Smith P, et al. Tolerance of lamb and mouse oocytes to cryoprotectants during vitrification. *Zygote.* 2019;27(1):36-45.
- 32- Fu XW, Shi WQ, Zhang QJ, Zhao XM, Yan CL, Hou YP, et al. Positive effects of taxol pretreatment on morphology, distribution and ultrastructure of mitochondria and lipid droplets in vitrification of in vitro matured porcine oocytes. *Anim Reprod Sci.* 2009;115(1-4):158-68.
- 33- Mahmoud K, El-Sokary MM. Improvement of the