



Comparison of Survival Rate, Presence and Location of Meiotic Spindle after Vitrification of Mouse Oocytes between Open and Close Systems

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Heydari L.¹ MSc,
Agharahimi A.¹ PhD,
Anvari M.¹ PhD,
Halvaei I.^{*2} PhD

How to cite this article

Heydari L, Agharahimi A, Anvari M, Halvaei I. Comparison of Survival Rate, Presence and Location of Meiotic Spindle after Vitrification of Mouse Oocytes between Open and Close Systems. Pathobiology Research. 2020;23(2):101-107.

¹Research and Clinical Center for Infertility, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

²Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Gisha Bridge, Tehran, Iran.
Phone: +98 (21) 82884503
Fax: +98 (21) 82884880
ihalvaei@modares.ac.ir

Article History

Received: February 2, 2020

Accepted: July 21, 2020

ePublished: August 10, 2020

ABSTRACT

Aims The present study aims to compare the survival rate, reconstitution and dislocation of meiotic spindle of mouse oocyte vitrification between open and close systems.

Materials & Methods 131 matured oocytes (containing meiotic spindle) harvested from 6-8 week-old BALB/C and divided into two groups of open and close systems. After exposure of oocytes in vitrification media, oocytes were loaded on cryotop in open group and on Rapid-i in close group, and then vitrified. After warming, oocytes were incubated for 3 hours and evaluated for survival rate, presence and location of re-polymerized meiotic spindle by PolScope system.

Findings Survival rate was significantly higher in open system compared to close system (91.1% vs 68.6%, respectively). 81.3% and 51.2% of survived oocyte contained meiotic spindle in close and open system, respectively ($p < 0.05$). The percentage of nature location of meiotic spindle was more in close system, significantly.

Conclusion Survival rate in open system is more than close system, but close system can preserve meiotic spindle and nature location better than open system. Also, it seems that the evaluation of meiotic spindle is essential for vitrified oocytes by PolScope system.

Keywords Vitrification; Matured Oocyte; Open System; Close System; Meiotic Spindle

CITATION LINKS

[1] The use of antifreeze proteins in the cryopreservation ... [2] Highly efficient vitrification method for cryopreservation ... [3] Vitrification of human ... [4] Cryopreservation of embryos and oocytes in human ... [5] Spindle organization after cryopreservation of mouse ... [6] Development of in vitro matured bovine oocytes after ... [7] Birth following vitrification of a small number of ... [8] A critical appraisal of cryopreservation (slow ... [9] A high-tech closer look to evaluate the impact of ... [10] Open versus closed systems for vitrification ... [11] A review of the risk of contamination of semen ... [12] Clinical application of oocyte vitrification: A systematic ... [13] Prospective randomized comparison of human ... [14] Pre-clinical validation of a closed surface system ... [15] The effect of osmotic stress on the cell ... [16] Comparison of spindle and chromosome configuration in ... [17] Ultrastructural evaluation of human metaphase II oocytes ... [18] Morphological, biochemical and functional studies to evaluate ... [19] Excellent embryo quality obtained from vitrified ... [20] Appendix E: Rapid-i TM: Closed Vitrification Device ... [21] Survival and post-warming in vitro competence of human ... [22] Freezing of oocytes and its effect on the displacement ... [23] Oocyte zona pellucida and meiotic spindle birefringence ... [24] Is vitrification standard method of ... [25] Closed vitrification of human oocytes and ... [26] Oocyte vitrification: A comparative analysis between fresh ... [27] Vitrification of in vitro matured oocytes diminishes ... [28] Freeze-all, oocyte vitrification, or fresh embryo transfer ... [29] Effect of oocyte vitrification on embryo quality: Time ... [30] Open versus closed oocyte vitrification in an ... [31] Relationship between meiotic spindles visualization ... [32] Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human ... [33] Influence of vitrification on mouse metaphase II oocyte ... [34] Transient cooling to room temperature can cause ... [35] Does human oocyte cryopreservation effect equally ... [36] Vitrification of In vitro-matured Oocytes: Effects of ... [37] Effect of different cryopreservation protocols on the ... [38] Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme ... [39] Impact of vitrification on the meiotic spindle and ...

مقایسه زنده‌مانی، حضور و موقعیت دوک میوزی بین سیستم‌های باز و بسته پس از انجماد شیشه‌ای در تخمک‌های موشی

لیلا حیدری MSc

مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

اعظم آقارحیمی PhD

مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

مرتضی انوری PhD

مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

ایمان حلوایی* PhD

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

چکیده

اهداف: هدف مطالعه حاضر، مقایسه انجماد شیشه‌ای تخمک‌های بالغ موشی از نظر درصد زنده‌مانی، تشکیل مجدد دوک تقسیم میوزی و جابه‌جایی آن بین سیستم‌های باز و بسته است.

مواد و روش‌ها: ۱۳۱ تخمک بالغ از موش‌های ۶-۸ هفته نژاد BALB/C که حاوی دوک میوزی بودند در دو گروه سیستم باز و بسته انجماد شیشه‌ای تقسیم‌بندی شدند. پس از در معرض قرارگیری تخمک‌ها در محیط‌های انجماد، در گروه باز بر روی کرایوتاپ و در سیستم بسته بر روی Rapid-i قرار گرفتند و منجمد شدند. بعد از عمل ذوب، تخمک‌ها به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. میزان زنده‌مانی، حضور و محل تشکیل مجدد دوک با استفاده از میکروسکوپ پلی‌سکوپ بررسی شد.

یافته‌ها: میزان زنده‌مانی در گروه سیستم باز به‌طور معنی‌داری بالاتر از سیستم بسته بود (به ترتیب ۹۱/۱٪ در مقابل ۶۸/۶٪). در سیستم بسته و باز به ترتیب ۸۱/۳٪ و ۵۱/۲٪ تخمک‌های زنده‌مانده حاوی دوک میوزی بودند ($p < 0.05$). همچنین درصد جایگاه طبیعی دوک تقسیم میوزی در گروه بسته به‌طور معنی‌داری بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: اگرچه زنده‌مانی در گروه سیستم باز بیشتر از سیستم بسته است، اما سیستم بسته قادر به حفظ بهتر دوک‌های میوزی و حفظ جایگاه طبیعی آن است. همچنین استفاده از میکروسکوپ پلی‌سکوپ برای بررسی دوک‌های میوزی در تخمک‌های منجمد شده ضروری به نظر می‌رسد.

کلیدواژه‌ها: انجماد شیشه‌ای، تخمک بالغ، سیستم باز، سیستم بسته، دوک تقسیم میوزی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۳۱

*نویسنده مسئول: ihalvaei@modares.ac.ir

مقدمه

انجماد تخمک یک ابزار ارزشمند در تکنیک‌های کمک‌باروری محسوب می‌شود^[1]. از این روش به‌منظور حفظ باروری در زنان جوان در برابر انواع داروهای شیمی‌درمانی و پرتودرمانی، افزایش سن، تعویق در فرزنددارشدن^[2] و ابتلا به نارسایی زودرس تخمدان استفاده می‌شود^[3]. این روش برای افرادی که همسرانشان قادر به

دادن نمونه اسپرم در روز برداشت تخمک نیستند و یا حتی در مواقعی که پس از نمونه‌برداری از بیضه، اسپرمی یافت نمی‌شود بسیار کارآمد است^[4]. در برخی کشورها انجماد جنین از لحاظ اخلاقی و یا قانونی با مشکلاتی روبه‌رو است که با روش انجماد تخمک می‌توان بر این مشکلات غلبه کرد^[4].

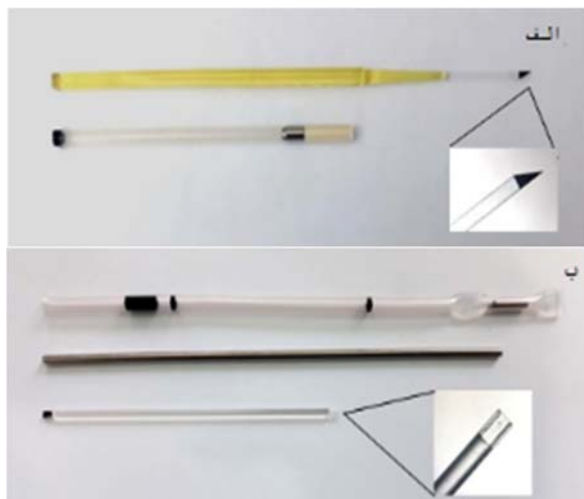
تکنیک انجماد تخمک از سال ۱۹۸۰ آغاز شد^[5]. هامانو و همکاران گزارشی مبنی بر انتقال جنین‌های حاصل از انجماد تخمک‌های IVF خوک با روش انجماد شیشه‌ای ارائه دادند^[6]. اولین تولد حاصل از انجماد تخمک انسانی در سال ۱۹۹۹ توسط کولشو و همکاران انجام گرفت^[7]. روش‌های انجماد تخمک شامل انجماد شیشه‌ای و انجماد آهسته است، ولی به‌دلیل میزان زنده‌مانی بالای انجماد تخمک در روش انجماد شیشه‌ای، استفاده از این روش رایج است^[8]. روش انجماد شیشه‌ای طوری طراحی شده است که از محیط‌هایی با غلظت بالای ضدیخ استفاده می‌شود و این امر سبب می‌شود سلول حالت شیشه‌ای پیدا کند و هیچ بلور یخی در سیتوپلاسم سلول تشکیل نشود^[9]. با وجود میزان بالای زنده‌مانی پس از انجماد شیشه‌ای، نگرانی‌هایی مبنی بر انتقال بیماری در این روش انجماد با سیستم باز وجود دارد^[10]. زیرا در روش‌های معمول انجماد شیشه‌ای از حامل‌هایی مانند کرایوتاپ استفاده می‌شود که باعث در معرض قرارگیری مستقیم تخمک و جنین با LN₂ (نیترژن مایع) می‌شود. برای کاهش این نگرانی‌ها استفاده از سیستم‌های بسته مورد توجه قرار گرفت^[11]. در روش بسته نمونه‌ها پیش از آنکه در معرض LN₂ قرار گیرند، داخل تجهیزاتی مهر و موم می‌شوند تا از تماس مستقیم نمونه با آن جلوگیری شود^[12]. ولی استفاده از این حامل‌ها سرعت انجماد شیشه‌ای را کاهش می‌دهد.

در طول انجام مراحل تکنیک انجماد، سلول در معرض استرس‌های زیادی از جمله استرس مکانیکی، دمایی و شیمیایی قرار می‌گیرد که می‌تواند منجر به کاهش عملکرد و مرگ سلول شود^[13]. به‌طور کلی در مطالعات ثابت شده است که تخمک نسبت به جنین به آسیب‌های ناشی از انجماد حساس‌تر است^[13]. زیرا در مرحله متافاز میوز ۲ دارای یک‌سری خصوصیات است که آن را مستعد آسیب می‌کند. از جمله این خصوصیات می‌توان به حجم بسیار بالای مایع در سیتوپلاسم، نسبت کم سطح به حجم سلول و حضور دوک تقسیم اشاره کرد^[4]. به‌طور کلی تخمک به دمای پایین‌تر از دمای فیزیولوژی بدن حساس است^[14]. آسیب‌های احتمالی طی فرآیند انجماد تخمک شامل فروپاشی میکروتوبول‌ها، آسیب به غشای پلاسمایی و میکروفلامنت‌های اسکلت سلولی است^[15, 16]. فروپاشی و تشکیل مجدد میکروتوبول‌ها طی مراحل انجماد و ذوب در فرآیند لقاح تخمک و تکامل قبل از لانه‌گزینی موثر و ممکن است باعث افزایش آنوپلویدی و پلی‌پلویدی شود^[4, 16].

با وجود اصلاحاتی که در دستورالعمل انجماد انجام شده است، همچنان تغییرات منفی در سیتوپلاسم، میتوکندری، زوناپلوسیدا،

تخمک تا ۹۰٪ به شکل طبیعی خود بازگردد) در این محیط باقی ماندند و سپس داخل VS (محلول انجماد شیشه‌ای) حاوی ۱۵٪ EG، ۱۵٪ DMSO و ۵۰٪ مول بر لیتر سوکروز قرار داده شدند. این مرحله به ۴۵ تا ۶۰ ثانیه زمان نیاز دارد. در این روش تخمک‌ها به همراه کمتر از یک‌لاندای محلول انجماد شیشه‌ای روی کرایوتاپ (Kitazato؛ ژاپن) منتقل شدند و کرایوتاپ به سرعت داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور شد (شکل ۱-الف). کرایوتاپ متشکل از یک نوار از جنس پلی‌پروپیلن ظریف متصل به دسته پلاستیکی است که تخمک را مستقیماً در معرض نیتروژن مایع قرار می‌دهد. به منظور محافظت از نوار در طول زمان نگهداری در نیتروژن مایع در حالی که کرایوتاپ داخل نیتروژن مایع است، نوار توسط درپوش پلاستیکی پوشانده شد. نمونه‌ها به تانک نیتروژن با دمای حدود -196°C منتقل شدند [19].

در روش انجماد شیشه‌ای به روش بسته تمامی مراحل انکوباسیون در محیط‌های انجماد مشابه سیستم باز انجام گرفت. تنها تفاوت این سیستم با سیستم باز در تجهیزات استفاده‌شده در زمان انتقال به حامل است. تخمک‌ها به همراه حجم کمی از محیط VS (Vitrolife؛ سوئیس) داخل دیواره حفره موجود در Rapid-i تخلیه شدند (شکل ۱-ب). به‌طوری که قطره‌ای تخت و مسطح ایجاد شد. Rapid-i وارد RapidStraw شد. سپس مجموعه Rapid-i به همراه RapidStraw داخل ظرف مخصوص محتوای نیتروژن (Smartbox) قرار گرفتند [20].



شکل ۱ (الف) کرایوتاپ؛ (ب) Rapid-i

ذوب تخمک با قراردادن کرایوتاپ (در سیستم باز) و Rapid-i (در سیستم بسته) داخل محلول Warming انجام گرفت. نوک کرایوتاپ حاوی تخمک بلافاصله پس از خروج از نیتروژن مایع داخل محیط حاوی یک مول بر لیتر سوکروز غوطه‌ور شد. پس از گذشت مدت زمان ۴۵ تا ۶۰ ثانیه تخمک‌ها به داخل محلول ۵۰٪ مول بر لیتر سوکروز و سپس ۲۵٪ مول بر لیتر سوکروز منتقل شدند. زمان نگهداری تخمک در داخل این محلول‌ها ۳ دقیقه بود.

دوک میوزی و جریان یون کلسیم در سلول گزارش شده است [17]. در نتیجه مقایسه بین روش‌های مختلف انجماد تخمک همچنان حایز اهمیت است. تاکنون مطالعات کمی در زمینه مقایسه سیستم‌های باز و بسته انجام شده است [10]. هدف از انجام مطالعه حاضر، مقایسه درصد تشکیل مجدد دوک تقسیم میوزی و جابه‌جایی دوک تقسیم نسبت به موقعیت اولین گویچه قطبی در تخمک‌های موشی در دو حامل باز و بسته در روش انجماد شیشه‌ای است تا مشخص شود کدام حامل باعث آسیب کمتر به تخمک می‌شود.

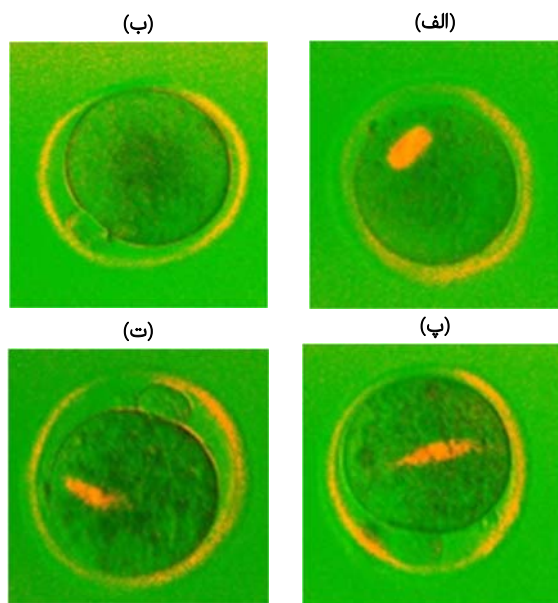
مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش‌های نژاد BALB/C با سن ۶-۸ هفته استفاده شده است. موش‌ها از پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد تهیه شدند. آنها در شرایط مناسب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای $22^{\circ}\text{C} \pm 2$) نگهداری شدند.

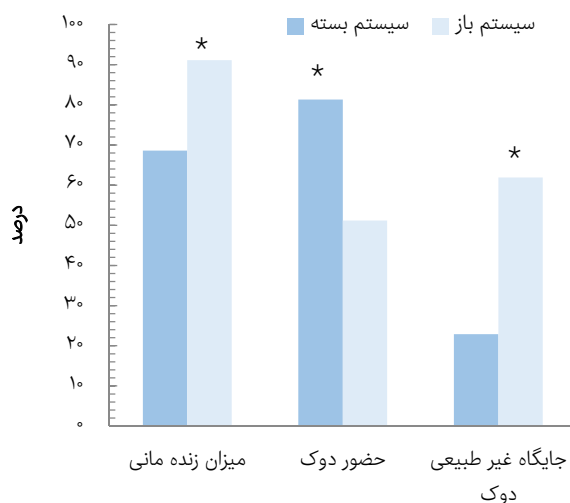
تحریک تخمک‌گذاری به صورت تزریق داخل صفاقی ۷/۵ واحد بین‌المللی PMSG (گنادوتروپین سرم اسب بارداری) و بعد از گذشت ۴۸ ساعت با تزریق ۷/۵ واحد بین‌المللی HCG (گنادوتروپین جفتی انسانی) صورت گرفت. پس از ۱۶ ساعت موش‌ها به روش قطع مهره‌های گردنی کشته و توده‌های تخمک-کومولوس از داخل لوله رحمی بیرون کشیده شدند و به مدت یک ساعت داخل انکوباتور با شرایط ۶٪ دی‌اکسیدکربن و دمای 37°C و حداکثر رطوبت در محیط GIVF (Vitrolife؛ سوئیس) نگهداری شدند. برای حذف توده سلول‌های کومولوسی، تخمک‌ها در محیط MOPS (Vitrolife؛ سوئیس) حاوی ۱۰ واحد بین‌المللی آنزیم هیالورونیداز (Vitrolife؛ سوئیس) قرار گرفتند و همزمان با استفاده از روش مکانیکی سلول‌های کومولوس از اطراف تخمک جدا شدند. تخمک‌های برهنه‌شده از لحاظ بلوغ بررسی شدند. تخمک‌هایی که اولین گویچه قطبی خود را خارج کرده و در مرحله متافاز میوز ۲ بودند، بالغ در نظر گرفته شدند. ۱۳۱ تخمک بالغ که حاوی دوک تقسیم میوزی بودند وارد مطالعه شدند و به صورت اتفاقی در دو گروه قرار گرفتند. ۴۵ تخمک در گروه انجماد شیشه‌ای با سیستم باز و ۸۶ تخمک در شرایط سیستم بسته وارد شدند.

در روش انجماد شیشه‌ای به روش باز، کلیه مراحل انجماد در دمای 37°C انجام گرفت و در تمامی مراحل اصول بهداشتی رعایت شد. در این روش از ES (محلول تعادل) حاوی ۷/۵٪ EG (اتیلن‌گلیکول) و ۷/۵٪ DMSO (دی‌متیل‌سولفوکسید) استفاده شد. ابتدا تخمک داخل قطره ۲۰ لاندایی از WS (محلول شست‌وشو) قرار داده شد. محلول WS، محیط MOPS حاوی ۲۰٪ آلبومین بود. سپس قطره ۲۰ لاندایی ES به قطره WS متصل شد. پس از آن، قطره ES دوم به ترکیب دو قطره اول اضافه شد. در هر مرحله ۳ دقیقه زمان نیاز است. در نهایت تخمک‌ها به قطره‌های حاوی ES خالص منتقل شدند. تخمک‌ها ۶-۹ دقیقه (تا زمانی که

دادند که از نظر آماری جایگاه طبیعی دوک میوزی در گروه بسته درصد بیشتری داشت (نمودار ۱).



شکل ۲ تصویر تخمک بالغ موشی بعد از انجام فرآیند انجماد و ذوب با بزرگنمایی ۲۵×: (الف) دوک تقسیم میوزی در موقعیت طبیعی (دوک در زیر گویچه قطبی اول قرار دارد)؛ (ب) بدون دوک تقسیم میوزی؛ (پ) دوک تقسیم میوزی در مرکز تخمک؛ (ت) دوک تقسیم میوزی موقعیت ۳ ساعت



نمودار ۱ نتایج حاصل از انجماد شیشه‌ای تخمک موشی به دو روش سیستم باز و بسته؛ علامت * نشان‌دهنده سطح معنی‌داری $p < 0.05$ است.

بحث

با وجود گذشت حدود ۱۵ سال از معرفی انجماد شیشه‌ای تخمک انسانی، مطالعات حاکی از آن است که این تکنیک بر روی میزان لقاح و حاملگی تأثیری ندارد و هنوز به‌صورت رایج به کار گرفته نمی‌شود [12, 24-26]. مطالعات جدید نشان داده‌اند که میزان رشد جنین‌های حاصل از تخمک منجمد شده، کاهش یافته است و شانس کمتری برای تشکیل بلاستوسیت دارند [27, 28]. همچنین

پس از طی مدت زمان ذکر شده تخمک‌ها به داخل محلول شست‌وشوی MOPS منتقل شدند و به مدت ۵ دقیقه داخل آن قرار گرفتند. شست‌وشوی بعدی به مدت یک دقیقه انجام شد و سپس تخمک‌ها به داخل محیط کشت منتقل شدند. تمام مراحل ذوب در دمای 37°C انجام گرفت [19]. تخمک‌ها به مدت ۳ ساعت داخل انکوباتور با شرایط دمایی 37°C و غلظت ۶٪ دی‌اکسیدکربن در محیط In Vitro Fertilization (Vitrolife؛ سوئیس) نگهداری شدند. به دنبال آن حضور و جابه‌جایی دوک تقسیم میوزی از موقعیت اولیه بررسی شد.

برای ارزیابی زنده‌مانی، تخمک‌های ذوب شده با ظاهر طبیعی که هیچ‌گونه تیرگی در سیتوپلاسم، جمع‌شدگی غشای سیتوپلاسمی و پارگی در زوناپلوسیدا در آنها مشاهده نشد، به‌عنوان تخمک زنده در نظر گرفته شدند [21].

به‌منظور بررسی حضور و جایگاه دوک میوزی، قطره‌های ۳۰ لانداپی از محیط MOPS در دیش‌های کف‌شیشه‌ای قرار داده شدند. قطره‌ها با روغن معدنی (Vitrolife؛ سوئیس) پوشانده شدند تا از تبخیر آنها جلوگیری شود. پس از آنکه دمای قطره به 37°C رسید، تخمک‌هایی که ۳ ساعت از زمان ذوب آنها گذشته بود، داخل قطره قرار داده شدند [22]. دوک میوزی با کمک میکروسکوپ معکوس مجهز به صفحه 37°C و متصل به سیستم پلارایز و نرم‌افزار OCTAX Eyeware 2.2.0.269 (MTG؛ آلمان) بررسی شد. گویچه قطبی اول در ساعت ۱۲ قرار داده و جایگاه دوک میوزی با توجه به مکان گویچه قطبی ثبت شد [23]. چنانچه دوک در موقعیت ساعت ۱، ۱۲ یا ۱۱ بود طبیعی و در غیر این صورت جابه‌جایی دوک میوزی غیرطبیعی گزارش شد.

داده‌ها به‌صورت درصد گزارش شدند. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از آزمون کای دو برای ارزیابی میزان زنده‌مانی، حضور و جابه‌جایی دوک تقسیم میوزی تخمک‌های بالغ موشی انجام گرفت. سطح معنی‌داری کمتر از ۵٪ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در گروه بسته ۵۹ تخمک (۸۶/۶٪) از تخمک‌های منجمد شده زنده ماندند. از این تعداد ۴۸ تخمک (۸۱/۳٪) حاوی دوک میوزی بودند. در گروه باز میزان زنده‌مانی بعد از ذوب ۴۱ تخمک (۹۱/۱٪) گزارش شد. در این بین ۲۱ تخمک (۵۱/۲٪) حاوی دوک میوزی بودند. میزان زنده‌مانی تخمک بعد از انجام انجماد شیشه‌ای در روش باز به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه بسته بود ($p < 0.05$). در حالی که درصد حضور دوک میوزی در تخمک‌های گروه بسته به‌طور معنی‌داری بیشتر از روش باز بود ($p < 0.05$).

جابه‌جایی دوک نسبت به موقعیت قبل از انجام انجماد در هر دو گروه مشاهده شد (شکل ۲). در گروه سیستم باز از بین ۲۱ تخمک زنده‌ای که پس از ذوب دوک خود را حفظ کرده بودند، ۱۳ تخمک (۶۱/۹۰٪) و در گروه بسته از بین ۴۸ تخمک زنده حاوی دوک ۱۱ تخمک (۲۲/۹۱٪) جابه‌جایی دوک از موقعیت طبیعی را نشان

فروپاشی دوک تقسیم میوزی در دمای 32°C است [32]. سرد شدن و آسیب‌های ناشی از انجماد ممکن است دوک میوزی را در معرض فروپاشی قرار دهد. در مطالعه حاضر کاهش حضور دوک بعد از انجماد در هر دو گروه مشاهده شد که این موضوع تاکید بر حساسیت بالای دوک به نوسانات دمایی دارد، همانطور که مطالعات پیشین نیز گواهی بر صدق این ادعا است [33, 34]. در مطالعه‌ای نشان داده شد که انجماد تخمک می‌تواند باعث افزایش آنوپلویدی در بلاست‌های حاصل‌شده شود [35]. این افزایش آنوپلویدی می‌تواند ناشی از آسیب به ساختارهای دوک میوزی باشد. اگر تخمک در زمان تزریق سیتوپلاسمی اسپرم، دوک واضحی داشته باشد احتمال باروری و ایجاد جنین با کیفیت بالا افزایش می‌یابد [31].

تشکیل مجدد دوک تقسیم میوزی نقش مهمی در تکامل بعد از ذوب تخمک بازی می‌کند و به تقسیم میوزی بعد از باروری آن کمک می‌کند [22, 32]. در مطالعه حاضر ابتدا با روش غیرتهاجمی سیستم پلی‌سکوپ از حضور دوک تقسیم میوزی اطمینان حاصل شد و سپس تخمک‌ها وارد فرآیند انجماد شدند. گو و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که تخمک‌های دارای دوک میوزی مقاومت بهتری برای تحمل استرس‌های ناشی از انجماد دارند [36]. در مطالعه دیگری گزارش شده است که ۱۰۰٪ تخمک‌ها بعد از عمل ذوب، دوک تقسیم میوزی خود را مجدداً تشکیل می‌دهند. البته زمان مورد نیاز برای تشکیل مجدد دوک در تخمک‌ها متغیر است [32]. کشت تخمک به مدت یک تا سه ساعت به ساخته شدن مجدد دوک میوزی کمک می‌کند [37, 38]. بر این اساس در مطالعه حاضر بررسی دوک تقسیم میوزی، ۳ ساعت پس از ذوب تخمک انجام گرفت. در این مدت تخمک‌ها در انکوباتور 37°C و ۶٪ دی‌اکسیژن کشت داده شدند. در مطالعه حاضر احتمال تشکیل مجدد دوک در سیستم بسته ۸۱/۳٪ و در سیستم باز ۵۱/۲٪ گزارش شد که از این میان ۶۱/۹۰٪ در سیستم باز و ۲۲/۹۱٪ در سیستم بسته نسبت به اولین گویچه قطبی جایگاه غیرطبیعی داشتند. کنگ و همکاران ادعا کردند که پس از ذوب و کشت تخمک، دوک تقسیم میوزی در ۸۴/۳٪ تخمک‌ها مشاهده می‌شود. هر چند در ادامه گزارش کردند که نیمی از دوک تقسیم میوزی در تخمک‌ها در موقعیت جدیدی ظاهر شده است که این نشان می‌دهد که بعد از عمل انجماد و ذوب امکان جابه‌جایی موقعیت دوک نسبت به گویچه قطبی وجود دارد [22]. این گزارشات تاییدکننده نتایج مطالعه حاضر مبنی بر جابه‌جایی دوک تقسیم میوزی است. همچنین مطالعه‌ای مبنی بر اثر انجماد شیشه‌ای با سیستم باز بر وضعیت میکروتوبول‌های دوک تقسیم تخمک‌های موشی انجام شد. نتایج ایمونوهیستوشیمی نشان داد که جایگاه MTOC (مرکز سازمان‌دهی میکروتوبول) پس از ذوب تغییر نمی‌کند [39]. حدس بر این است که در طی فرآیند انجماد با از دست رفتن آب سلول و چروکیدگی آن و افزایش بالای حجم PVS، گویچه قطبی اول نسبت به جایگاه ابتدایی خود جابه‌جا

کوبو و همکاران مورفوکینتیک رشد و تکامل جنین‌های حاصل از تخمک‌های منجمدشده را بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که پارامترهای مورفوکینتیک این جنین‌ها نسبت به گروه کنترل با تاخیر همراه هستند [29]. گفته می‌شود که این تغییرات شاید بر میزان لقاح و حاملگی تأثیری نداشته باشد، ولی ممکن است باعث تغییراتی در سطح مولکولی در جنین‌های در حال رشد شود که سلامت نوزدان حاصل را تحت تأثیر قرار دهد [9]. در نتیجه روش انجماد تخمک نیاز به بررسی‌های دقیق‌تری دارد تا آسیب‌های ناشی از آن به حداقل برسد.

یکی از موضوعات قابل توجه در سیستم انجماد احتمال انتقال آلودگی از طریق LN_2 است. LN_2 ممکن است حاوی عوامل عفونی باشد که تماس مستقیم با آن می‌تواند باعث انتقال عفونت و بیماری شود. در فرآیند انجماد به روش سیستم باز تخمک از لحاظ فیزیکی در تماس مستقیم با LN_2 قرار می‌گیرد اما در سیستم بسته هیچ تماس مستقیمی بین تخمک و LN_2 وجود ندارد [10]. در نتیجه احتمال انتقال آلودگی از طریق LN_2 در سیستم بسته کمتر است [25].

تاکنون چندین مطالعه در مورد اثرات سوء سرد شدن در فرآیند انجماد بر مورفولوژی دوک و مقایسه جابه‌جایی موقعیت دوک در انجماد شیشه‌ای به روش باز با روش انجماد آهسته صورت گرفته است [22]. اما اطلاعات چندانی در زمینه مقایسه دو سیستم باز و بسته انجماد شیشه‌ای از نظر وجود و جابه‌جایی احتمالی دوک تقسیم میوزی وجود ندارد. در مطالعه حاضر میزان زنده‌مانی بعد از ذوب، حضور دوک تقسیم میوزی و جابه‌جایی آن از موقعیت اولیه خود در دو گروه سیستم باز و بسته انجماد شیشه‌ای با یکدیگر مقایسه شدند. هدف از این مطالعه مقایسه دو سیستم باز و بسته انجماد شیشه‌ای از لحاظ وجود و جابه‌جایی موقعیت دوک میوزی است.

اولین نتیجه قابل توجه، میزان زنده‌مانی بالاتر تخمک‌ها در گروه باز نسبت به بسته (۹۱/۱٪ نسبت به ۶۸/۶٪) بعد از انجام عمل ذوب بود. مطالعاتی مشابه از جمله گوک و همکاران میزان زنده‌مانی کمتری در سیستم بسته نسبت به سیستم باز گزارش کردند. برخی مطالعات نیز تفاوت چندانی در میزان زنده‌مانی در این دو نوع حامل مشاهده نکردند [30].

لازم به ذکر است که در مطالعات مبنی بر مقایسه بین دو سیستم باز و بسته انجماد شیشه‌ای از بررسی مبتنی بر سلامت دوک تقسیم میوزی و جابه‌جایی آنها سخنی به میان نیامده است. ساختار دوک میوزی نقش حیاتی در وقایع تکمیل میوز، لقاح و بنابراین نقش کلیدی در تعیین پتانسیل تکاملی تخمک دارد، تا جایی که تغییر در ساختار دوک تقسیم میوزی می‌تواند منجر به ایجاد جنین‌های آنوپلویدی شود [31]. دوک میوزی به‌عنوان ساختاری حساس، ممکن است تحت تأثیر کاهش دما و استرس‌های فیزیکی ناشی از سرد شدن، از دست دادن و به‌دست آوردن آب در طول فرآیند انجماد قرار گیرد [22]. شروع

- assisted reproduction. *BioMed Res Int*. 2014;2014:307268.
- 5- Stachecki JJ, Munné S, Cohen J. Spindle organization after cryopreservation of mouse, human, and bovine oocytes. *Reprod BioMed Online*. 2004;8(6):664-72.
- 6- Lim JM, Ko JJ, Hwang WS, Chung HM, Niwa K. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. *Theriogenology*. 1999;51(7):1303-10.
- 7- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: Case report. *Hum Reprod*. 1999;14(12):3077-9.
- 8- Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update*. 2012;18(5):536-54.
- 9- Vazquez-Levin MH. A high-tech closer look to evaluate the impact of oocyte vitrification on embryo quality. *Fertil Steril*. 2017;108(3):448-9.
- 10- Vajta G, Rienzi L, Ubaldi FM. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online*. 2015;30(4):325-33.
- 11- Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology*. 2012;77(3):467-82.
- 12- Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*. 2011;96(2):277-85.
- 13- Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2088-95.
- 14- Castelló D, Cobo A, Mestres E, Garcia M, Vanrell I, Remohí JA, et al. Pre-clinical validation of a closed surface system (Cryotop SC) for the vitrification of oocytes and embryos in the mouse model. *Cryobiology*. 2018;81:107-16.
- 15- Mullen SF, Rosenbaum M, Critser JK. The effect of osmotic stress on the cell volume, metaphase II spindle and developmental potential of in vitro matured porcine oocytes. *Cryobiology*. 2007;54(3):281-9.
- 16- Huang JY, Chen HY, Park JY, Tan SL, Chian RC. Comparison of spindle and chromosome configuration in in vitro-and in vivo-matured mouse oocytes after vitrification. *Fertil Steril*. 2008;90(4):1424-32.
- 17- Bonetti A, Cervi M, Tomei F, Marchini M, Ortolani F, Manno M. Ultrastructural evaluation of human metaphase II oocytes after vitrification: closed versus open devices. *Fertil Steril*. 2011;95(3):928-35.
- 18- 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.
- 19- Schoolcraft WB, Keller JL, Schlenker T. Excellent embryo quality obtained from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(6):820-3.
- 20- Larman MG. Appendix E: Rapid-i TM: Closed Vitrification Device by Vitrolife. In: Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A, editors. *Cryopreservation of mammalian gametes and embryos*. New York: Humana Press; 2017. pp. 335-42.

می‌شود. در هنگام انجام عمل ICSI (تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم) گویچه قطبی در ساعت ۱۲ یا ۶ قرار می‌گیرد و سوزن تزریق از ساعت ۳ وارد می‌شود. در نتیجه در زمان تزریق با در نظر گرفتن گویچه قطبی در ساعت ۱۲ یا ۶، در صورت بروز جابه‌جایی در موقعیت دوک و یا گویچه قطبی طی عمل انجماد ممکن است دوک در مسیر ورود سوزن تزریق قرار گیرد و در نتیجه تزریق باعث تخریب یا آسیب به دوک شود.

نتیجه‌گیری

سیستم باز از نظر بقا باعث زنده‌مانی بهتر تخمک‌ها می‌شود، ولی در سیستم بسته ساختار دوک‌های میوزی آسیب کمتری می‌بیند. احتمالاً تماس مستقیم نیتروژن با تخمک در روش باز باعث حفظ بهتر ساختار سلول، ولی آسیب و جابه‌جایی بیشتر در دوک میوزی می‌شود. همچنین با توجه به جابه‌جایی مشاهده‌شده در موقعیت دوک در هر دو سیستم توصیه می‌شود قبل از اقدام به تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم، تخمک از لحاظ حضور و موقعیت دوک تقسیم میوزی بررسی شود، چراکه هر چه جابه‌جایی دوک تقسیم میوزی نسبت به جایگاه گویچه قطبی اول کمتر باشد در هنگام عمل تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم، دوک در معرض آسیب کمتری قرار می‌گیرد و بنابراین شانس باروری تخمک‌ها افزایش می‌یابد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از زحمات دکتر ساره عاشورزاده و خانم آرزو خردمهر تشکر و قدردانی می‌کنند.

تأییدیه اخلاقی: در مطالعه حاضر، اصول اخلاقی کار با حیوانات به تصویب کمیته اخلاق پزشکی پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد رسید (کد اخلاق: IR.SSU.RSI.REC.1398.037).

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: لیلا حیدری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵٪)، اعظم آقارحیمی (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)، مرتضی انوری (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)، ایمان حلوائی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۲۵٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر با حمایت مالی پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد انجام شده است.

منابع

- 1- Robles V, G Valcarce D, F Riesco M. The use of antifreeze proteins in the cryopreservation of gametes and embryos. *Biomolecules*. 2019;9(5):181.
- 2- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(3):300-8.
- 3- Coello A, Pellicer A, Cobo A. Vitrification of human oocytes. *Minerva Ginecologica*. 2018;70(4):415-23.
- 4- Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskői B, Cseh S. Cryopreservation of embryos and oocytes in human

an oocyte donation programme: A prospective randomized sibling oocyte study. *Hum Reprod.* 2016;31(2):377-84.

31- Asa E, Tabatabaee R, Farrokhi A, Nejatbakhsh R. Relationship between meiotic spindles visualization and intracytoplasmic sperm injection outcomes in human oocytes. *Anat Cell Biol.* 2017;50(1):26-32.

32- Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Bazzocchi A, Venturoli S. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril.* 2009;91(6):2399-407.

33- Gomes CM, Silva CA, Acevedo N, Baracat E, Serafini P, Smith GD. Influence of vitrification on mouse metaphase II oocyte spindle dynamics and chromatin alignment. *Fertil Steril.* 2008;90(4):1396-404.

34- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril.* 1990;54(1):102-8.

35- Buderatska N, Gontar J, Ilyin I, Lavrinenko S, Petrushko M, Yurchuk T. Does human oocyte cryopreservation effect equally on embryo chromosome aneuploidy?. *Cryobiology.* 2020;93:33-6.

36- Gu RH, Li ZC, Lang JW, Chen H, Feng Y, Guo S, et al. Vitrification of In vitro-matured Oocytes: Effects of meiotic spindle morphology on clinical outcome. *Reprod Dev Med.* 2020;4(1):18-24.

37- Cobo A, Perez S, De Los Santos MJ, Zulategui J, Domingo J, Remohi J. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2008;17(3):350-9.

38- Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: A prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod.* 2010;25(9):2239-46.

39- 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.

21- De Munck N, Verheyen G, Van Landuyt L, Stoop D, Van De Velde H. Survival and post-warming in vitro competence of human oocytes after high security closed system vitrification. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(3):361-9.

22- Konc J, Kanyo K, Kriston R, Zeke J, Cseh S. Freezing of oocytes and its effect on the displacement of the meiotic spindle. *Sci World J.* 2012;2012:785421.

23- Świątecka J, Anchim T, Leśniewska M, Wołczyński S, Bielawski T, Milewski R. Oocyte zona pellucida and meiotic spindle birefringence as a biomarker of pregnancy rate outcome in IVF-ICSI treatment. *Ginekologia Polska.* 2014;85(4):264-271.

24- Tavukcuoglu S, Al-Azawi T, Khaki AA, Al-Hasani S. Is vitrification standard method of cryopreservation. *Middle East Fertil Soc J.* 2012;17(3):152-6.

25- Gook DA, Choo B, Bourne H, Lewis K, Edgar DH. Closed vitrification of human oocytes and blastocysts: Outcomes from a series of clinical cases. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(9):1247-52.

26- Talreja D, Gupta C, Pai H, Palshetkar N. Oocyte vitrification: A comparative analysis between fresh and cryopreserved oocytes in an oocyte donation program. *Fertil Reprod.* 2020;2(01):9-13.

27- Sun Y, Gu R, Lu X, Zhao Sh, Feng Y. Vitrification of in vitro matured oocytes diminishes embryo development potential before but not after embryo genomic activation. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(2):231-6.

28- Braga DP, Setti AS, Figueira RC, De Castro Azevedo M, Iaconelli Jr A, Turco EG, et al. Freeze-all, oocyte vitrification, or fresh embryo transfer? Lessons from an egg-sharing donation program. *Fertil Steril.* 2016;106(3):615-22.

29- Cobo A, Coello A, Remohi J, Serrano J, De Los Santos JM, Meseguer M. Effect of oocyte vitrification on embryo quality: Time-lapse analysis and morphokinetic evaluation. *Fertil Steril.* 2017;108(3):491-7.

30- De Munck N, Santos-Ribeiro S, Stoop D, Van De Velde H, Verheyen G. Open versus closed oocyte vitrification in