

Ultrastructural Changes of Sheep Oocytes Follow Vitrification by Different Methods and In Vitro Maturation

***Ebrahimi B., Ph.D., Valojerdi M.R., Ph.D.*, Eftekhari-Yazdi P., Ph.D.,
Baharvand H., Ph.D.***

**P.O.Box: 14115–111, Department of Anatomy, Faculty of Medical Science,
Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: Our aim was determination of the sheep oocytes ultrastructural changes follow vitrification and in vitro maturation.

Materials and Methods: Good quality isolated cumulus-oocyte complexes (COCs) were randomly divided into non-vitrified control, conventional straw, cryotop and solid surface vitrification groups. In the conventional and cryotop methods the vitrified COCs were plunged directly into liquid nitrogen (LN2), whereas in the solid surface group the vitrified COCs were cooled before plunging into LN2. Fresh and vitrified-warmed healthy COCs were matured in vitro and then their ultrastructural changes were evaluated.

Results: The results indicated that vitrification by cryotop and solid surface methods preserved the total arrangement of the ooplasm, whereas conventional straw vitrification disturbed the ooplasm organization. Additionally, the number of vacuoles in the ooplasm increased after vitrification, some of these vacuoles were filled partially or completely with lipids and some had filamentous scaffolding. Also, in the mature oocytes, the amount and the density of cortical granules decreased after conventional straw and solid surface vitrification.

Conclusion: Cryotop group compared with other vitrification methods could preserve oocyte ultrastructure properly and create a condition the same as like as the control group.

Keywords: Vitrification, In vitro maturation, Oocyte, Sheep

ارزیابی تغییرات فراساختاری تخمک‌های گوسفند پس از انجماد شیشه‌ای با روش‌های مختلف و بلوغ آزمایشگاهی

بی‌نا ابراهیمی Ph.D.*، مجتبی رضازاده ولوجردی Ph.D.*،*، پوپک افتخاری یزدی Ph.D.*،*، حسین بهاروند Ph.D.*،*،*،*،*،*،*

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

** گروه جنین‌شناسی مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل پژوهشکده رویان، تهران، ایران

*** گروه سلول‌های بنیادی و بیولوژی تکوین پژوهشکده رویان، تهران، ایران

**** گروه بیولوژی تکوین دانشگاه علوم و فرهنگ، تهران، ایران

تاریخ وصول: آذرماه ۱۳۸۸، تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۸

چکیده

هدف: ارزیابی تغییرات فراساختاری تخمک‌های گوسفند پس از انجماد شیشه‌ای و بلوغ آزمایشگاهی

مواد و روش‌ها: توده‌های Cumulus-Oocyte Complexes (COC) دارای کیفیت خوب به چهار گروه، غیرانجمادی کنترل، انجمادی Conventional straw، Cryotop و Solid Surface تقسیم شدند. در گروه‌های Conventional straw و Cryotop، توده‌های منجمد شیشه‌ای شده مستقیماً در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند؛ درحالی‌که در گروه Solid Surface، توده‌های منجمد شیشه‌ای شده ابتدا سرد و سپس به نیتروژن مایع منتقل شدند. توده‌های سالم تازه و منجمد - ذوب شده در شرایط آزمایشگاهی بالغ و تغییرات فراساختاری تخمک‌های آن‌ها ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که انجماد شیشه‌ای با روش‌های Cryotop و Solid Surface بر خلاف روش Conventional straw سازمان‌دهی کلی اووپلاسم را حفظ کرده بود. به‌علاوه پس از انجماد شیشه‌ای، تعداد واکوئل‌ها در اووپلاسم افزایش یافته بود، گروهی از آن‌ها به‌صورت جزیی یا کامل با چربی پر شده و گروهی نیز دارای داربست میکروفیلامنتی بود. همچنین در تخمک‌های بالغ از تعداد و تراکم گرانول‌های قشری پس از انجماد Conventional straw و Solid Surface کاسته شده بود.

نتیجه‌گیری: انجماد شیشه‌ای با روش Cryotop در مقایسه با سایر روش‌های انجمادی می‌تواند فراساختار تخمک‌ها را به خوبی حفظ کند و شرایطی شبیه گروه کنترل را ایجاد نماید.

کلید واژه‌ها: انجماد شیشه‌ای، بلوغ آزمایشگاهی، تخمک، گوسفند

مقدمه

همچنین تضعیف قدرت باروری و تکوین تخمک بر اثر انجماد هنوز میزان موفقیت این روش پایین است [۱ و ۲]. هم‌اکنون از این روش برای انجماد تخمک در اکثر گونه‌های

با وجود گذشت چند دهه از ابداع روش‌های مختلف انجماد تخمک، به دلیل ساختمان خاص تخمک، نسبت سطح به حجم پایین آن، ایجاد آسیب‌های ساختاری و عملکردی و

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵
Email: mr_valojerdi@modares.ac.ir

پستانداران و انسان استفاده می‌شود. انجماد شیشه‌ای تخمک در پستانداران به منظور حفظ تنوع جانوری، حفظ و نگهداری تخمک‌های گونه‌های با ارزش و در معرض خطر و ایجاد منبعی از تخمک برای تحقیقات مورد استفاده است [۲]. امروزه سعی شده که با استفاده از روش‌های مختلف، آسیب‌های سمی و اسمزی وارده به سلول در حین انجماد شیشه‌ای که به علت غلظت بالای ضدیخ و عبور از دمای بحرانی و غیره روی می‌دهد، به حداقل رسانده شود. به این منظور ترکیب دو یا سه نوع ضدیخ، قرار دادن سلول‌ها در معرض ضدیخ‌های از پیش سرد شده و استفاده از حداقل محیط‌های انجمادی کاربرد وسیعی پیدا کرده است [۱ و ۲]. گروهی از محققین معتقدند که تخمک‌های بالغ نسبت به نابالغ حساسیت بیشتری به تغییرات دمایی دارند؛ بنابراین در اکثر تحقیقات خود از تخمک‌های نابالغ برای انجماد شیشه‌ای استفاده کرده‌اند. اما مشکل اصلی، بلوغ آزمایشگاهی این تخمک‌ها پس از انجماد و ذوب است [۱ و ۳]. بلوغ کامل تخمک زمانی روی می‌دهد که بلوغ سیتوپلاسمی و بلوغ هسته‌ای به صورت همزمان انجام شود. حضور سلول‌های کومولوس در اطراف تخمک یکی از عوامل مهم حامی بلوغ است اما از آنجا که در شرایط آزمایشگاهی محیط‌های بلوغ نمی‌تواند محیطی شبیه به فولیکول را برای تخمک ایجاد کند، میزان بلوغ تخمک کاهش می‌یابد [۳ و ۴].

از طرف دیگر انجماد باعث ایجاد آسیب‌های مورفولوژیک و سیتولوژیک در سیستم اسکلتی، میتوکندری، گرانول‌های قشری و غشای سیتوپلاسمی تخمک‌ها می‌شود که درصد بقا و تکوین آزمایشگاهی آن‌ها را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد [۳ و ۴]. در تخمک نابالغ تعداد زیادی میتوکندری و قطرات چربی در درون سیتوپلاسم پراکنده است، دستگاه گلژی متشکل از تیغه‌های متسع و بسیار پیشرفته در محیط سیتوپلاسم قرار گرفته و تعداد زیادی

وزیکول‌های با تراکم متفاوت در اطراف آن قرار گرفته است که در واقع همان گرانول‌های قشری است. زواید سلول‌های کومولوس اطراف از عرض منطقه شفاف عبور کرده و در فضای اطراف زرده‌ای از طریق اتصالات فاصله‌دار در تماس با میکروویلی‌های غشای تخمک است. هسته ژرمینال وزیکول این تخمک‌ها در مرحله دیپلوتن پروفاز میوز اول متوقف شده است و کروموزوم‌های غیرقابل تشخیص آن‌ها نیز در سراسر هسته پراکنده است [۵]. میتوکندری نقش شناخته شده‌ای در متابولیسم سلولی دارد. شکل‌گیری، تعداد و توزیع میتوکندری وابسته به نیازهای متابولیک سلول، تکثیر و تمایز سلول است. افزایش تعداد و حرکت میتوکندری طی رشد تخمک ضروری است زیرا برای تولید و ترشح پروتئین و تبادل مواد بین تخمک و سلول‌های کومولوس انرژی لازم را فراهم می‌آورد [۶]. در سال ۲۰۰۹، فو (Fu) و همکارانش تأثیر تاکسول بر مورفولوژی، توزیع و فراساختار میتوکندری و قطرات چربی در تخمک‌های خوکی منجمد و بالغ شده در شرایط آزمایشگاهی را ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که توزیع میتوکندری در گروه کنترل نسبت به سایر گروه‌ها طبیعی‌تر بوده و همچنین پس از انجماد، قطرات چربی موجود در درون سیتوپلاسم تخمک شکسته و به قطرات کوچک‌تری تبدیل شد. استفاده از تاکسول به حفظ قطرات چربی بزرگ و حفظ ظاهر طبیعی میتوکندری‌ها پس از انجماد کمک کرده بود [۷]. علاوه بر آن بر طبق نظر شی (Shi) و همکارانش در سال ۲۰۰۷، انجماد شیشه‌ای سبب تغییر در محل قرارگیری میکروتوبول‌ها و سازمان‌دهی میتوکندری‌ها شده و در لقاح و تکوین جنین‌های حاصل اشکال ایجاد می‌کند [۸]. در کل، بعد از بلوغ تخمک، میتوکندری‌ها به مرکز مهاجرت می‌کند و حتی بعضی از آنها دژنره می‌شود و پس از این تغییر محل، سیتوپلاسم متراکم شده و کاهش می‌یابد. لازم به ذکر است که طی بلوغ سیتوپلاسمی تخمک، تعداد

مواد و روش‌ها

جداسازی توده‌های COC

پس از انتقال تخمدان‌ها از کشتارگاه به آزمایشگاه و شستشوی آن‌ها با محلول از قبل گرم شده بافر فسفات سالین، تخمدان‌های مناسب‌تر که دارای فولیکول‌هایی با قطر ۸-۲ میلی‌متر بودند، برای آسپیره کردن انتخاب شدند. جداسازی توده‌های COC با دو روش آسپیره کردن و برش دادن انجام شد. آسپیره کردن با سرنگ ۵ میلی لیتری محتوی محیط Tissue Culture Medium, Sigma, St Louise, MO, USA) TCM حاوی HEPES شامل ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS, Hyclone, Logan, Utah, USA) ۰/۰۱ میلی گرم در میلی لیتر هپارین و با سر سوزن ۱۹ gauge انجام شد [۱۴-۱۲]. پس از آسپیره کردن تخمدان‌ها، برش دادن نیز با سر سوزن انجام گرفت. سپس در زیر استریو میکروسکوپ تخمک‌هایی که سیتوپلاسمی یکنواخت، یکدست، گرانولر و حداقل ۳ لایه متراکم از سلول‌های کومولوس در اطرافشان داشت،ند جمع‌آوری شدند [۱۵ و ۱۶] و سپس در محیط TCM بدون HEPES حاوی ۱۰ درصد سرم FBS شستشو داده شدند. در نهایت توده‌های COC به چهار گروه: کنترل (Cont) و گروه‌های انجمادی Conventional straw (ConV)، Cryotop Vittrification (CTV) و Solid (SSV) Surface Vittrification تقسیم شدند. توده‌های COC در گروه کنترل مستقیماً به قطره‌های محیط بلوغ (IVM) منتقل شدند و به مدت ۲۲-۲۰ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و تحت فشار ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد، در حالی که توده‌های گروه‌های انجمادی ابتدا توسط یکی از روش‌های مذکور منجمد، یک هفته در تانک نیتروژن نگهداری و سپس ذوب شدند و ۲ ساعت پس از ذوب، نمونه‌ها به قطره‌های محیط بلوغ منتقل و تحت شرایطی شبیه به گروه کنترل انکوبه شد.

گرانول‌های قشری افزایش یافته و پس از جابجایی به محیط، درست در زیر غشای سیتوپلاسمی به صورت خطی پخش می‌شود و به این ترتیب شرایط مناسبی را برای مجموعه‌ای از فعالیت‌ها به نام فعال شدن تخمک و واکنش منطقه شفاف فراهم آورده و این تمهیدات سبب ورود فقط یک اسپرم به درون تخمک به منظور باروری می‌شود [۹]. در تخمک بالغ، گرانول‌های قشری علاوه بر توزیع طبیعی، تراکم و اندازه یکسانی نیز دارد. اتصالات بین سلول‌های کومولوس و تخمک دیگر مشاهده نمی‌شود [۵] و تعداد میتوکندری‌ها، شبکه آندوپلاسمی و کمپلکس گلژی نیز کاهش یافته است [۱۰].

از طرف دیگر میکروویلی‌های تخمک در زمانی که منطقه شفاف شروع به ظاهر شدن می‌کند، شکل می‌گیرد. تخمک‌های فولیکول‌های آنترال، میکروویلی‌های سطحی زیادی دارند ولی در تخمک در مرحله متافاز II، میکروویلی‌ها کاهش می‌یابد [۹]. در همین راستا در سال ۲۰۰۵، تخریب فیلامنت‌های بینابینی، تغییر غشای تخمک و میکروویلی‌های سطحی و تخریب میتوکندری‌ها در تخمک‌های منجمد شده با روش آهسته توسط ولوچردی (Valojerdi) و همکارانش مشاهده شد. در مطالعه آن‌ها در تخمک‌های منجمد شده با روش انجماد شیشه‌ای فقط فیلامنت‌های بینابینی تحت تأثیر قرار گرفته بودند و در مرحله پرونوکلئوس دوباره سازمان دهی شدند. در کل این تحقیق نشان داد که انجماد شیشه‌ای سبب آسیب‌های فراساختاری کمتری شده و تکوین بهتری را در پی دارد [۱۱].

با توجه به موارد مذکور و تحقیقات اندک انجام شده در زمینه بررسی تأثیرات انجماد شیشه‌ای و بلوغ آزمایشگاهی بر فراساختار تخمک‌های گوسفند، این مطالعه طراحی شد تا تغییرات فراساختاری تخمک‌های گوسفند پس از انجماد شیشه‌ای با روش‌های مختلف و بلوغ آزمایشگاهی آنها ارزیابی و مقایسه شود.

انجماد شیشه‌ای

در این مرحله، در گروه‌های انجمادی ConV و CTV به ترتیب تعداد ۱۰ و ۵ عدد توده COC از محیط TCM بدون HEPES به محلول تعادل α -MEM, Gibco, Alpha Minimal Essential (Carlsbad, CA, USA)] Ethylen Glycole(EG, Sigma, USA), ۲۰٪ FBS, Medium [۷/۵٪ Dimethyl Sulphoxide(DMSO, Sigma, USA)] منتقل شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در این محلول قرار گرفتند. پس از گذشت زمان تعادل، توده‌ها به مدت ۱ دقیقه و در دمای اتاق در محلول انجماد شیشه‌ای [۲۰٪ FBS, α -MEM, ۱۵٪ EG, ۱۵٪ DMSO و ۵٪ Sucrose M] شستشو و به ترتیب در درون نی انجمادی (IMV, L'Aigle, France) و روی نوک نوار کرایوتاپ (Kitazato, Japan) قرار گرفتند. لازم به ذکر است که نی‌ها بر طبق روش Chen [۱۷ و ۱۸]، سپس نمونه‌ها مستقیماً به نیتروژن مایع منتقل شد. در روش انجمادی SSV دقیقاً تمام مراحل شبیه گروه انجماد شیشه‌ای CTV انجام شد. فقط در مرحله آخر پس از قرار دادن توده‌ها روی نوک نوار، کرایوتاپ‌ها روی سطح استیل از پیش سرد شده قرار گرفت و پس از بستن درب از قبل سرد شده آن‌ها، به تانک نیتروژن منتقل شد. نمونه‌ها به مدت یک هفته در تانک نیتروژن نگهداری شد [۱۹].

ذوب نمونه‌ها

ذوب نمونه‌ها بر اساس روش Kuwayama [۱۶ و ۲۰] در سه مرحله انجام شد. پس از یک هفته نمونه‌ها از تانک نیتروژن خارج و سپس محتویات آن‌ها درون پتری سسترال حاوی محلول ذوب اول [۲۰٪ FBS, α -MEM, ۱ M Sucrose] از پیش گرم شده، خالی شد. پس از یک دقیقه، توده‌های COC

به ترتیب به قطرات محلول ذوب دوم [۲۰٪ FBS, α -MEM, Sucrose ۰/۵ M] و سوم [۲۰٪ FBS, α -MEM, Sucrose ۰/۲۵ M] منتقل و پس از ۳ تا ۵ دقیقه شستشو در هر محلول، در نهایت به محلول ذوب فاقد ساکارز [۲۰٪ FBS, α -MEM] منتقل و ۵ تا ۱۰ مرتبه در آن شستشو داده شد. سپس توده‌ها به مدت ۲ ساعت در محیط TCM بدون HEPES شامل ۲۰ درصد سرم FBS در انکوباتور ۳۹ درجه سانتی‌گراد و تحت فشار ۵ درصد دی اکسید کربن قرار گرفتند تا حیات آن‌ها پس از این مدت بررسی شود.

بررسی حیات توده‌های COC پس از انجماد و

ذوب

حیات توده‌های COC دو ساعت پس از ذوب، در تمامی گروه‌های انجمادی با استفاده از استریو میکروسکوپ و با بزرگنمایی ۲۰× بررسی شد. در این بررسی توده‌هایی که دارای تخمک‌هایی با سیتوپلاسم یکدست، یکنواخت و گرانولر بوده و فاصله‌ای بین سیتوپلاسم تخمک و منطقه شفاف و همچنین بین منطقه شفاف و سلول‌های کومولوس آن‌ها نبود و لایه‌های سلول‌های کومولوس نیز هنوز متراکم بودند، به عنوان توده‌های زنده در نظر گرفته شدند، در حالی که توده‌هایی که سیتوپلاسم تخمک آن‌ها متراکم و تیره بود و در حد فاصل بین سیتوپلاسم تخمک و منطقه شفاف یا بین منطقه شفاف و سلول‌های کومولوس آن‌ها فاصله ایجاد شده بود و از تراکم لایه‌های سلول‌های کومولوس اطراف نیز کاسته شده بود، به عنوان توده‌های مرده یا دژنره تلقی شدند [۲۱، ۲۲ و ۲۳].

بلوغ آزمایشگاهی توده‌های COC

توده‌های COC تازه (گروه Cont) و توده‌های سالم

Aceton, Sigma, USA) انجام شد (به ترتیب استون‌های ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد و در نهایت استون ۱۰۰ درصد). در مرحله بعد آغستگی نمونه‌ها با رزین در مخلوط‌های استون-رزین با نسبت‌های مشخص و در سه مرحله انجام شد (مخلوط استون - رزین به ترتیب با نسبت‌های ۱:۳، ۱:۱، ۳:۱). در نهایت نمونه‌ها به مدت ۱۵ ساعت در رزین خالص قرار گرفت. پس از اتمام زمان ۱۵ ساعت در رزین، نمونه‌ها قالب‌گیری شد، قالب محتوی رزین و نمونه به مدت ۵ الی ۶ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد فور قرار گرفت تا رزین به داخل نمونه نفوذ یابد. پس از آن قالب‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا رزین به طور کامل پلیمریزه شود. سپس با استفاده از دستگاه اولترامیکروتوم (Ultramicrotome, Leica, Austria) برش‌های نیمه نازک به ضخامت ۱ میکرومتر و برش‌های نازک به ضخامت ۷۰ نانومتر تهیه شد. برش‌های نیمه نازک روی لام میکروسکوپی و برش‌های نازک روی گریدهای میکروسکوپ الکترونی قرار گرفت و رنگ‌آمیزی شد. برش‌های نیمه نازک با رنگ تولوئیدن بلو و برش‌های نازک با استات اورانیل و سیترات سرب رنگ شد. سپس نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ الکترونی گذاره (Electron Microscope, Zeiss EM 900, Zeiss, Germany) بررسی و تصاویر مورد نظر تهیه شد.

یافته‌ها

الف. برش‌های نیمه نازک تخمک‌های بالغ

شده در گروه‌های مختلف

گروه کنترل

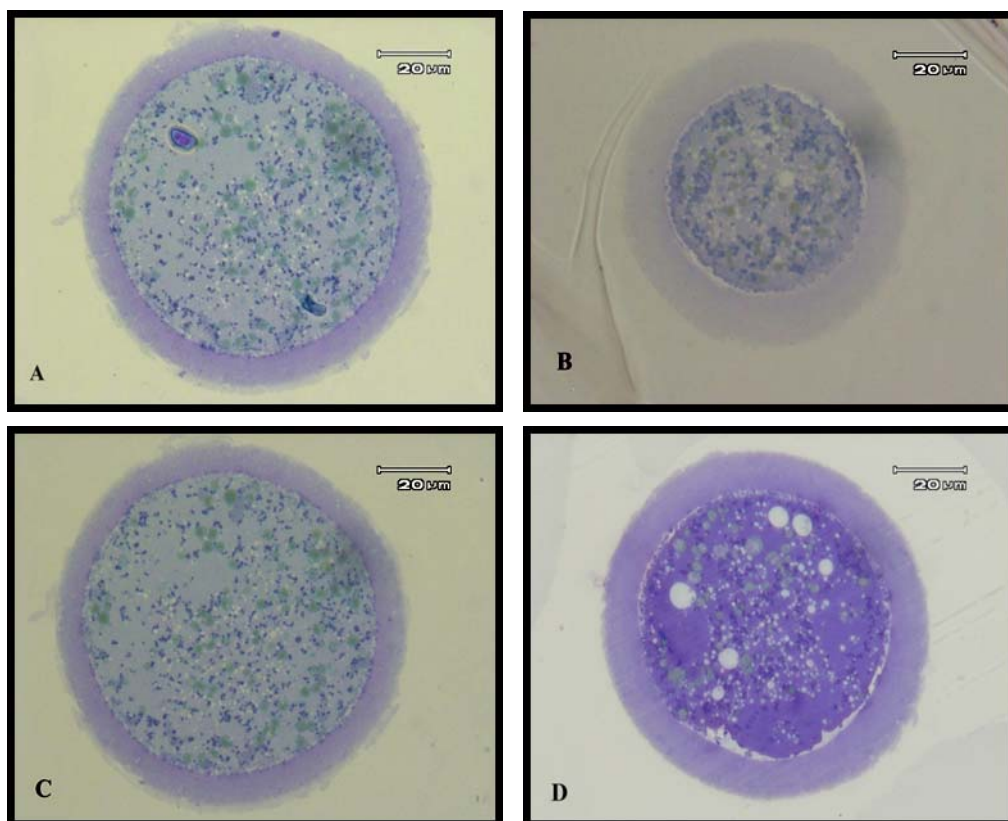
در برش‌های نیمه نازک تخمک‌های بالغ شده گروه کنترل، قطرات چربی فراوان پراکنده در سطح سیتوپلاسم، واکوئل‌های کوچک بیشتر در بخش مرکزی سیتوپلاسم مشاهده شد و منطقه شفاف یکدست بود (شکل ۱، A).

گروه‌های انجمادی ConV، CTV و SSV دو ساعت پس از ذوب به قطره‌های ۳۰۴ میکرولیتری محیط بلوغ منتقل و به مدت ۲۲-۲۰ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد دی اکسیدکربن قرار گرفتند تا بلوغ کامل شود [۲۰]. لازم به ذکر است که محیط بلوغ از محیط TCM بدون HEPES حاوی ۱۰ درصد سرم FBS، ۰/۰۲ واحد در میلی‌لیتر bFSH (bovine Follicle Stimulating Hormone, Sioux Biochemicals, IA, USA)، ۰/۰۲ واحد در میلی‌لیتر bLH (bovine Luteinizing Hormone, Sioux Biochemicals, IA, USA)، ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر استرادیول (17β -estradiol, Sigma, USA)، ۰/۲ میلی‌مول بر لیتر پیرووات سدیم (Na^+ pyruvate, Sigma, USA)، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین (Kanamycin, Sigma, USA) و ۱۰۰ میکرومولار سیستئامین (Cysteamine, Sigma, USA) تشکیل شده بود [۲۳].

فراساختار تخمک‌های بالغ شده در محیط

آزمایشگاه

تخمک‌های متافازی II در گروه کنترل و در هر سه گروه انجمادی که اولین جسم قطبی خود را پس از بلوغ آزمایشگاهی آزاد کرده بودند، کاملاً از سلول‌های کومولوس پاک شدند و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی در محلول گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد (Glutaraldehyde, Sigma, USA) تثبیت اولیه شدند. پس از تثبیت اولیه، یک یا دو توده به قطره آگار ۱ درصد منتقل و سپس نمونه‌ها سه مرتبه با محلول بافر فسفات شستشو داده شدند. در مرحله بعد، تثبیت ثانویه با استفاده از تتروکسیداسمیوم ۱ درصد (Osmium Tetroxide, TAAB, UK) و به مدت ۳ ساعت انجام شد. پس از تثبیت ثانویه، نمونه‌ها در آب فاقد یون شستشو داده شدند. از این مرحله به بعد آگیری نمونه‌ها در غلظت‌های افزایش یابنده استون



شکل ۱. فتوگراف برش‌های نیمه نازک تخمک‌های بالغ شده، A. تخمک بالغ شده گروه کنترل، B. تخمک بالغ شده پس از انجماد شیشه‌ای با روش Solid Surface، C. Conventional straw، D. تخمک بالغ شده پس از انجماد شیشه‌ای با روش Cryotop.

گروه انجمادی SSV

در برش‌های نیمه نازک تخمک‌های بالغ شده گروه انجماد شیشه‌ای SSV، منطقه شفاف یکدست با حاشیه خارجی نامنظم بود. فاصله میان منطقه شفاف و غشای پلاسمایی تخمک در بعضی مناطق افزایش یافته بود و واکوئل‌های بزرگ و کوچک و قطرات چربی در سرتاسر سیتوپلاسم پراکنده بود (شکل ۱، D).

گروه انجمادی ConV

در برش‌های نیمه نازک تخمک‌های بالغ شده گروه انجمادی ConV، واکوئل‌های فراوان با اندازه‌های مختلف و قطرات چربی فراوان در سرتاسر سیتوپلاسم و گرانول‌های قشری بلافاصله در زیر غشای پلاسمایی تخمک قابل مشاهده بود و در منطقه شفاف شکاف مشاهده شد (شکل ۱، B).

گروه انجمادی CTV

در برش‌های نیمه نازک تخمک‌های بالغ شده این گروه، منطقه شفاف یکدست بود، فضای کمی مابین تخمک و منطقه شفاف مشاهده شد. قطرات چربی و واکوئل‌ها توزیع یکنواختی در سیتوپلاسم داشت و بی‌نظمی‌هایی در سطح اوولما مشاهده شد (شکل ۱، C).

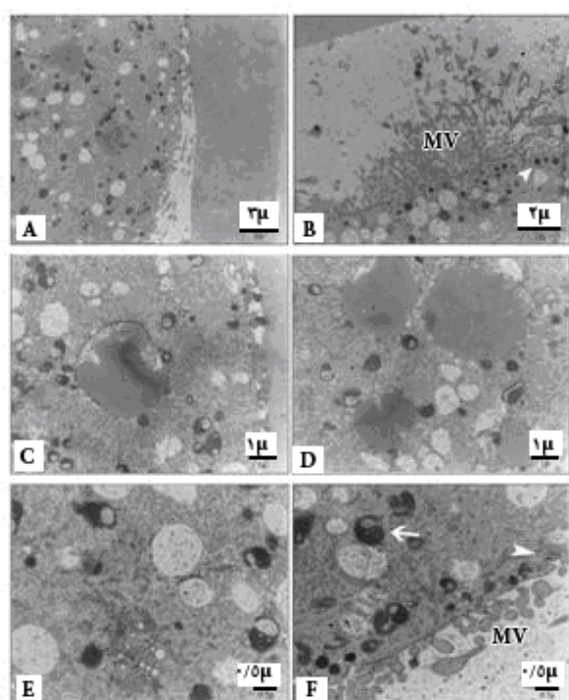
ب. برش‌های نازک تخمک‌های بالغ شده در

گروه‌های مختلف

گروه کنترل

در تصاویر حاصل از برش‌های نازک، در فضای کم مابین منطقه شفاف و غشای پلاسمایی تخمک بالغ شده، میکروویلی‌های تخمک به تعداد فراوان قابل مشاهده بود و

میکروویلی‌های فراوان در این فضا دیده شد (شکل ۳، A,B). بلافاصله در زیر غشای پلاسمایی گرانول‌های قشری با تراکم متفاوت مشاهده شد (شکل ۳، B,F). منطقه شفاف در این گروه دارای ترک یا شکاف بود. دستگاه گلژی، میتوکندری پراکنده، شبکه آندوپلاسمی صاف واکوئل‌های فراوان و قطرات چربی در سیتوپلاسم مشاهده شد. شبکه آندوپلاسمی صاف در اطراف واکوئل‌ها دیده شد (شکل ۳، C-F).

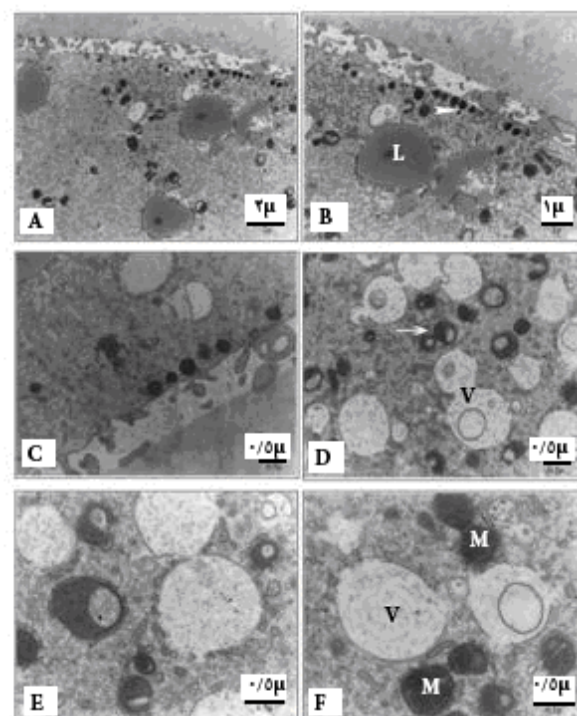


شکل ۳. میکروگراف الکترونی تخمک بالغ شده پس از انجماد شیشه‌ای با روش Conventional straw، MV: میکروویلی، (➡) میتوکندری در اطراف شبکه آندوپلاسمی صاف، (➤) گرانول‌های قشری در حال تخلیه

گروه انجمادی CTV

در برش‌های نازک تخمک‌های بالغ شده این گروه، منطقه شفاف یکدست، فاصله بین تخمک و منطقه شفاف تقریباً طبیعی بود و میکروویلی‌های تخمک در این فضا قابل مشاهده بود (شکل ۴، A,B). گرانول‌های قشری سالم در زیر غشای

بلافاصله در زیر غشای پلاسمایی تخمک، گرانول‌های قشری فراوان با الکترون دنیستری یکنواخت دیده شد (شکل ۲، A-C). قطرات چربی فراوان درون واکوئل‌های داربست‌دار و غشادار، واکوئل‌های ریز و در حال اتصال، میتوکندری‌های فراوان در اطراف قطرات چربی در سرتاسر سیتوپلاسم مشاهده شد. تجمعات وزیکولی در برخی مناطق سیتوپلاسم دیده شد. اکثریت واکوئل‌ها دارای غشا بود و در اطراف گروه‌هایی از آن‌ها تجمعات شبکه آندوپلاسمی صاف مشاهده می‌شد. میتوکندری‌های اطراف شبکه آندوپلاسمی نیز فراوان بود (شکل ۲، D-F).

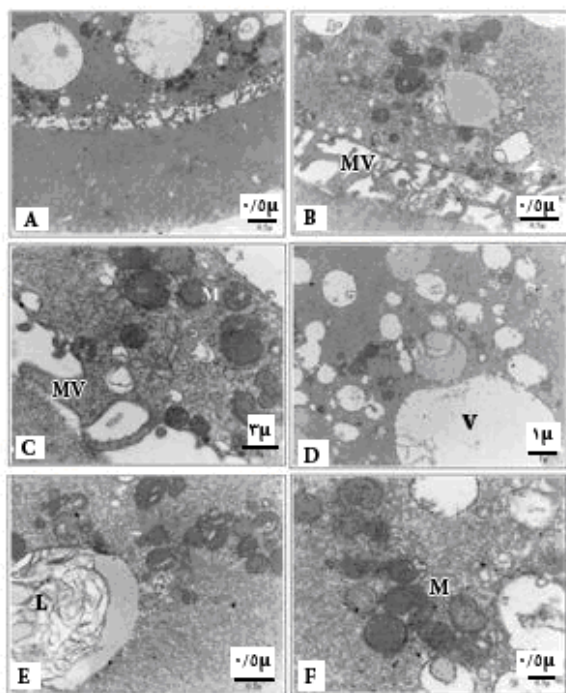


شکل ۴. میکروگراف الکترونی تخمک بالغ شده گروه کنترل، L: قطره چربی، V: واکوئل، M: میتوکندری، (➡) میتوکندری در اطراف شبکه آندوپلاسمی صاف، (➤) گرانول‌های قشری

گروه انجمادی ConV

در برش نازک تخمک بالغ شده این گروه، فضای میان منطقه شفاف و غشای پلاسمایی تخمک افزایش یافته و

مشاهده شد. واکوئل‌ها دارای غشا و گروهی دارای غلاف شبکه آندوپلاسمی صاف بود. واکوئل‌های بزرگ به تعداد فراوان دیده شد و تجمعات وزیکولی نیز در بخش‌هایی از سیتوپلاسم مشاهده شد. در کل سیتوپلاسم تخمک این گروه تراکم بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها داشت (شکل ۵، D-F).

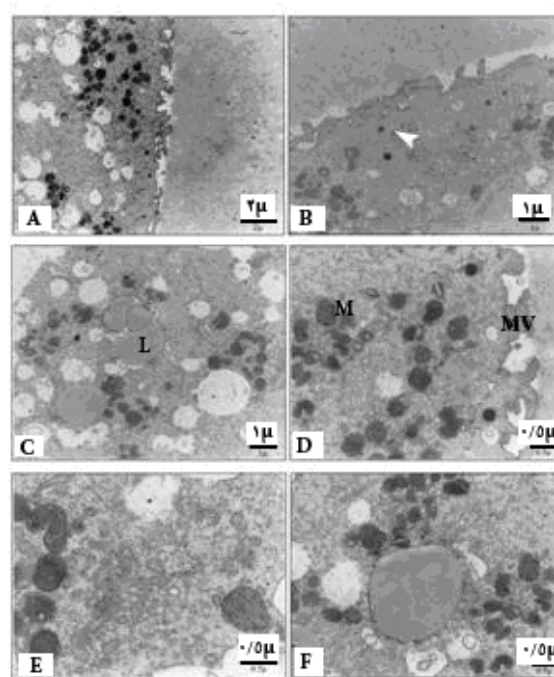


شکل ۵. میکروگراف الکترونی تخمک بالغ شده پس از انجماد شیشه‌ای با روش Solid Surface، MV: میکروویلی، V: واکوئل، M: میتوکندری، L: قطره چربی

بحث

اجتناب از مشکلات اخلاقی و قانونی همراه با انجماد جنین، ارایه روش‌های جدید برای حفظ توانایی باروری در افراد مبتلا به بدخیمی‌ها از یک سو، جمع‌آوری تخمک‌های آماده برای اهدا و در نهایت تحقیقات از سوی دیگر سبب شده تا انجماد تخمک در سالهای اخیر مورد توجه خاصی قرار گیرد. با این وجود کسب انجماد موفق خصوصاً در پستانداران، سخت و توأم با مشکلات فراوانی است. بهبود شرایط انجمادی، استفاده از روش‌های

پلاسمایی تخمک، میتوکندری‌های مجتمع شده در حد فاصل واکوئل‌ها، واکوئل‌های غشادار و دارای غلاف شبکه آندوپلاسمی صاف، قطرات چربی در حال شکل‌گیری و کاملاً شکل گرفته، تجمعات وزیکولی در سیتوپلاسم تخمک مشاهده شد (شکل ۴، C-F).



شکل ۴. میکروگراف الکترونی تخمک بالغ شده پس از انجماد شیشه‌ای با روش Cryotop، L: قطره چربی، M: میتوکندری، MV: میکروویلی، (►) گرانول‌های قشری

گروه انجمادی SSV

برش‌های نازک تخمک‌های بالغ شده در این گروه انجمادی، منطقه شفاف دارای ترک و سطح خارجی ناصاف، فضای حاوی میکروویلی مابین تخمک و منطقه شفاف، گرانول‌های قشری کم با تراکم متفاوت و گروهی نیز جمع شده بود، را نشان داد (شکل ۵، A-C). واکوئل‌های بزرگ و کوچک و قطرات چربی در حال شکل‌گیری یا شکل گرفته و تجمعات میتوکندری‌هایی با تراکم‌های متفاوت در سرتاسر سیتوپلاسم

ConV و SSV دارای شکاف در منطقه شفاف خود بودند؛ اما تخمک گروه CTV منطقه شفاف کاملاً یکدستی داشت. درکل، پس از انجماد میزان گرانول‌های قشری موجود در زیر غشای پلاسمایی تخمک‌ها کاهش یافته بود؛ اما در تخمک‌های گروه ConV و SSV علاوه بر کاهش تعداد گرانول‌های قشری تراکم آن‌ها نیز یکسان نبود، بعضی از آن‌ها روشن و بعضی تیره بودند و حتی گرانول‌های در حال تخلیه نیز مشاهده شد.

گروهی از محققین هیچ تفاوت فراساختاری بین تخمک‌های منجمد شده به روش انجماد شیشه‌ای و تخمک‌های گروه کنترل گزارش نکرده‌اند [۱۱]. در حالی که گروهی تورم شبکه آندوپلاسمی صاف و میتوکندری را گزارش کرده‌اند. البته نوع روش انجمادی و ضدیخ مورد استفاده در ایجاد تغییرات فراساختاری مهم است [۳۱-۳۳].

همچنین در تحقیق حاضر هیچ علایمی از متورم شدن شبکه آندوپلاسمی صاف و میتوکندری همراه آن مشاهده نشد و تنها پس از انجماد، میتوکندری‌ها از حالت پراکنده در سرتاسر سیتوپلاسم خارج شده و حالت گروه گروه پیدا کرده و در اطراف قطرات چربی مجتمع شده بود. در انتها به نظر می‌رسد که انجماد و بلوغ آزمایشگاهی توده‌های COC در گروه انجمادی CTV هیچ تأثیر مشخص بر فراساختار تخمک‌ها ندارد، اما در گروه ConV تغییرات فراساختاری مشاهده می‌شود که ظاهراً بر بلوغ آن‌ها تأثیر منفی داشته است. باید توجه داشت که تخمک‌ها در گروه SSV نیز تقریباً شرایط خوبی را داشتند و تغییرات فراساختاری اندکی ایجاد شده بود. از آنجایی که محلول انجمادی مورد استفاده، زمان تعادل و انجماد در هر سه گروه یکسان بود، تفاوت‌های مشاهده شده را می‌توان به حجم بیشتر محلول انجمادی در بر گیرنده نمونه انجمادی در گروه انجمادی ConV و تأخیر در سرعت انجماد در گروه انجمادی SSV نسبت داد. با توجه به اینکه تغییرات فراساختاری ایجاد شده در گروه کنترل پس از پروسه بلوغ آزمایشگاهی قابل چشم‌پوشی بود بنابراین می‌توان گفت که تغییرات فراساختاری

انجمادی نوین براساس استفاده از حداقل محلول انجمادی و حداکثر سرعت انجمادی و بهبود شرایط بلوغ آزمایشگاهی از جمله تلاش‌های صورت گرفته در این زمینه است. در این مطالعه تأثیر سه روش مختلف انجماد شیشه‌ای و بلوغ آزمایشگاهی بر فراساختار تخمک‌های گوسفند ارزیابی و مقایسه شد.

تغییرات فراساختاری مختلفی از جمله ایجاد ترک یا شکاف در منطقه شفاف، تخریب دوک میوزی، مهاجرت محیطی گرانول‌های قشری و غیره متعاقب انجماد تخمک مشاهده شده است که این تغییرات از جمله موارد مهم و مؤثری است که توانایی تکوین تخمک‌ها را در مراحل بعدی تحت تأثیر قرار می‌دهد. [۲۷-۲۹]. از طرف دیگر حضور واکوئل در اووپلاسم تخمک پس از انجماد شیشه‌ای، مشخصه غیراختصاصی است که در پاسخ به آسیب‌های سرمایی پس از انجماد مشاهده می‌شود، این خصوصیت نه تنها در تحقیق حاضر بلکه در تحقیقاتی که توسط محققین قبلی و در گونه‌های دیگر نیز انجام شده بود، مشاهده شده است [۲۸ و ۲۹]، باید توجه داشت که ناتوانی باروری یکی از عوارض ناشی از ایجاد واکوئل در اووپلاسم است [۲۹].

علاوه بر ایجاد واکوئل در اووپلاسم، آسیب به میتوکندری، پارگی اوولما، کاهش میکروویلی و نشانه‌هایی از تخریب تخمک از جمله تغییرات فراساختاری گزارش شده پس از انجماد است [۲۸ و ۳۰]. در تخمک‌های منجمد شده به روش ConV و بالغ شده به روش آزمایشگاهی، کاهش تعداد میکروویلی‌های سطحی و آسیب به میتوکندری مشاهده شد، اما در تخمک‌های گروه‌های دیگر چنین علایمی مشاهده نشد. از طرف دیگر کاهش تعداد و تراکم گرانول‌های قشری و افزایش تراکم قسمت داخلی منطقه شفاف و آزاد شدن زود هنگام گرانول‌های قشری در تخمک‌های منجمد و ذوب شده بسیار گزارش شده است [۳۱، ۲۹ و ۳۲]. در تحقیق حاضر در منطقه شفاف تخمک‌های منجمد شده به هر سه روش تغییر تراکمی مشاهده نشد و فقط تخمک‌های بالغ گروه انجمادی

سایر روش‌های انجمادی کمترین میزان تغییرات فراساختاری را در تخمک‌های گوسفند باعث می‌شود و شرایطی شبیه به گروه کنترل را ایجاد می‌نماید.

صرفاً به علت روند انجماد شیشه‌ای ایجاد شده است و بلوغ آزمایشگاهی تأثیر چندانی در این امر ندارد. در کل، انجماد شیشه‌ای با روش Cryotop در مقایسه با

References

1. **Ambrosini G, Andrisani A, Porcu E, Rebellato E, Revelli A, et al.** Oocytes cryopreservation: state of art. *Reprod Toxicol* 2006; 22: 250-62.
2. **Pereira RM, Marques CC.** Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank* 2008; 9: 267-77.
3. **Gosden RG.** Prospects for oocyte banking and in vitro maturation. *JNCI Monog* 2005; 34: 60-3.
4. **Jain JK, Paulson RJ.** Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2006; 86(suppl 3): 1037-46.
5. **Fernandez CB, Peres KR, Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC.** The use of transmission electron microscopy and oocyte transfer to evaluate in vitro maturation of equine oocytes in different culture conditions. *J Equine Vet Sci* 2006; 26(4): 159-67.
6. **Carrell DT, Moskovtsev S, Chohan KR, Peterson CM.** Ovarian folliculogenesis: emerging role of in vitro maturation of oocytes and follicles in clinical practice. *Clin Obstet Gynecol* 2003; 46: 239-53.
7. **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.
8. **Shi LY, Jin HF, Kim JG, Kumar BM, Balasubramanian S, Choe SY, et al.** Ultrastructural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. *Anim Reprod Sci* 2007; 100: 128-40.
9. **Sathananthan AH, Selvaraj K, Girijashankar ML, Ganesh V, Selvaraj P, Trounson AO.** From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Micros Res Tech* 2006; 69: 396-407.
10. **Yang YJ, Zhang YJ, Li Y.** Ultrastructure of human oocytes of different maturity stages and the alteration during in vitro maturation. *Fertil Steril* 2009; 92(1): 396. e1-6.
11. **Valojerdi MR, Salehnia M.** Developmental potential and ultrastructural injuries of metaphase II mouse oocytes after slow freezing or vitrification. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22(3): 119-27.
12. **Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Siddiqui MA.** Effect of different factors on the recovery of oocytes for IVM-IVF procedures in sheep. *Small Rum Res* 1999; 34: 71-6.
13. **Cetin Y, Bastan A.** Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. *Anim Reprod Sci* 2006; 92: 29-36.
14. **Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Hosseini SM, Karimi I.** The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. *Small Rum Res* 2007; 68: 291-95.
15. **Wani NA.** In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Rum Res* 2002; 44: 89-95.
16. **Kuwayama M.** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11(3): 300-8.
17. **Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chen HF, Ho HN, Yang YS.** Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open

- pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod* 2001; 16: 2350-6.
18. **Chen SU, Lien YL, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS.** Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum Reprod* 2000; 15: 2598-603.
 19. **Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT.** Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology* 2007; 67: 238-48.
 20. **Kuwayama M.** All around vitrification of human oocytes and embryo. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17(8): 477.
 21. **Succu S, Leoni GG, Berlinguer F, Madeddu M, Bebbere D, Mossa F, et al.** Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes. *Theriogenology* 2007; 68: 107-14.
 22. **Mossa F, Leoni GG, Berlinguer F, Succu S, Madeddu M, Bebbere D, et al.** Recovery of COCs from ovaries with high follicle numbers enhances in vitro embryo yield in sheep. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 134-45.
 23. **Keefer CL, keystone A, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, et al.** Production of cloned goat after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod* 2002; 66: 199-203.
 24. **Fuku E, Xia L, Downey BR.** Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1995; 32: 139-56.
 25. **Eroglu A, Toth TL, Toner M.** Alterations of cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril* 1998; 69: 944-57.
 26. **Motta PM, Nottola SA, Micara G, Familiari G.** Ultrastructure of human unfertilized oocytes and polyspermic embryos in an IVF-ET program. *Ann NY Acad Sci* 1988; 541:367-83.
 27. **Asada M, Horii M, Mogoe T, Fukui Y, Ishikawa H, Ohsumi S.** In vitro maturation and ultrastructural observation of cryopreserved minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) follicular oocytes. *Biol Reprod* 2000; 62: 253-9.
 28. **Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, et al.** Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil Steril* 2005; 83: 1635-40.
 29. **Nottola SA, Macchiarelli G, Coticchio G, Bianchi S, Cecconi S, De Santis L, et al.** Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations. *Hum Reprod* 2007; 22(4): 1123-33.
 30. **ElShafie M, Sousa M, Windt M-L, Kruger TF.** *An Atlas of the Ultrastructure of Human Oocytes.* Parthenon Publishing, New York, USA 2000.
 31. **Ghetler Y, Skutelsky E, Ben Nun I, Ben Dor L, Amihai D, Shalgi R.** Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules. *Fertil Steril* 2006; 86: 210-6.
 32. **Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R.** Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertil Steril* 2009; 91(4): 1023-34.
 33. **Vincent C, Pickering SJ, Jhonson MH, Quick SJ.** Dimethyl sulphoxide affects the organization of microfilaments in the mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 227-35.