Spring (2023) 11(4): 117-128
DOI: 10.30473/EAB.2023.68842.1921
Received: 14 Aug 2023 Accepted: 21 Aug 2023

Experimental Animal Biology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Comparative investigation of the expression level of autophagy genes (Atg5 and Beclin-1) in mouse MII oocytes after vitrification with two different freezing solutions by cryotop method

Hamed Daneshpazhouh[1], Nasim Hayati roodbari[1], Mehdi Dianatpour[1,2*], Yaser Tahamtani[3], Zahra Khodabandeh[2]

[1] Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2] Stem Cells Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[3] Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

Correspondence
Mehdi Dianatpour
Email: mdianatpur@gmail.com

How to cite
Daneshpazhouh, H., Hayati roodbari, N., Dianatpour, M., Tahamtani, Y. & Khodabandeh, Z. (2023). Comparative investigation of the expression level of autophagy genes (Atg5 and Beclin-1) in mouse MII oocytes after vitrification with two different freezing solutions by cryotop method. Experimental Animal Biology, 12(4), 117-128.

ABSTRACT
Freezing is a long-term egg storage method that plays an important role in assisted reproductive methods. The aim of the present study is to investigate the effect of freezing solutions and docetaxel on the expression changes of autophagy genes such as Atg5 and Beclin-1 in mouse MII oocytes after glass freezing by cryotop method. To achieve this goal, mouse MII oocytes were collected and frozen in two different concentrations of 15% ethylene glycol, 15% dimethyl sulfoxide and 0.5 M sucrose in group A (VS1) and 7.5% ethylene glycol, glycerol. 7.5% and 0.5 M sucrose were frozen in group B (VS2) and some groups were affected by docetaxel before freezing. After thawing, the eggs were fertilized.The percentage of survival and fertilization of frozen and thawed oocytes was evaluated and the expression changes of genes (Atg5 and Beclin-1) were investigated by RT-PCR method. The results showed that there are significant differences between the percentage of survival and the percentage of fertilization in the freezing groups compared to the control group ($P<0.05$). The percentage of survival and fertilization in the VS1 group decreased compared to the VS2 group. Also, the percentage of survival and conception of the groups pre-incubated with Docetaxel was higher than the non-incubated groups. This study showed that vitrification with cryotop changes the transcript levels of autophagy genes in frozen-thawed MII oocytes, and pre-incubation of oocytes with docetaxel before vitrification can decrease the transcript levels of Atg5 and Beclin-1 in the experimental groups and above Increase the percentage of survival and the percentage of formation of two-celled embryos.

KEYWORDS
Vitrification, oocyte, Docetaxel, Cryotop, ATG5, Beclin-1.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال یازدهم، شماره چهارم، پیاپی چهل‌وچهارم، بهار ۱۴۰۲ (۱۲۸-۱۱۷)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۳۰

DOI: 10.30473/EAB.2023.68842.1921

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

بررسی مقایسه‌ای میزان بیان ژن‌های اتوفاژی (Atg5 و Beclin-1) در تخمک MII موش سوری پس از انجماد شیشه‌ای با دو محلول انجمادی مختلف به روش کرایوتاپ

حامد دانش‌پژوه[۱]، نسیم حیات رودباری[۱]، مهدی دیانت‌پور[۱و۲*]، یاسر تهمتنی[۳]، زهرا خدابنده جهرمی[۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[۲] مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

[۳] گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، موسسه زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی رویان، ACECR، تهران، ایران.

چکیده

انجماد یک روش نگه‌داری طولانی مدت تخمک می‌باشد که در روش‌های کمکی باروری نقش مهمی دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر دو محلول انجمادی و دوستاکسل بر تغییر بیان ژن‌های اتوفاژی همچون Atg5 و Beclin-1 در تخمک MII موش سوری پس از انجماد شیشه‌ای با روش کرایوتاپ می‌باشد. برای رسیدن به این هدف، تخمک‌های MII موش سوری جمع‌آوری شده و در دو غلظت متفاوت از محلول‌های انجمادی اتیلن گلیکول ۱۵٪، دی متیل سولفوکساید ۱۵٪ و سوکروز ۰/۵ مولار در گروه A(VS1) و اتیلن گلیکول ۷/۵ ٪، گلیسرول ۷/۵ ٪ و سوکروز ۰/۵ مولار در گروه B(VS2) منجمد شدند و برخی از گروه‌ها قبل از انجماد تحت تاثیر دوستاکسل قرار گرفتند. پس از ذوب، تخمک‌ها لقاح داده شدند. درصد زنده‌مانی و لقاح تخمک‌های منجمد و ذوب شده ارزیابی و تغییر بیان ژن‌های (Atg5 و Beclin-1) با روش RT-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد تفاوت‌های معنی‌داری بین درصد بقا و درصد لقاح گروه‌های انجمادی در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد ($P<0.05$). درصد زنده‌مانی و لقاح در گروه VS1 نسبت به گروه VS2 کاهش یافت. همچنین درصد زنده‌مانی و لقاح گروه‌های پیش انکوبه شده با دوستاکسل بیشتر از گروه‌های انکوبه نشده بود. این مطالعه نشان داد انجماد شیشه‌ای با کرایوتاپ، ترازهای نسخه‌برداری ژن‌های اتوفاژی را در اووسیت‌های MII منجمد ذوب شده تغییر می‌دهد همچنین پیش انکوبه کردن اووسیت با دوستاکسل قبل از انجماد شیشه‌ای می‌تواند تراز نسخه‌برداری Atg5 و Beclin-1 را در گروه‌های آزمایشی کاهش دهد و در بالا بردن درصد بقا و درصد تشکیل جنین‌های دوسلولی موثر واقع شود.

واژه‌های کلیدی

انجماد شیشه‌ای، تخمک، دوستاکسل، کرایوتاپ، Atg5 و Beclin-1.

نویسنده مسئول:

مهدی دیانت‌پور

رایانامه: mdianatpur@gmail.com

استناد به این مقاله:

دانش‌پژوه، حامد، حیات رودباری، نسیم، دیانت‌پور، مهدی، خدابنده جهرمی، زهرا و تهمتنی، یاسر (۱۴۰۲). بررسی مقایسه‌ای میزان بیان ژن‌های اتوفاژی (Atg5 و Beclin-1) در تخمک MII موش سوری پس از انجماد شیشه‌ای با دو محلول انجمادی مختلف به روش کرایوتاپ. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۱(۴)، ۱۲۸-۱۱۷.

مقدمه

اتوفاژی یک سیستم دژنراسیون لیزوزومی درون سلولی مهم است که می‌تواند ارگانل‌ها و ماکرومولکول‌ها را تخریب و بازسازی کند(Klionsky & Emr, 2000). در گذشته اتوفاژی با آپاپتوز و نکروز، به‌عنوان یک مکانیسم مرگ سلولی شناخته شده بود اما امروزه به‌طور گسترده به‌عنوان یک پاسخ سازشی مورد استفاده برای بقاء سلول‌های تحت شرایط استرس پذیرفته شده است (Mizushima, 2007). ماکرومولکول‌ها و ارگانل‌های درون سلولی متعدد می‌توانند به‌وسیله وزیکول‌های دولایه‌ای که اتوفاگوزوم نامیده می‌شود فراگرفته شده و ادغام این وزیکول‌ها با لیزوزوم‌ها باعث تشکیل اتوفاگولیزوزوم می‌شود و در آنجا مواد درونی متعاقبا تخریب می‌شوند(Klionsky et al, 2007).

انجماد (cryopreservation) یک روش نگه‌داری طولانی‌مدت تخمک و جنین می‌باشد که در روش‌های کمکی باروری(ART) نقش مهمی دارد (Dhali et al, 2007). پیشرفت‌های اخیر در این علم، انجماد جنین و گامت‌های پستانداران را امکان‌پذیر ساخته است. انجماد تخمک باعث تکمیل روش‌های کمکی باروری و گسترش کاربرد آن در بین زنان بارور شده است (Jain and Paulson, 2006). انجماد شیشه‌ای تخمک یک تکنیک مؤثر است که می‌تواند پتانسیل تولیدمثلی تخمک را حفظ کند.

انجماد شیشه‌ای در حال حاضر مؤثرترین روش جهت نگهداری تخمک و جنین می‌باشد. انجماد شیشه‌ای فرایند فیزیکی است که در آن از محلول‌های انجمادی با غلظت بالا استفاده شده و از تشکیل کریستال‌های یخ جلوگیری می‌شود (دهقانی و همکاران، ۲۰۱۹؛ خدابنده جهرمی و همکاران، ۲۰۱۰). روش کرایوتاپ آخرین روش کشف شده است که در آن از حداقل حجم محلول استفاده شده و نمونه به‌طور مستقیم در تماس با نیتروژن مایع قرار می‌گیرد (کووایاما، ۲۰۰۷).

تنوعی از فاکتورها از قبیل سمیت، غلظت بالای محلول‌های انجمادی، شوک دمایی و استرس‌های اسمزی در طول انجماد شیشه‌ای ممکن است بر تخمک تاثیر بگذارند که این فاکتورها منجر به به‌هم‌ریختن ارگانل‌ها، تیرگی لایه شفاف و آسیب‌های ژنتیکی می‌شود (روزبهی، ۲۰۱۳). باتوجه به اینکه میکروتوبول‌ها و دیگر فیبرهای اسکلت سلولی تخمک ممکن است در طول انجماد شیشه‌ای دچار آسیب شده و در نتیجه باعث شکست در فرایند لقاح پس از ذوب‌شدن گردند، بنابراین پایداری رشته‌های دوکی برای انجماد شیشه‌ای موفق تخمک از اهمیت بسیاری برخوردار می‌باشد (چزمبت و همکاران، ۲۰۱۵). یکی از روش‌های مورد استفاده برای محافظت تخمک دربرابر آسیب سلولی در طول انجماد شیشه‌ای استفاده از عوامل پایدارکننده مانند سیتوکالازین B و D (Silvestre *et al*, 2006)، پاکلیتاکسل (شی و همکاران، ۲۰۰۶) و دوستاکسل می‌باشد. دوستاکسل یک عضو تازه شناخته‌شده از رده داروهای ضد سرطانی است که رده پاکلیتاکسل را هم دربر می‌گیرد (گئوریت-ووگئلین و همکاران، ۱۹۹۱؛ بیسری، ۱۹۹۵). این دارو تجمع میکروتوبول‌های توبولین را تسهیل می‌کند و با بالابردن نرخ پلیمریزاسیون توبولین به میکروتوبول‌های پایدار، از جدا شدن دایمرهای از قبل تشکیل شده میکروتوبول‌ها جلوگیری و باعث تثبیت آنها می‌گردد. این تثبیت مانع از آرایش فعال و طبیعی شبکه میکروتوبول‌ها شده که خود منجر به توقف تقسیم سلولی می‌گردد (اسپاربوم و همکاران، ۱۹۹۸؛ شی و همکاران، ۲۰۰۶).

ذوب‌کردن پس از انجماد شیشه‌ای، اتوفاژی را در تخمک‌های MII موش منجمد- ذوب شده القاء می‌کند (Soyoung et al., 2014). به‌دلیل اینکه اووسیت‌ها در معرض CPAو LN2 قرار می‌گیرند، پروسه انجماد شیشه‌ای باعث آسیب‌های اسموتیک مشخص و آسیب انجمادی به اووسیت می‌شود و احتمالا اتوفاژی نقشی را در پاسخ سازشی به آسیب‌های سلولی ایجادشده در طول انجماد شیشه‌ای و ذوب‌شدن بازی می‌کند (Soyoung et al., 2014).

اتوفاژی اغلب به‌عنوان ساز و کاری برای حفظ بقای سلولی می‌باشد (Liu et al, 2010). اما پیشرفت اتوفاژی می‌تواند منجر به مرگ سلولی شود. فرایند اتوفاژی را می‌توان به چهار مرحله تقسیم کرد: القای اتوفاژی، تشکیل اتوفاگوزوم‌ها، تجزیه محتویات درون اتوفاگوزوم‌ها و نهایتا رها شدن ماکرومولکول‌ها از اتوفاگولیزوزوم‌ها که در تمام این مراحل پروتئین‌های مختلفی از جمله Atg, LAMP1, LAMP2,Rab7, UVRAG, BECLIN1 نقش‌های مهمی را ایفا می‌کنند. همچنین مسیرهای سلولی مختلفی در القای اتوفاژی دخیل می‌باشد (Turcotte et al, 2008).

باتوجه به بررسی انجام‌شده و با عنایت به اینکه تاکنون گزارشی در مورد اثرات محلول‌های انجمادی بر روی میزان بیان ژن‌های اتوفاژی تخمک موش مشاهده نشده است، هدف از مطالعه حاضر مقایسه تاثیر محلول‌های انجمادی و همچنین دوستاکسل بر روی میزان بیان ژن‌های اتوفاژی تخمک، درصد زنده مانی و درصد لقاح تخمک‌ها تا مرحله دوسلولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی واقع در برج محمد رسول‌الله دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز انجام شد. بدین‌ترتیب که تعداد ۵۰ سر موش NMRI با سن ۸ تا ۱۰ هفته‌ای از انستیتوپاستور تهیه و به اتاق حیوانات منتقل شد. پس از گذشت دو هفته و سازگاری موش با شرایط آزمایشگاه، برای تحریک تخمک‌گذاری به موش‌های ماده ۱۰ واحد هورمون pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) و سپس ۱۰ واحد HCG (human chorionic gonadotropin) به‌صورت داخل صفاقی تزریق‌کرده و برای برداشت تخمک بالغ در مرحله متافاز دوم ۱۲ تا ۱۵ ساعت بعد از تزریق HCG، حیوان را قطع نخاع کرده و کمپلکس تخمک‌ها و کومولوس‌ها از لوله فالوپ خارج شدند.

سپس توده تخمک‌ها به همراه کومولوس را در معرض آنزیم هیالورونیداز ۰/۰۱ درصد قرار داده، تا کومولوس‌ها از اطراف تخمک‌ها جدا شوند. تخمک‌های به‌دست‌آمده ۳ بار در محیط پایه G-MOPS شستشو داده شده و تنها تخمک‌های دارای ظاهر طبیعی که در مرحله متافاز دوم قرار داشتند، برای ادامه بررسی انتخاب شدند.

تخمک‌ها به ۱۰ گروه آزمایشی به ترتیب زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل: اووسیت‌ها در معرض هیچ ماده‌ای قرار نگرفتند.

۲- گروه دوستاکسل: اووسیت‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار پیش انکوبه شدند.

۳- دوستاکسل+ VS1: اووسیت‌ها با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار برای ۲۰ دقیقه پیش انکوبه شده و سپس در معرض محلول‌های انجمادی گروه اول قرار داده شدند اما منجمد نشدند.

۴- دوستاکسل+ VS2: اووسیت‌ها با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار برای ۲۰ دقیقه پیش انکوبه شده و سپس در معرض محلول‌های انجمادی گروه دوم قرار داده شدند اما منجمد نشدند.

۵- VS1: اووسیت‌ها در معرض محلول‌های انجمادی گروه اول قرار گرفتند اما منجمد نشدند.

۶- VS2: اووسیت‌ها در معرض محلول‌های انجمادی گروه دوم قرار گرفتند اما منجمد نشدند.

۷- Vitrification1+ Docetaxel: اووسیت‌ها با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار برای ۲۰ دقیقه پیش انکوبه شده، سپس در معرض محلول‌های انجمادی گروه اول قرار داده شده و منجمد شدند.

۸- Vitrification2+ Docetaxel: اووسیت‌ها با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار برای ۲۰ دقیقه پیش انکوبه شده، سپس در معرض محلول‌های انجمادی گروه دوم قرار داده شده و منجمد شدند.

۹- Vitrification1: اووسیت‌ها بدون اینکه در معرض دوستاکسل قرار بگیرند در محیط‌های انجمادی گروه اول انجماد شیشه‌ای شدند.

۱۰- Vitrification2: اووسیت‌ها بدون اینکه در معرض دوستاکسل قرار بگیرند در محیط‌های انجمادی گروه دوم انجماد شیشه‌ای شدند.

تخمک‌های گروه آزمایشی قبل از انجماد تحت‌تاثیر دوستاکسل با غلظت ۰/۰۵ میکرومولار قرار داده شدند.

انجماد شیشه‌ای و ذوب

جهت انجماد شیشه‌ای از کرایوتاپ به‌عنوان یک ابزار ویژه که از نوار فیلمی نازک و باریک ساخته شده و به یک نگه‌دارنده پلاستیکی متصل است، استفاده شد.

تخمک‌های حاصله به دو گروه شاهد و آزمایشی تقسیم شده که تخمک‌های گروه شاهد منجمد نشده و برای بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند، اما تخمک‌ها در گروه آزمایشی به دو زیرگروه اول (با محلول انجمادی اتیلن گلیکول و دی‌متیل سولفوکساید با غلظت ۱۵٪ و سوکروز ۰/۵ مولار) و زیرگروه دوم (گلیسرول و اتیلن گلیکول با غلظت ۷/۵ ٪ و سوکروز ۰/۵ مولار) تقسیم‌شده و تحت اثر انجماد قرار گرفتند. قبل از انجماد، برخی از تخمک‌های گروه آزمایشی تحت‌تاثیر دوستاکسل قرار گرفتند. محلول‌های تعادلی حاوی نیمی از غلظت ضد یخ‌ها (۷/۵ ٪ اتیلن گلیکول + ۷/۵٪ دی متیل سولفوکسید) بدون ساکارز بود.

به‌طور خلاصه، برخی از تخمک‌ها در محیط پایه (G-Mops) حاوی ۰/۰۵ میکرومولار دوستاکسل به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. تخمک‌ها در اولین قطره تعادلی به‌مدت ۳ دقیقه قرار داده شدند. سپس، آنها به‌مدت ۱ دقیقه در محلول انجمادی نگهداری شدند. سرانجام، تخمک‌ها به سرعت در سطح کرایوپ قرار گرفتند. تخمک‌ها در گروه‌های ۱۵ تایی بر روی کرایوتوپ قرار گرفتند. محلول‌های اضافی اطراف تخمک‌ها به‌طور کامل برداشته شد. سپس، کرایوتاپ به سرعت درون نیتروژن مایع غوطه‌ور شد.

پروسه ذوب‌کردن تخمک‌ها پس از انجماد با قرار دادن مستقیم کرایوتاپ در محلول حاوی ساکارز ۱ مولار به مدت یک دقیقه و سپس غلظت‌های رقیق‌شده ساکارز (۰/۷۵ ، ۰/۵ و ۰/۲۵مولار) هرکدام به‌مدت سه دقیقه انجام شد.

جهت جداکردن تخمک‌های سالم از انواع آسیب‌دیده پس از ذوب، تخمک‌ها در زیر استریومیکروسکوپ بررسی شدند. تخمک‌هایی که دارای اووپلاسم یکدست، فضای مناسب زیرزرده‌ای و لایه شفاف بودند، برای انجام لقاح آزمایشگاهی انتخاب شدند و تخمک‌های با اووپلاسم تیره کنار گذاشته شدند.

لقاح آزمایشگاهی

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

تعیین میزان تغییر بیان ژن با روش ReaTime-PCR

تغییر بیان ژن‌های Atg5, Beclin1 در نمونه‌های اووسیت بالغ در گروه شاهد و گروه‌های آزمایشی مورد بررسی قرار گرفتند.

برای تولید و تکثیر cDNA از mRNA هر ژن، ابتدا پرایمرهای بالادست (Upstream) و پایین دست (Downstream) آن طراحی شد. برای طراحی پرایمرها از نرم‌افزار Primer3 استفاده شد. سپس استخراج RNA براساس دستورالعمل کیت استخراج RNA ساخت شرکت یکتاتجهیز، با استفاده از محلول‌های کیت استخراج و پروتوکل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. با دستگاه پیکودراپ غلظت RNA استخراج‌شده خوانده شد. این‌کار برای نرمالیزه‌کردن سنتز cDNA انجام گرفته شد. سنتز cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز (K1622) تهیه گردید. واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAid™M-MuLV Reverse transcriptas صورت گرفت. اصول انجام RT-PCR مشابه PCR معمولی بود با این تفاوت که به‌جای MasterMix معمولی از MasterMix حاوی سایبرگرین (تاکارا) استفاده گردید. دمای اتصال برای همه پرایمرها 60°C می‌باشد.

جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از Real-time PCR تمام پرایمرها توسط نرم‌افزار Primer3 طراحی شد و از ژن β-actin به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن‌های مورد نظر جهت واکنش Real-time PCR

Gene	Sequence	Size (bp)
M- Atg5-F (forward)	AACTGAAAGAGAAGCAGAACCA	105
M- Atg5-R (reverse)	TGTCTCATAACCTTCTGAAAGTGC	
M- beclin 1-F	AATCTAAGGAGTTGCCGTTATAC	187
M- beclin 1-R	CCAGTGTCTTCAATCTTGCC	
M-B-actin-F	AGTGTGACGTTGACATCCGT	120
M-B-actin-R	TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA	

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) (Tukey) برای تعیین تفاوت بین میانگین مقادیر میزان بیان ژن‌ها، بقای تخمک‌ها، لقاح استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از گروه انجمادی اول (اتیلن گلیکول ۱۵٪ + دی متیل سولفوکساید ۱۵٪ + سوکروز ۵ مولار):

جدول ۲ نتایج به‌دست‌آمده از انجماد شیشه‌ای تخمک‌های MII را در گروه انجمادی اول به‌طور خلاصه نشان می‌دهد. اگر چه درصد زنده‌مانی به‌دست‌آمده در گروه انجمادی vitrification 1

پس از ذوب درصد بالایی است اما نسبت به گروه کنترل کمتر می‌باشد (P<0.05). نتایج نشان می‌دهد درصد بقاء گروه کنترل با گروه vitrification 1 دارای اختلاف معنی‌دار بوده (P<0.05) و بقیه گروه‌ها از نظر درصد بقاء اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (P>0.05).

جدول ۲. نتایج انجماد شیشه‌ای تخمک با استفاده از کرایوتاپ در گروه انجمادی اول

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

مطابق جدول۲ نرخ بقاء تخمک‌های منجمد- ذوب‌شده در گروه D+Vitrification در مقایسه با گروه Vitrification به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (P=0.001).

تخمک‌ها پس از انجماد- ذوب در گروه‌های آزمایشی و کنترل تحت عمل لقاح آزمایشگاهی قرار داده شدند. پس از انجام لقاح آزمایشگاهی، درصد تشکیل جنین‌های دوسلولی بررسی شد. مطابق جدول ۲ کاهش معنی‌داری در نرخ لقاح هر گروه در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد (P<0.05).

از نظر درصد لقاح گروه کنترل با گروه‌های Docetaxel + VS1, D+Vitrification1, Vitrification 1 دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد (P<0.05).

درصد لقاح گروه دوستاکسل نیز با گروه‌های Docetaxel +VS1, D+Vitrification1, Vitrification1 دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<0.05).

می‌توان گفت درصد لقاح گروه‌های غیرانجمادی (کنترل و دوستاکسل) با گروه‌های انجمادی (Docetaxel + VS1, D+Vitrification1, Vitrification1) دارای اختلاف معنی‌دار بوده (P<0.05) و نرخ تشکیل جنین‌های دوسلولی پس از IVF به‌طور معنی‌داری در دو گروه انجمادی (D+Vitrification1, Vitrification1) پایین‌تر از گروه‌های غیرانجمادی (کنترل و دوستاکسل) بود (P<0.05).

در مجموع می‌توان گفت زیرگروه‌های انجمادی اول ازنظر درصد بقاء فاقد اختلاف معنی‌دار و از نظر درصد لقاح دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

نتایج حاصل از گروه انجمادی دوم (اتیلن گلیکول ۷/۵ ٪ + گلیسرول۷/۵ ٪ + سوکروز ۵ مولار)

همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود درصد بقاء گروه‌های Docetaxel, Vitrification2, D+VS2, D+Vitrification2 نسبت به گروه کنترل کاهش‌یافته و دارای اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل می‌باشند (P<0.05).

درصد زنده مانی گروه Docetaxel+ Vitrification2 با گروه کنترل، دوستاکسل و Vitrification2 (P=0.05) دارای اختلاف معنی‌دار بوده (P<0.05)، درحالی‌که گروه Vitrification2 با گروه کنترل، دوستاکسل، D+VS2 (P<0.05) و D+Vitrification2 (P=0.05) دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<0.05).

مطابق جدول۳ گروه کنترل از نظر درصد لقاح آزمایشگاهی دارای تفاوت معنی‌دار با بقیه گروه‌ها (D+vitrification 2 و Vitrification2 و D+VS2 و دوستاکسل) می‌باشد (P<0.05).

گروه دوستاکسل دارای اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، D+Vitrification2,Vitrification2 می‌باشد (P<0.05) درحالی‌که با گروه‌های Vitrification2 و D+Vitrification2 دارای اختلاف معنی‌دارتری می‌باشد (P<0.001).

گروه D+ VS2 دارای اختلاف معنی‌دار با گروه‌های D+Vitrification2,Vitrification2 می‌باشد (P<0.05).

گروه D+Vit2 دارای اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، دوستاکسل و D+VS2 می‌باشد (P<0.001) و گروه Vitrification2 با گروه‌های کنترل، دوستاکسل و D+VS2 دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<0.001).

جدول ۳. نتایج انجماد شیشه‌ای تخمک در گروه انجمادی دوم

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

مطابق جدول ۴ درصد بقاء گروه‌های مختلف آزمایشی دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می‌باشد (P<0.05). همچنین درصد لقاح گروه‌ها نیز دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می‌باشد (P<0.001).

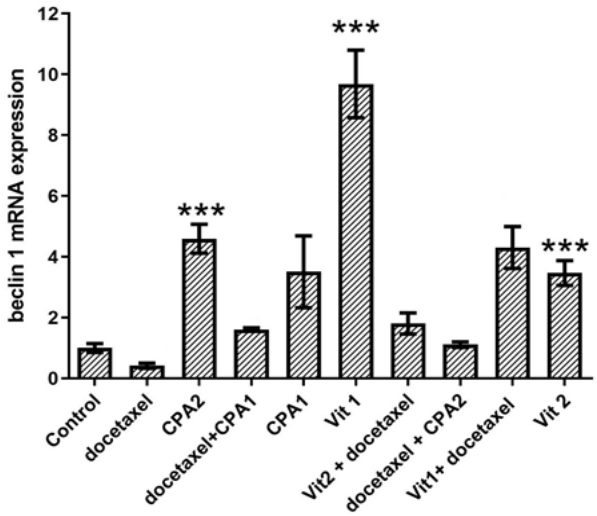
جدول ٤. مقایسه درصد بقا و درصد لقاح گروه‌های مختلف آزمایشی

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

نتایج حاصل از بیان ژن Beclin1 در کلیه گروه‌ها

شکل ۱ نتایج حاصل از بیان ژن Beclin1 را در گروه‌های انجمادی نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد، میزان بیان ژن Beclin1 در گروه‌های انجمادی و غیر انجمادی بالاتر از گروه کنترل می‌باشد و دوستاکسل میزان بیان این ژن را در کلیه گروه‌های انجمادی و غیر انجمادی پایین‌تر آورده است.

همچنین آنالیز واریانس یکطرفه در گروه اول تفاوت‌های معنی‌داری را بین گروه‌های کنترل با Vit1 (P<0.001) نشان داد. همچنین آزمون واریانس یکطرفه نشان داد تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های کنترل با گروه CPA2 (P<0.001) و کنترل با Vit2 (P<0.001) گروه دوم وجود دارد.

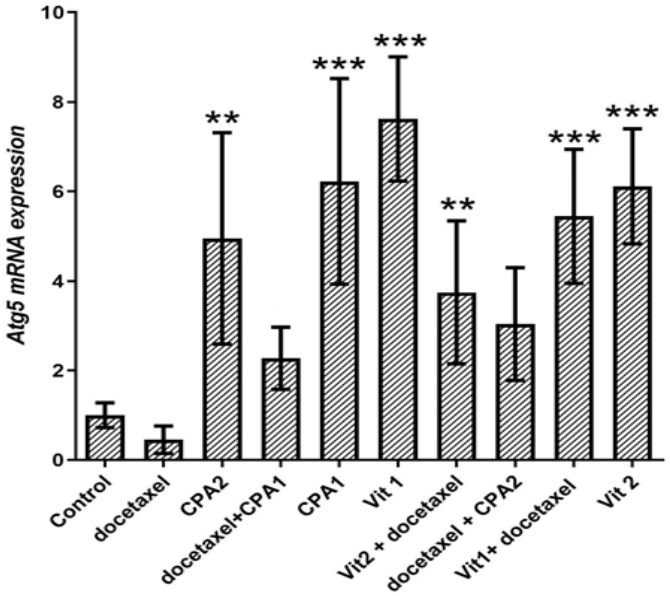


شکل ۱. نتایج حاصل از بیان ژن Beclin1 در گروه‌های انجمادی و غیر انجمادی.

*** اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل(P<0/001)

نتایج حاصل از بیان ژن Atg5 در کلیه گروه‌ها

شکل ۲ نتایج حاصل از بیان ژن Atg5 را در کلیه گروه‌های انجمادی و غیرانجمادی نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌کنید میزان بیان ژن Atg5 در گروه‌های انجمادی و غیرانجمادی بالاتر از گروه کنترل می‌باشد و دوستاکسل میزان بیان این ژن را در کلیه گروه‌های انجمادی و غیرانجمادی پایین‌تر آورده است. همچنین آزمون واریانس یکطرفه نشان داد در گروه اول اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کنترل با گروه CPA1 (P<0.001)، کنترل با Vit1 (P<0.001) و کنترل با Vit1 + Docetaxel (P<0.001) وجود دارد. همچنین آزمون واریانس یکطرفه نشان داد در گروه دوم اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کنترل با CPA2 (P<0.01)، کنترل با Vit2 (P<0.001) و کنترل با Vit2 + Docetaxel (P<0.01) وجود دارد.



شکل ۲. نتایج حاصل از بیان ژن Atg5 در گروه‌های انجمادی و غیر انجمادی.
** اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل (P<0/01)
*** اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل (P<0/001)

بحث

مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی اثرات انجماد شیشه‌ای و محلول‌های انجمادی بر روی زنده‌مانی، لقاح آزمایشگاهی و میزان بیان ژن‌های اتوفاژی تخمک‌های بالغ موش در مرحله متافاز دوم انجام شد. منجمدکردن تخمک یک روش حفظ باروری در خانم‌ها می‌باشد. هرچند که میزان حاملگی اندک و تعداد محدودی تولد زنده از تخمک‌های منجمدشده گزارش شده است. یکی از مشکلاتی که در مورد انجماد تخمک‌های بالغ وجود دارد، به‌هم‌ریختگی آرایش اندامک‌های سلولی به‌ویژه اسکلت سلولی می‌باشد (سیوتی و همکاران، ۲۰۰۹). این عامل منجر به کاهش توانایی زنده‌مانی تخمک و جنین پس از انجماد می‌گردد. باتوجه به اینکه میکروتوبول‌ها و دیگر فیبرهای اسکلت سلولی ممکن است در طول انجماد شیشه‌ای دچار آسیب شده و درنتیجه باعث شکست در پروسه لقاح پس از ذوب‌شدن گردند، پایداری رشته‌های دوکی برای انجماد شیشه‌ای موفق تخمک‌ها بسیار مهم می‌باشد. دوستاکسل یک عامل پایدارکننده است که می‌تواند با مهار تجمع میکروتوبول‌های توبولین در طی انجماد، باعث تثبیت میکروتوبول‌ها شود (شی و همکاران، ۲۰۰۶). آرایش نرمال اسکلت سلولی، گرانول‌های قشری تخمک و میتوکندری پس از انجماد و ذوب می‌تواند با سطح متابولیسم، تکثیر و تمایز سلولی وابسته باشد (دیویلارد و همکاران، ۲۰۰۸؛ ژو و همکاران، ۲۰۱۶). گزارش شده که نگهداری تخمک‌ها در دمای فوق پایین (۱۹۶-) باعث القاء دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها در تخمک‌ها می‌شود (موراتو و همکاران، ۲۰۰۸). به‌علاوه دمای فوق پایین باعث شکسته‌شدن اسکلت سلولی و کروموزوم‌های تخمک می‌شود که منجر به تکوین سلولی ناکامل و شکست در پروسه لقاح پس از ذوب می‌شود (بوکیت و همکاران، ۱۹۹۲؛ بویسو و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پایداری فیبرهای دوک

با دوستاکسل می‌تواند در موفقیت انجماد شیشه‌ای تخمک‌ها در دماهای فوق پایین نقش بسزایی داشته باشد.

نتایج مطالعات قبلی نشان دادند پیش‌انکوبه کردن تخمک‌های گاو با تاکسان‌هایی از قبیل پاکلیتاکسل در غلظت پایین (امیکرومولار) برای ۳۰ دقیقه قبل از انجماد شیشه‌ای می‌تواند از شکست اسکلت سلولی در طول انجماد شیشه‌ای ممانعت کرده و درنتیجه باعث افزایش نرخ بقاء پس از ذوب شده و تکوین جنینی متعاقب آن را بهبود می‌بخشد (اشمیت و همکاران، ۲۰۰۴؛ مرواتو و همکاران، ۲۰۰۸).

در مطالعه حاضر، در هر دو گروه میزان بقاء و لقاح تخمک‌های منجمد و ذوب‌شده که قبل از انجماد با دوستاکسل پیش‌انکوبه شدند، بهتر از تخمک‌های پیش انکوبه نشده بود. بنابراین نتایج ما نیز تاییدکننده این مطلب می‌باشد که می‌توان با استفاده از دوستاکسل میزان آسیب وارده به سیتواسکلتون را به حداقل رسانید.

همچنین در مطالعه حاضر میزان تکامل به جنین دوسلولی پس از انجماد شیشه‌ای در هر گروه (انجمادی و غیرانجمادی) کاهش معنی‌داری را با گروه کنترل نشان داد. در تأیید این نتایج عابدپور و رجائی (۲۰۱۵) در سال ۲۰۱۵ ثابت کردند که انجماد شیشه‌ای باعث کاهش معنی‌داری در سرعت بلوغ تخمک‌ها می‌شود. در مطالعه آنها سرعت لقاح تخمک‌های منجمد شده اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند اما هرکدام از آنها به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بودند. عابدپور و همکارانش همچنین در سال ۲۰۱۵ نشان دادند انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ باعث آسیب به تخمک از طریق کاهش سرعت بلوغ و لقاح می‌شود.

در مطالعه حاضر درصد زنده‌مانی در کلیه گروه‌های انجمادی و غیرانجمادی نسبت به گروه کنترل کاهش یافته و نرخ بقاء تخمک‌های منجمد-ذوب‌شده در گروه D+Vitrification در مقایسه با گروه Vitrification در هر دو گروه انجمادی به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. این نتایج منطبق با نتایج چزمبت و همکاران (۲۰۱۵) بود.

در تحقیق چزمبت و همکاران (۲۰۱۵) بر روی تخمک گاو، درصد بقاء تخمک‌ها بیشتر از نتایج به‌دست آمده از تحقیق ما بوده که این می‌تواند ناشی از تفاوت در گونه حیوانی، حساسیت متفاوت گونه‌های مختلف به انجماد، درصد متفاوت ضدیخ، استفاده از ضدیخ‌ها و پروتوکل‌های انجمادی متفاوت باشد.

در مطالعه حاضر، درصد بقاء و درصد لقاح در گروه انجمادی اول پایین‌تر از گروه انجمادی دوم می‌باشد. در تحقیقی نشان داده شد پس از تست‌های سمیت (tests Toxicity) برای ۵ ضدیخ ذکر شده در جنین‌های موش مرحله مورولا، استامید از بقیه سمیتر بود و پس از آن به‌ترتیب پروپیلن گلیکول و DMSO قرار داشت درحالی‌که گلیسرول و اتیلن گلیکول سمیت کمتری داشتند به همین‌دلیل در این مطالعه از استامید که سمیت بالایی دارد استفاده نگردید و از DMSO، اتیلن گلیکول و گلیسرول که به نسبت سمیت کمتری دارند استفاده شد. (kassi et al, 2005) و ازآنجاکه غلظت ضدیخ نفوذپذیر نیز در انجماد نقش تعیین‌کننده دارد، احتمالا استفاده از غلظت بالای ضدیخ اتیلن گلیکول و دی‌متیل سولفوکساید (۱۵٪) در گروه انجمادی اول نسبت به گروه انجمادی دوم با اتیلن گلیکول و گلیسرول ۷/۵ ٪ و سمیت بیشتر ناشی از آن و همچنین سمیت بیشتر ناشی از دی‌متیل سولفوکساید نسبت به گلیسرول می‌تواند توجیهی بر پایین‌تر بودن درصد بقاء و درصد لقاح در گروه انجمادی اول نسبت به گروه دوم باشد.

هانگ و همکاران (۲۰۰۸) معتقد هستند که اتیلن گلیکول به خاطر داشتن سمیت پایین و نفوذپذیری بالا نسبت به سایر ضدیخ‌ها در انجماد تخمک نتایج بهتری به‌دنبال دارد که نتایج آنها نیز منطبق با نتایج ما می‌باشد.

Soyoung و همکاران در ۲۰۱۴ برای اولین‌بار نشان دادند ذوب‌کردن بعد از انجماد شیشه‌ای، اتوفاژی را در تخمک‌های M2 موش منجمد- ذوب‌شده القاء می‌کند و این پاسخ توسط محلول‌های انجمادی القاء نشده است. انجماد شیشه‌ای ممکن است آسیب‌های اسمزی و انجمادی روی تخمک داشته باشد و اتوفاژی به‌عنوان یک مکانیسم پاسخی یا بقایی است که توسط استرس‌های سلولی و محیطی متعدد تحریک می‌شود (Soyoung et al , 2014).

نتایج Soyoung و همکاران در ۲۰۱۴ نشان دادند CPAs خودشان به تنهایی القاگر اتوفاژی نیستند و عامل اتوفاژی افزایش یافته، پروسه انجماد به کمک LN2 می‌باشد. نتایج ما منطبق با یافته‌های آنها می‌باشد که نشان دادند تراز Beclin1 که یک پروتئین ATG ضروری برای اتوفاژی است، در اووسیت‌های منجمد- ذوب شده افزایش یافته است (Soyoung et al., 2014).

Beclin1 زمانی‌که به مخمرهای با نقص اتوفاژی یا سلول‌های پستانداران معرفی شوند، اتوفاژی را بالا می‌برند. به‌هرحال این پروتئین همچنین می‌تواند با پروتئین BCL2 برهم‌کنش نشان داده

و یک تنظیم‌گر مهم اپاپتوزیس شود بنابراین مشخص‌شده Beclin1 نقش مهمی در دو پروسه مهم سلولی از قبیل اتوفاژی و اپاپتوزیس بازی می‌کند (Yue et al., 2003). نتایج ما نیز تاییدکننده اهمیت Beclin1 در فرایند اتوفاژی تخمک می‌باشد.

همچنین پروتئین اتوفاژی ۵ که سنتز کننده یک لیگاز یوبی کوئیتین E3 است که برای اتوفاژی ضروری می‌باشد. این پروتئین توسط ژن ATG5 سنتز می‌شود.

اووسیت‌های دارای ATG5 بلااثر اگر با اسپرم تیپ وحشی لقاح پیدا کنند می‌توانند تکوین پیدا کنند اما اگر با اسپرم با ATG5 بلااثر شده لقاح پیدا کنند نمی‌توانند بیشتر از مرحله ۴ تا ۸ سلولی تکامل پیدا کنند به عبارتی نرخ سنتز پروتئین در جنین‌های با نقص اتوفاژی کاهش خواهد یافت (Tisokamoto et al., 2008). این مطالعه نیز در تایید نتایج ما اهمیت ژن ATG5 را در فرایند اتوفاژی نشان می‌دهد.

باتوجه به اینکه مطابق مطالعه تاجی و همکاران در ۱۳۹۶ بیان بالای ژن بکلین ۱ در سلول‌های MDCK به القای اتوفاژی منجر می‌شود، در مطالعه حاضر نیز بیان بالای ژن‌های atg5, beclin نشان‌دهنده افزایش تمایل سلول‌ها در تشکیل اتوفاگوزوم و در نتیجه القای اتوفاژی بعد از ذوب سلول‌های تیمار شده با سرما می‌باشد.

در مطالعه حاضر مشاهده کردیم که انجماد شیشه‌ای با کرایوتاپ، ترازهای نسخه‌برداری ژن‌های اتوفاژی (beclin1, Atg5) را در اووسیت‌های MII موش سوری بالا می‌برد و پیش انکوبه کردن اووسیت‌ها با دوستاکسل در پایین‌آمدن ترازهای نسخه‌برداری این ژن‌ها نقش دارد. همچنین مطالعه حاضر نشان داد پیش انکوبه کردن اووسیت‌های موش با دوستاکسل در پایین‌آوردن بیان ژن‌های اتوفاژی (ATG5, Beclin-1) و بهبود درصد بقاء و درصد لقاح تخمک‌ها موثر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد پیش‌انکوبه کردن اووسیت‌های M2 موش با دوستاکسل به‌مدت بیست دقیقه قبل از انجماد شیشه‌ای در غلظت ۵ ۰/۰ میکرومولار هیچ اثر مهاری بر روی درصد بقاء و درصد لقاح تخمک‌ها نداشته و در ممانعت از آسیب CSF و افزایش درصد بقاء و درصد لقاح تخمک‌ها موثر می‌باشد. این مطالعه همچنین نشان داد که انجماد شیشه‌ای اووسیت‌های M2 موش می‌تواند بیان ژن‌های اتوفاژی (Atg5, beclin 1) را در اووسیت‌های منجمد ذوب شده در هر دو گروه انجمادی بالا ببرد و پیش انکوبه کردن اووسیت‌ها با دوستاکسل در مهار آسیب وارده به سیتواسکلتن تخمک و درنتیجه کاهش فعالیت اتوفاژی تخمک نقش دارد.

این نتایج می‌توانند جهت بهبود تکنیک‌های کمک باروری و افزایش نرخ موفقیت در IVF به‌کار گرفته شوند.

References

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

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

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

Bouquet, M., Selva, J., & Auroux, M. (1992). The incidence of chromosomal abnormalities in frozen—thawed mouse oocytes after in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, *7*(1), 76-80.

Chasombat, J., Nagai, T., Parnpai, R., & Vongpralub, T. (2015). Pretreatment of in vitro matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. *Cryobiology*, *71*(2), 216-223.

Ciotti, P. M., Porcu, E., Notarangelo, L., Magrini, O., Bazzocchi, A., & Venturoli, S. (2009). Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertility and Sterility*, *91*(6), 2399-2407.

Dehghani, N., Dianatpour, M., Hosseini, S. E., Khodabandeh, Z., & Daneshpazhouh, H. (2019). Overexpression of mitochondrial genes (mitochondrial transcription factor A and cytochrome c oxidase subunit 1) in mouse metaphase II oocytes following vitrification via cryotop. *Iranian Journal of Medical Sciences*, *44*(5), 406.

Devillard, L., Vandroux, D., Tissier, C., Dumont, L., Borgeot, J., Rochette, L., & Athias, P. (2008). Involvement of microtubules in the tolerance of cardiomyocytes to cold ischemia-reperfusion. *Molecular and cellular biochemistry*, *307*, 149-157.

Gueritte-Voegelein, F., Guenard, D., Lavelle, F., Le Goff, M. T., Mangatal, L., & Potier, P. (1991). Relationships between the structure of taxol

analogs and their antimitotic activity. *Journal of medicinal chemistry*, *34*(3), 992-998.

Huang, J. Y., Chen, H. Y., Park, J. Y. S., Tan, S. L., & Chian, R. C. (2008). Comparison of spindle and chromosome configuration in in vitro-and in vivo-matured mouse oocytes after vitrification. *Fertility and Sterility*, *90*(4), 1424-1432.

Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, *290*(5497), 1717-1721.

Klionsky, D. J., Cuervo, A. M., & Seglen, P. O. (2007). Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy*, *3*(3), 181-206.

Khodabandeh Jahromi, Z., Amidi, F., Nori Mugehe, S. M. H., Sobhani, A., Mehrannia, K., Abbasi, M., ... & Ebrahimi, M. (2010). Expression of heat shock protein (HSP A1A) and MnSOD genes following vitrification of mouse MII oocytes with cryotop method. *Cell Journal (Yakhteh)*, *12*(1), 113-119.

Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, *67*(1), 73-80.

Liu, R. H., Sun, Q. Y., Li, Y. H., Jiao, L. H., & Wang, W. H. (2010). Effects of cooling on meiotic spindle structure and chromosome alignment within in vitro matured porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, *65*(2), 212-218.

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development*, *21*(22), 2861-2873.

Morató, R., Izquierdo, D., Albarracín, J. L., Anguita, B., Palomo, M. J., Jiménez-Macedo, A. R., ... & Mogas, T. (2008). Effects of pre-treating in vitro-matured bovine oocytes with the cytoskeleton stabilizing agent taxol prior to vitrification. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, *75*(1), 191-201.

Roozbehi, A. (2013). Mouse oocytes and embryos cryotop-vitrification using low concentrated solutions: Effects on meiotic spindle, genetic material array and developmental ability. *Iranian journal of basic medical sciences*, *16*(4), 590.

Soyoung, B., Hyejin, Sh., Haengseok, S., Chang, S S., Hyunjang, J L (2014). Autophagic activation in vitrified-warmed mouse oocytes. *National library of medicine*,148(1), 9-11.

Schmidt, D. W., Nedambale, T. L., Kim, C., Maier, D. B., Yang, X. J., & Tian, X. C. (2004). Effect of cytoskeleton stabilizing agents on bovine matured oocytes following vitrification. *Fertility and Sterility*, *82*, S26.

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

Sparreboom, A., van Tellingen, O., Nooijen, W. J., & Beijnen, J. H. (1998). Preclinical pharmacokinetics of paclitaxel and docetaxel. *Anti-cancer drugs*, *9*(1), 1-17.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., & Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(25), 15077-15082.

Zhou, C. J., Wang, D. H., Niu, X. X., Kong, X. W., Li, Y. J., Ren, J., ... & Liang, C. G. (2016). High survival of mouse oocytes using an optimized vitrification protocol. *Scientific reports*, *6*(1), 19465.