مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال نهم، شماره دوم، پیاپی سی و چهارم، پاییز ۱۳۹۹ (۸۱-۷۳)

تأثیر دوستاکسل بر اسکلت سلولی تخمک موش سوری پس از انجماد شیشه‌ای به روش کرایوتاپ

نعیمه دهقانی[۱]، مهدی دیانت‌پور[۲*]، سید ابراهیم حسینی[۳]، زهرا خدابنده[٤]، حامد دانش‌پژوه[٥]

۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز و دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
۳. استاد، گروه زیست‌شناسی، داشکده علوم پایه، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی
٤. استادیار، مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
۵. دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۱٤ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰)

چکیده

دوستاکسل به‌عنوان یک عامل پایدارکننده، می‌تواند به‌طور بالقوه آسیب واردشده به اسکلت سلولی تخمک را در طول انجماد شیشه‌ای کاهش دهد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر داروی دوستاکسل بر روی درصد بقا و لقاح آزمایشگاهی تخمک‌ها پس از انجماد شیشه‌ای است. موش‌های ماده نژاد NMRI با سن ۸ تا ۱۰ هفته با تزریق هورمون‌های PMSG و HCG تحریک تخمک‌گذاری شدند. با استفاده از آنزیم هیالورونیداز ۰/۱٪ توده سلولی کومولوس اطراف تخمک برداشته شد. سپس تخمک‌ها به ۵ گروه آزمایشی شامل گروه‌های کنترل، دوستاکسل، دوستاکسل+ محلول انجمادی، دوستاکسل+ انجماد شیشه‌ای و انجماد شیشه‌ای تقسیم شدند. تخمک‌های بالغ در محلول‌های انجمادی اتیلن گلیکول و دی متیل سولفوکساید با غلظت ۱۵ درصد و ساکارز ۰/۵ مولار منجمد شدند. پس از ذوب، درصد بقا و لقاح آنها تا مرحله دو سلولی بررسی شد. رنگ‌آمیزی میکروتوبول‌ها در تخمک‌ها با آنتی‌بادی آلفاتوبولین انجام شد. میزان لقاح هر گروه در مقایسه با گروه کنترل، کاهش قابل‌توجهی نشان داد (P =۰/۰۰۱). میزان تشکیل جنین‌های دو سلولی در هر دو گروه انجمادی (دوستاکسل+ انجماد شیشه‌ای و انجماد شیشه‌ای) به‌طور قابل‌توجهی نسبت به غیرانجمادی کنترل (P=۰/۰۰۱) و دوستاکسل (P=۰/۰۰٤) پایین‌تر بود. نتایج نشان داد که درصد بقا و لقاح در گروه‌های پیش‌انکوبه‌شده با دوستاکسل بیشتر از گروه‌های انکوبه نشده بود، بنابراین دوستاکسل با کاهش آسیب‌های وارده به اسکلت سلولی تخمک می‌تواند در بهبود تکنیک‌های تولید مثلی مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: انجماد شیشه‌ای، تخمک، دوستاکسل، کرایوتاپ.

Evaluation of the Effect of Docetaxel on Cryotop-Vitrification of Mouse Oocytes

Naeimeh Dehghani[1], Mehdi Dianatpour[2*], Seyed Ebrahim Hosseini[3], Zahra Khodabandeh[4], Hamed Daneshpazhouh[5]

1. Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor Unviersity, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Stem Cells Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran and Associated Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3. Professor, Department of Biology, College of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
4. Assistant professor, Stem Cells Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
5. Ph.D., Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran

(Received: May 04, 2019 - Accepted: Feb. 29, 2020)

Abstract

As a stabilizing agent, docetaxel can potentially reduce the damage to the oocyte cytoskeleton during vitrification. The aim of the present study was to investigate the effect of docetaxel on the survival rate and in vitro fertilization of oocytes after vitrification. NMRI mice (8-10 weeks old) were superovulated by injecting PMSG and HCG. *Oocytes* are surrounded by cumulus and corona cells and must be denuded by 0.1% hyaluronidase enzyme. The oocytes were then divided into 5 experimental groups including control, docetaxel, docetaxel+vitrification solution; docetaxel+ vitrification and vitrification. Mature oocytes were vitrified in ethylene glycol and dimethyl sulfoxide solutions at 15% concentration and 0.5 M sucrose. After thawing, their survival and fertilization rates were assessed up to the two-cell stage. Staining of the microtubules in the oocytes was performed with alpha-tubulin antibody. The fertilization rate of each group showed a significant decrease compared to the control group (P=0.001). The rate of formation of 2-cell embryos in both vitrified groups (docetaxel+ vitrified and vitrified vitrified) was significantly lower than non-vitrified (control (P=0.001) and docetaxel ((P=0.004)). The results showed that survival and fertilization rates in pre-incubated groups with docetaxel were higher than non-incubated groups, so docetaxel could improve reproductive techniques by reducing the damage to the oocyte cytoskeleton.

Keywords: Cryotop, Docetaxel, Oocytes, Vitrification.

* نویسندهٔ مسئول: مهدی دیانت‌پور Email: mdianatpur@gmail.com

مقدمه

انجماد، یک روش نگهداری طولانی‌مدت تخمک و جنین است که در روش‌های کمکی باروری نقش مهمی دارد (Ledda *et al*., 2006). انجماد تخمک دارای اهمیت کلینیکی زیادی است. امروزه برای حفظ باروری در زنانی که در معرض خطر از دست‌دادن عملکرد تخمدان هستند، از جمله زنان مبتلا به سرطان (به دلیل استفاده از شیمی درمانی و پرتو درمانی یا نواقص ژنتیکی)، بیماری‌های لگنی، مادرزادی، سندرم پلی‌کیستیک (PCO)، بیماری‌های خودایمنی و ناهنجاری‌های هماتولوژی و یائسگی زودرس، از روش‌های مختلف انجماد تخمک استفاده می‌شود. کاربرد دیگر انجماد تخمک در زمینه تحقیقاتی، مهندسی ژنتیک، ایجاد بانک تخمک برای زنان جوانی است که زمان باروری خود را به دلایل مختلف به تأخیر می‌اندازند (مشکلات اقتصادی) و نیز حفظ منابع ژنتیکی حیواناتی است که ارزش اقتصادی دارند (Gomes *et al.,* 2008). انجماد شیشه‌ای در حال حاضر مؤثرترین روش برای نگهداری تخمک و جنین است. انجماد شیشه‌ای فرایند فیزیکی است که در آن از محلول‌های انجمادی با غلظت بالا استفاده شده و از تشکیل کریستال‌های یخ جلوگیری می‌شود (Dehghani *et al.,* 2019; Jahromi *et al.,* 2010). 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 می گیرد (Kuwayama, 2007).

تنوعی از فاکتورها از قبیل سمیت، غلظت بالای محلول‌های انجمادی، شوک دمایی و استرس‌های اسمزی در طول انجماد شیشه‌ای ممکن است بر تخمک تأثیر بگذارند که این فاکتورها منجر به بهم ریختن ارگانل‌ها، تیرگی لایه شفاف و آسیب‌های ژنتیکی می‌شود (Roozbehi, 2013).

با توجه 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 ذوب شدن شدند. بنابراین، پایداری رشته‌های دوکی برای انجماد شیشه‌ای موفق تخمک از اهمیت بسیاری برخوردار است (Chasombat *et al.,* 2015). یکی از روش‌های مورد استفاده برای محافظت تخمک در برابر آسیب سلولی در طول انجماد شیشه‌ای، استفاده از عوامل پایدارکننده مانند سیتوکالازین B و D (Silvestre *et al*., 2006)، پاکلیتاکسل (Shi *et al.,* 2006) و دوستاکسل است. دوستاکسل یک عضو تازه شناخته‌شده از رده داروهای ضد سرطانی است که رده پاکلیتاکسل را هم دربرمی‌گیرد (Bissery, 1995; Gueritte-Voegelein *et al.,* 1991). این دارو تجمع میکروتوبول‌های توبولین را تسهیل می‌کند و با بالابردن نرخ پلیمریزاسیون توبولین به میکروتوبول‌های پایدار، از جدا شدن دایمرهای از قبل تشکیل‌شده میکروتوبول‌ها جلوگیری و باعث تثبیت آنها می‌شود. این تثبیت، مانع از آرایش فعال و طبیعی شبکه میکروتوبول‌ها شده که خود منجر به توقف تقسیم سلولی می‌شود (Shi *et al.,* 2006; Sparreboom *et al*., 1998).

با توجه بررسی انجام‌شده و با عنایت به اینکه تاکنون گزارشی در مورد اثرات دوستاکسل روی انجماد شیشه‌ای تخمک موش مشاهده نشده است، هدف از مطالعه حاضر، مقایسه تأثیر دوستاکسل روی تخمک‌ها، درصد زنده‌مانی و درصد لقاح تخمک‌ها تا مرحله دوسلولی و همچنین تأثیر دوستاکسل بر اسکلت سلولی تخمک است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی واقع در برج محمد رسول‌الله دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد. بدین ترتیب که تعداد ۵۰ سر موش NMRI با سن ۸ تا ۱۰ هفته‌ای از انستیتو پاستور 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 PMSG (pregnant mare serum

gonadotropin) و سپس ۱۰ واحدHCG (human chorionic gonadotropin) به‌صورت داخل صفاقی تزریق کرده 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 به‌همراه کومولوس را در معرض آنزیم هیالورونیداز ۰/۰۱ درصد قرار داده، تا کومولوس‌ها از اطراف تخمک‌ها جدا شوند. تخمک‌های به‌دست‌آمده سه 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 پنج گروه آزمایشی به ترتیب زیر تقسیم شدند:

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

۲. گروه دوستاکسل: تخمک‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه با دوستاکسل ۰۵/ ۰ میکرومولار پیش‌انکوبه شدند.

۳. دوستاکسل+ محلول انجمادی: تخمک‌ها با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار برای ۲۰ دقیقه پیش انکوبه شده و سپس در معرض محلول‌های انجمادی قرار داده شدند، اما منجمد نشدند.

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

۵. انجماد شیشه‌ای: تخمک‌ها بدون اینکه در معرض دوستاکسل قرار بگیرند در محیط‌های انجمادی انجماد شیشه‌ای قرار داده شدند.

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

انجماد شیشه‌ای و ذوب

به منظور 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.

در انجماد شیشه‌ای، از محلول انجمادی حاوی محلول‌های ضدیخ با غلظت ۱۵٪ اتیلن گلیکول+ ۱۵٪ دی متیل سولفوکسید+ ۰/۵مولار ساکارز در محیط پایه استفاده شد. محلول‌های تعادلی حاوی نیمی از غلظت ضدیخ‌ها (۷/۵٪ اتیلن گلیکول + ۷/۵٪ دی متیل سولفوکسید) بدون ساکارز بود.

به‌طور خلاصه، ۱۵ تخمک 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 ۱۵تایی 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 به‌مدت یک دقیقه و سپس غلظت‌های رقیق‌شده ساکارز (۰/۷۵، ۰/۵ و ۰/۲۵ مولار) هر کدام به‌مدت سه دقیقه انجام شد.

برای 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 به‌مدت 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.

رنگ‌آمیزی اسکلت سلولی تخمک با آلفاتوبولین

رنگ‌آمیزی تخمک‌ها مطابق روش Hung *et al.* (2008) با اندکی تغییر انجام گرفت. برای رنگ‌آمیزی، ۲ ساعت پس از ذوب، تخمک‌ها را در انکوباتور قرار داده، سپس با محلول حاوی پارافرمالدهید ۴٪ و تریتون X100 ۰/۶٪ + بافر فسفات به‌مدت ۳۰ دقیقه ثابت‌سازی شدند. پس از آن، تخمک‌ها در ترکیبی از سرم بز ۵٪+ سرم آلبومین گاوی ۲٪+ بافر فسفات به‌مدت ۴۵ دقیقه برای از بین بردن باندهای غیر اختصاصی قرار داده شدند (تمامی مراحل ذکرشده تاکنون در روشنایی انجام شد، اما از این مرحله به بعد آزمایش باید در تاریکی ادامه یابد). سپس تخمک‌ها با آنتی‌بادی آلفاتوبولین که به میزان ۱ به ۱۰۰ در بافر فسفات رقیق‌شده، به‌مدت یک ساعت انکوبه شدند. شستشو با توین ۲۰ با غلظت ۰/۱ درصد انجام شد (سه بار تکرار). در نهایت، هسته تخمک‌ها با پروپیدیوم یدید با غلظت ۱۰ میکروگرم در یک میلی‌لیتر به‌مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. تخمک‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

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 بقای تخمک‌ها، لقاح و همچنین رنگ‌آمیزی میکروتوبول‌ها استفاده شد.

نتایج

پس از ذوب‌شدن تخمک‌ها، نرخ بقای هر گروه به‌طور جداگانه با گروه کنترل مقایسه شدند. جدول ۱ نتایج به‌دست‌آمده از انجمادشیشه‌ای تخمک‌های بالغ را در گروه انجمادی و غیرانجمادی به‌طور خلاصه نشان می‌دهد.

میزان بقای تخمک‌های منجمد- ذوب‌شده در گروه دوستاکسل+ انجمادی نسبت به گروه انجماد (P=۰/۹۴۷) بیشتر بود، اما تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در بقای تخمک‌ها بین گروه دوستاکسل و گروه دوستاکسل+ محلول انجمادی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P=۰/۵۳۳). با این‌حال، میزان بقا در گروه انجمادی، به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه کنترل بود (P=۰/۰۳۳).

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 دو سلولی بررسی شد. جدول ۱ نشان می‌دهد که کاهش معنی‌داری در نرخ لقاح هر گروه در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد (P<۰/۰۰۱).

جدول ۱. نتایج انجماد شیشه‌ای تخمک با استفاده از کرایوتاپ

گروه	درصد بقای تخمک‌ها (انحراف استاندارد± میانگین)	درصد لقاح تخمک‌ها تا مرحله دو سلولی (انحراف استاندارد± میانگین)
کنترل (I)	(۹۸/۴۶±۳/۴۴)^{a}	(۸۸/۶۶±۷/۳۰)^{a}
دوستاکسل (II)	(۹۲/۶۶±۷/۳۶)^{ab}	(۸۲/۸۵±۱۱/۷۹)^{a}
دوستاکسل+ محلول انجمادی (III)	(۸۴/۱۳±۷/۵۵)^{ab}	(۷۶/۹۵±۲/۰۳)^{ab}
انجماد شیشه‌ای (IV)	(۸۱/۱۲±۱۳/۰۷)^{b}	(۶۰/۴۰±۱۰/۳۶)^{c}
دوستاکسل+ انجماد شیشه‌ای (V)	(۸۵/۰۹±۸/۶۷)^{ab}	(۶۵/۳۳±۷/۱۸)^{bc}

در هر ستون متغیرهایی که هیچ حرف بالانویس مشترکی ندارند، اختلاف آماری معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

نتایج نشان داد که میزان لقاح هر گروه نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری نشان داد (P=۰/۰۰۱). میزان تشکیل جنین‌های دو سلولی بعد از لقاح آزمایشگاهی در هر دو گروه انجماد (دوستاکسل+ انجماد شیشه‌ای و انجماد شیشه‌ای) نسبت به گروه‌های غیرانجمادی (کنترل و دوستاکسل) به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود (جدول ۱).

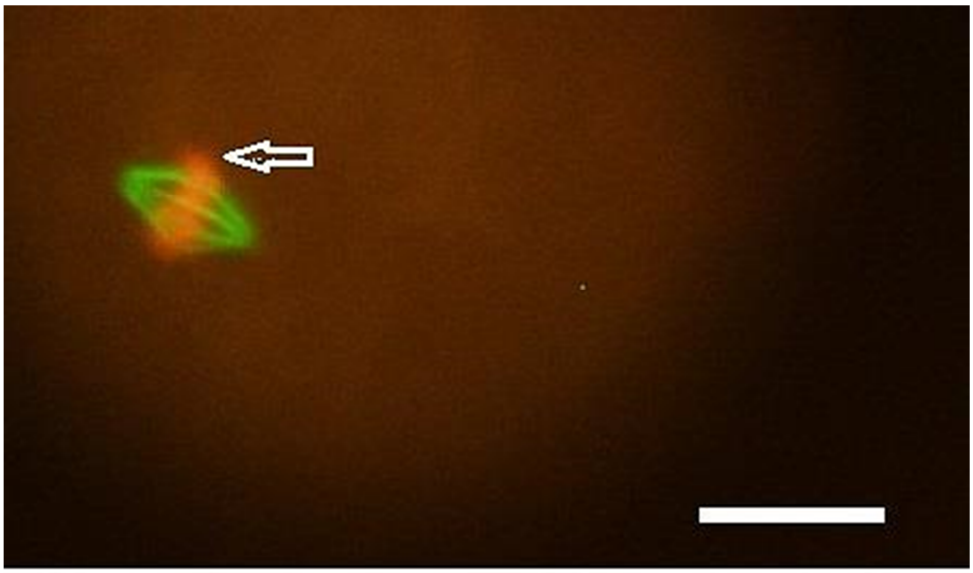
در مجموع می‌توان گفت، زیرگروه‌های انجمادی از نظر درصد بقا فاقد اختلاف معنی‌دار و از نظر درصد لقاح دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

رنگ‌آمیزی اسکلت سلولی تخمک با آلفاتوبولین

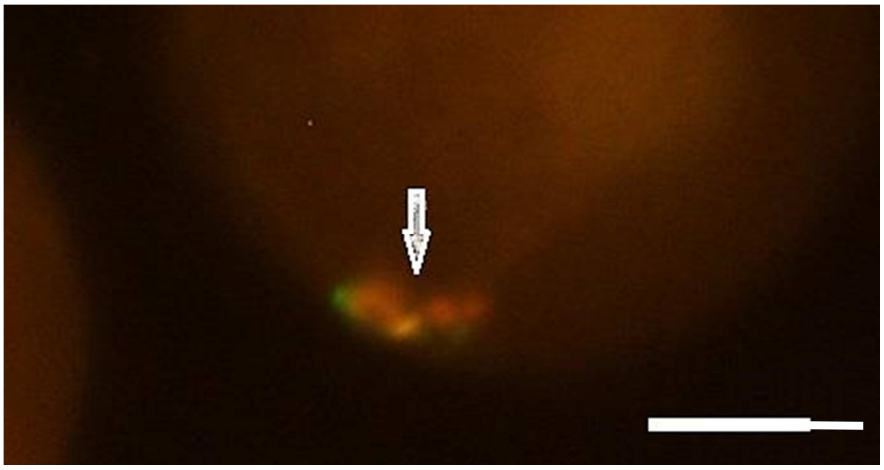
رنگ‌آمیزی تخمک در گروه‌های کنترل و آزمایشی انجام گرفت. آرایش میکروتوبول و کروموزوم‌های واقع بر دوک تقسیم در گروه‌های کنترل و آزمایش در شکل‌های ۱ تا ۳ آورده شده است. همان‌گونه که در شکل نشان داده شده است، انجماد شیشه‌ای باعث به هم‌ریختگی ساختار دوک و کروموزوم‌ها در تخمک موش می‌شود (شکل ۲). پیش‌انکوبه‌کردن تخمک‌ها با دوستاکسل ۰/۰۵میکرو مولار به‌مدت ۲۰ دقیقه قبل از انجماد، در ممانعت از آسیب‌های وارده به سیتواسکلتن تخمک مؤثر است (شکل ۳).

نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد نسبت تخمک‌های با آرایش نرمال میکروتوبول در گروه‌های پیش‌انکوبه‌شده با دوستاکسل ۰/۰۵ میکرومولار (دوستاکسل+ انجماد شیشه‌ای) قبل از انجماد شیشه‌ای به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های انکوبه نشده (انجماد شیشه‌ای) است (P<۰/۰۰۱). همچنین نسبت تخمک‌های با کروموزوم پراکنده در گروه‌های پیش انکوبه شده با دوستاکسل به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه‌های انکوبه‌نشده است (P<۰/۰۰۱).

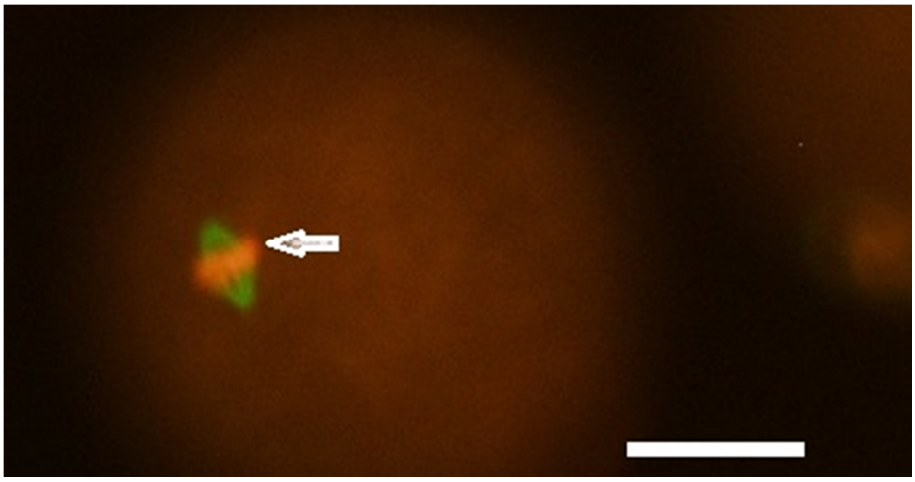
در واقع، نسبت تخمک‌های با آرایش نرمال میکروتوبول به‌طور معنی‌داری در گروه‌های غیرانجمادی بالاتر از گروه‌های انجمادی است (P<۰/۰۰۱) و نسبت تخمک‌های با کروموزوم پراکنده در گروه‌های غیرانجمادی پایین‌تر از گروه‌های انجمادی است (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲).



شکل ۱. رنگ‌آمیزی تخمک در گروه کنترل. در این تصویر، فلش نشان‌دهنده کروموزوم‌ها به رنگ قرمز و میکروتوبول‌ها (دوک تقسیم) به رنگ سبز است که کروموزوم‌ها و دوک، تقسیم آرایش نرمالی را نشان می‌دهند. کروموزوم‌ها به‌صورت خوشه‌ای در صفحه متافازی قرار گرفته و میکروتوبول‌ها از یک قطب به قطب دیگر با آرایش نرمال به سمت کروموزوم‌ها کشیده شده‌اند (Scale bar نشان‌دهنده ۲۰ میکرومتر است).



شکل ۲. نتایج رنگ‌آمیزی تخمک در گروه انجماد شیشه‌ای. در این تصویر، فلش نشان‌دهنده کروموزوم‌ها به رنگ قرمز و میکروتوبول‌ها (دوک تقسیم) به رنگ سبز است. دوک تقسیم در این گروه آرایش غیرنرمال نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد و کروموزوم‌ها به‌صورت غیر نرمالی پراکنده شده‌اند. (Scale bar نشان‌دهنده ۲۰ میکرومتر است).



شکل ۳. نتایج رنگ‌آمیزی تخمک در گروه دوستاکسل و محلول انجمادی در این تصویر فلش نشان‌دهنده کروموزوم‌ها به رنگ قرمز و میکروتوبول‌ها (دوک تقسیم) به رنگ سبز است که کروموزوم‌ها و دوک تقسیم آرایش نرمالی را نشان می‌دهند. کروموزوم‌ها به‌صورت خوشه‌ای قرار گرفته و میکروتوبول‌ها از یک قطب به قطب دیگر با آرایش نرمال به سمت کروموزوم‌ها امتداد پیدا کرده‌اند (Scale bar نشان‌دهنده ۲۰ میکرومتر است).

جدول ۲. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی تخمک با آنتی‌بادی آلفاتوبولین

گروه	درصد میکروتوبول نرمال (انحراف استاندارد± میانگین)	درصد میکروتوبول غیرنرمال (انحراف استاندارد± میانگین)	درصد کروموزوم پراکنده (انحراف استاندارد± میانگین)	درصد کروموزم فشرده (انحراف استاندارد± میانگین)
کنترل (I)	(۹۴/۰۱±۰/۶۷)^{a}	(۵/۹۸±۰/۶۷) ^{a}	(۲۰/۶۹±۲/۲۰)^{a}	(۴/۱۲±۱/۲۷) ^{a}
دوستاکسل (II)	(۹۴/۸۵±۰/۹۴)^{a}	(۵/۱۴±۰/۹۴) ^{a}	(۲۰/۸۶±۲/۶۳)^{a}	(۵/۱۴±۰/۹۴) ^{a}
دوستاکسل+ محلول انجمادی (III)	(۸۲/۵۶±۰/۶۹)^{b}	(۱۳/۰۳±۳/۱۶) ^{b}	(۱۹/۴۵±۰/۶۳)^{a}	(۷/۴۰±۱/۳۲) ^{a}
انجماد شیشه‌ای (IV)	(۵۷/۳۸±۲/۳۲)^{d}	(۳۹/۵۱±۲/۲۷) ^{d}	(۳۸/۲۶±۰/۵۸)^{c}	(۱۶/۶۸±۲/۰۴) ^{b}
دوستاکسل+ انجماد شیشه‌ای (V)	(۶۵/۸۵±۰/۲۷)^{c}	(۳۴/۱۴±۰/۲۷)^{c}	(۳۱/۷۱±۱/۰۰) ^{b}	(۷/۸۱±۰/۹۹)^{a}

در هر ستون، متغیرهایی که هیچ حرف بالانویس مشترکی ندارند اختلاف آماری معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات انجماد شیشه‌ای روی زنده ماندن، لقاح آزمایشگاهی و فراساختار تخمک‌های بالغ موش در مرحله متافاز دوم انجام شد. منجمد کردن تخمک، یک روش حفظ باروری در خانم‌ها است. هر چند 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 بویژه اسکلت سلولی است (Ciotti *et al.*, 2009). این عامل منجر به کاهش توانایی زنده‌مانی تخمک و جنین پس از انجماد می‌شود. با توجه به این‌که میکروتوبول‌ها و دیگر فیبرهای اسکلت سلولی ممکن است در طول انجماد شیشه‌ای دچار آسیب شده و در نتیجه باعث شکست در پروسه لقاح پس از ذوب شدن شوند، پایداری رشته‌های دوکی برای انجماد شیشه‌ای موفق تخمک‌ها بسیار مهم است. دوستاکسل یک عامل پایدارکننده است که می‌تواند با مهار تجمع میکروتوبول‌های توبولین در طی انجماد، باعث تثبیت میکروتوبول‌ها شود (Shi *et al.*, 2006). در این مطالعه، میزان بقا و لقاح تخمک‌های منجمد و ذوب‌شده که قبل از انجماد با دوستاکسل پیش انکوبه شدند، بهتر از تخمک‌های پیش‌انکوبه نشده بود. بنابراین، آرایش نرمال اسکلت سلولی، گرانول‌های قشری تخمک و میتوکندری پس از انجماد و ذوب می‌تواند با سطح متابولیسم، تکثیر و تمایز سلولی وابسته باشد. یکی از مهمترین آسیب‌های مرتبط با انجماد آسیب به سیستم اسکلت سلولی تخمک است. بر اساس نتایج مطالعات قبلی، پس از انجماد شیشه‌ای و ذوب، دوک‌های میتوزی در زمان مشخص بازسازی شده و تکوین جنینی بهبود می‌یابد (Devillard *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2016). نتایج ما نیز تأییدکننده این مطلب است که می‌توان با استفاده از دوستاکسل، میزان آسیب را به حداقل رسانده تا سیتواسکلتون و دوک میتوزی تخمک‌ها در مدت زمان کوتاهتری به آرایش نرمال بازگردند.

در مطالعه حاضر، میزان تکامل به جنین دو سلولی پس از انجماد شیشه‌ای در هر گروه (انجمادی و غیرانجمادی) کاهش معنی‌داری را با گروه کنترل نشان داد. در تأیید این نتایج Abedpour *et al.* (2015) ثابت کردند که انجماد شیشه‌ای باعث کاهش معنی‌داری در سرعت بلوغ تخمک‌ها می‌شود. در مطالعه آنها سرعت لقاح تخمک‌های منجمدشده اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، اما هر کدام از آنها به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بودند. همچنین، Abedpour *et al.* (2015) نشان دادند انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ باعث آسیب به تخمک از طریق کاهش سرعت بلوغ و لقاح می‌شود. در مطالعه حاضر، درصد لقاح در گروه‌های پیش‌انکوبه‌شده با دوستاکسل بیشتر از گروه‌های انکوبه‌نشده بود.

در تحقیق Chasombat *et al.* (2015) بر روی تخمک گاو، درصد بقای تخمک‌ها بیشتر از نتایج به‌دست‌آمده 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 پروتکل‌های انجمادی متفاوت باشد.

گزارش شده که نگهداری تخمک‌ها در دمای فوق پایین (۱۹۶-) باعث القای دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها در تخمک‌ها می‌شود (Morató *et al.*, 2008). 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 (Boiso *et al.*, 2002; Bouquet *et al.*, 1992). 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 پیش از انکوبه‌کردن تخمک‌های گاو با تاکسان‌هایی از قبیل پاکلیتاکسل در غلظت پایین (۱ میکرومولار) برای ۳۰ دقیقه قبل از انجماد شیشه‌ای می‌تواند از شکست اسکلت سلولی در طول انجماد شیشه‌ای ممانعت کرده و در نتیجه باعث افزایش نرخ بقا پس از ذوب‌شدن شده و تکوین جنینی متعاقب آن را بهبود می‌بخشد (Morató *et al.,* 2008; Schmidt *et al.,* 2004). همچنین مطالعات قبلی نشان دادند که دوستاکسل نرخ گسترش توبولین به میکروتوبول‌های پایدار را افزایش داده و مانع از دپلیمریزاسیون آنها به هنگام مواجهه با سرما می‌شوند (Huang *et al.,* 2008; Ringel *et al.,* 1991).

در مطالعه دیگری گزارش شد که دوستاکسل می‌تواند میکروتوبول را توسط اتصالات محکم بین دیمرهای α و β توبولین و تغییرات بعدی در اتصال MAP پایدار کند که این از آسیب یا دپلیمریزاسیون در طول انجماد شیشه‌ای تخمک‌ها جلوگیری می‌کند (Devillard *et al.,* 2008).

در مطالعه حاضر، تخمک‌های پیش‌انکوبه شده با دوستاکسل به‌مدت ۲۰ دقیقه قبل از انجماد شیشه‌ای سهم بیشتری از تخمک‌های منجمد- ذوب‌شده با آرایش میکروتوبول و کروموزوم نرمال و همچنین نرخ بالاتر بقا و تسهیم را در مقایسه با تخمک‌های پیش انکوبه‌نشده را دارند. این نتایج بخوبی بر این مطلب دلالت دارد که پایداری اسکلت سلولی تخمک‌ها توسط دوستاکسل می‌تواند آسیب القاشده توسط انجماد شیشه‌ای را کاهش دهد.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به کمبود هزینه‌ها و دسترسی سخت به مواد اولیه که از خارج از کشور تأمین می‌شود، اشاره کرد. در صورت تأمین هزینه کافی می‌توانستیم ارزیابی‌های بیشتری در زمینه فراساختار و تغییرات ژنتیکی تخمک انجام دهیم.

به طور کلی، می‌توان گفت که با انکوبه‌کردن تخمک‌های بالغ مرحله متافاز دوم موش با دوستاکسل به مدت ۲۰ دقیقه قبل از انجماد شیشه‌ای در غلظت ۰/۰۵ میکرومولار، درصد بقا و لقاح تخمک‌ها بهبود یافته و آسیب اسکلت سلولی مهار می‌شود. از این نتایج می‌توان برای بهبود تکنیک‌های کمک باروری و افزایش نرخ موفقیت در لقاح آزمایشگاهی استفاده کرد.

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 Science; 44(5): 406-414.

Devillard, L.; Vandroux, D.; Tissier, C.; Dumont, L.; Borgeot, J.; Rochette, L.; *et al*. (2008). Involvement of microtubules in the tolerance of cardiomyocytes to cold ischemia-reperfusion. Molecular and cellular biochemistry; 307(1-2): 149-157.

Gomes, C-M.; Silva, C-A-S-E.; Acevedo, N.; Baracat, E.; Serafini, P.; Smith, G-D. (2008). Influence of vitrification on mouse metaphase II oocyte spindle dynamics and chromatin alignment. Fertility and Sterility; 90(4): 1396-1404.

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.

Jahromi, Z-K.; Amidi, F.; Mugehe, S.; Sobhani, A.; Mehrannia, K.; Abbasi, M.; *et al*. (2010). Expression of heat shock protein (HSP A1A) and MnSOD genes following vitrification of mouse MII oocytes with cryotop method. Yakhteh Medical Journal; 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.

Ledda, S.; Bogliolo, L.; Succu, S.; Ariu, F.; Bebbere, D.; Leoni, G-G. *et al*. (2006). Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival. Reproduction, Fertility and Development; 19(1): 13-23.

Morató, R.; Izquierdo, D.; Albarracín, J-L.; Anguita, B.; Palomo, M-J.; Jiménez-Macedo, A-R. *et al*. (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.

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

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.

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

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

Sparreboom, A.; Nooijen, W.; Beijnen, J. (1998). Preclinical pharmacokinetics of paclitaxel and docetaxel. Anti-cancer drugs; 9(1): 1-17.

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