DOI: 10.22055/IVJ.2022.312265.2410
DOR: 20.1001.1.17356873.1402.19.2.18.5

مقایسه دو محیط Embryo Holding و HTCM-199 در نگهداری تخمک‌های نابالغ گاو در خارج از انکوباتور و تأثیر آن بر تولید بلاستوسیت

محمدرضا ناظم[۱]، مهران فرهودی‌مقدم[۲*]، قاسم اکبری[۳] و محمدامین اسلامپور[۳]

[۱] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۲] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
[۳] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

دریافت: ۱۴۰۰/۸/۵ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۲

چکیده

بسیاری از تغییرات سلولی در روند پیری تخمک‌ها بیان شده است، ولی بررسی‌های کمی برای زمان و دمای مناسب نگهداری آن‌ها انجام گرفته است. اساسی‌ترین مشکل، مسافت و زمانی است که برای انتقال تخمک به آزمایشگاه وجود دارد و حفاظت از تخمک‌های نابالغ بدون کاهش توانایی آن‌ها برای لقاح داخل آزمایشگاهی بسیار سودمند است. هدف از مطالعه حاضر استفاده از محیط Embryo Holding (EH-Syngro) Medium و محیط HTCM-199 و مقایسه آن‌ها برای نگهداری تخمک‌های نابالغ در دمای اتاق و بدون انکوباتور می‌باشد. در مجموع تعداد ۵۲۶۸ عدد تخمک آزمایش شدند. تخمک‌ها در گروهای مختلف در دماهای ۴، ۲۲ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از سپری شدن این زمان‌ها، وارد محیط بلوغ استاندارد شدند و در نهایت عملیات IVF انجام شد. در زمان نگهداری ۶ ساعته، میزان بلوغ تخمک و تولید بلاستوسیت در گروه‌های آزمایشی و کنترل اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند. در زمان ۱۲ ساعت تعداد بلوغ تخمک‌ها و تعداد تولید بلاستوسیت در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه استاندارد به طور معنی‌داری کم‌تر بود. کم‌ترین میزان بلوغ و تولید بلاستوسیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. محیط EHT و HTCM-199 در تحقیق حاضر نشان دادند که می‌توانند برای نگهداری تخمک نابالغ تا زمان ۶ ساعت در دمای اتاق مفید باشند و تأثیر سویی در بلوغ تخمک‌ها و تولید بلاستوسیت نداشته باشد و از همه مهم‌تر عدم نیاز به انکوباتور جهت حمل و نقل تخمک‌ها به آزمایشگاه است.

کلمات کلیدی: تخمک، بلاستوسیت، انکوباتور، HTCM-199، Embryo Holding Medium

مقدمه

امروزه دامداران به دلیل افزایش هزینه‌های اقتصادی نگهداری دام و حفظ ذخایر ژنتیکی برای تولید شیر و گوشت، متقاضی به کارگیری تکنولوژی‌های نوین تولید مثلی توسط دامپزشکان و کارشناسان هستند. یکی از این درخواست‌ها تولید جنین با ذخایر ژنتیکی برتر و انتقال جنین است، که یک روش امیدوار کننده برای درمان ناباروری و حفظ باروری است (Osvaldo et al, 2018; Boni, 2012).

*نویسنده مسئول: مهران فرهودی‌مقدم، دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
E-mail: m_farhoodimog@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

مطالعات گذشته نشان می‌دهند که نقص و تأخیر در بلوغ سیتوپلاسمی تخمک و ناهمگنی در رشد آن، سه عامل اصلی در توسعه نامناسب سیستم بلوغ برون تنی (In vitro Maturation or IVM) است. بنابراین ذخیره‌سازی مناسب تخمک‌های نابالغ، و حفظ مرحله ژرمینال وزیکول (GV) باعث کاهش هزینه‌های تولید رویان آزمایشگاهی می‌شود. از طرفی اگر تخمک‌های بالغ در زمان دیرتری لقاح یابند، به وسیله تغییرات پیچیده، عمیق و مضر سیتوپلاسمی پیر می‌شوند (Carrocera et al, 2016; Azari et al, 2016). اگر چه بسیاری از تغییرات سلولی و مولکولی در روند پیری تخمک‌ها بیان شده است، ولی بررسی‌های کمی برای زمان و دمای مناسب نگهداری آن‌ها انجام گرفته است. سلول-های گرانولوزا و کومولوس در فولیکول‌های کوچک، فاکتورهای مهار کننده بلوغ، مانند آدنوزین مونوفسفات را تولید می‌کنند و تخمک را در پروفاز میوز I نگه میدارند. در پستانداران، در زمان جدا شدن این تخمک‌ها از مایعات فولیکولی و قطع ارتباط با مهارکننده‌ها، بلافاصله تقسیمات میوز آغاز می‌شود (Tanghe et al, 2002; Bilodeau-Goeseels, 2011; Blondin et al, 2017). از آن جایی که در مورد پیری تخمک توضیح داده شد، به نظر می‌رسد اساسی‌ترین مشکل، مسافت و زمانی است که برای انتقال تخمک به آزمایشگاه وجود دارد و حفاظت از تخمک‌های نابالغ بدون کاهش توانایی آن‌ها برای سیستم لقاح برون‌تنی (In vitro fertilization or IVF) بسیار سودمند است.

در مطالعات دیگر استفاده از مهارکننده‌های میوز در حفظ مرحله ژرمینال وزیکول مفید بود، ولی به علت سمی بودن، باعث کاهش تکامل بلاستوسیست شد و استفاده از این مواد نیاز به تجربه و تخصص دارد. حتی در مواردی نیاز به وسایل جانبی از قبیل انکوباتور می‌باشد که برای هر زمان قابل دسترس نیست (Ponderato et al, 2001; Patrick et al, 2000; Alm et al, 2008).

هدف از مطالعه حاضر استفاده از محیط Embryo Holding Medium (EH –Syngro) و محیط HTCM-199 و مقایسه این دو محیط برای نگهداری تخمک‌های نابالغ در دمای اتاق و بدون انکوباتور می‌باشد، که می‌تواند کمک به سزایی در حفظ تخمک‌های نابالغ کند. همچنین در ادامه، تأثیر این نگهداری بر توان میوز و رسیدن به مرحله متافاز II ، پیشرفت بلوغ و توسعه بلاستوسیست بررسی گردید.

مواد و روش کار

جهت گرفتن تخمک، تخمدان‌های گاوی بلافاصله پس از کشتار از لاشه جدا شدند و در محلول سالین فیزیولوژی گرم (۳۵ تا ۳۹ درجه سانتی‌گراد) و استریل در عرض ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه تخمدان‌ها توسط محلول گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) و استریل PBS پنج مرتبه شستشو شدند. استخراج مجموعه‌های کومولوس – تخمک از فولیکول‌های سالم با سطح شفاف و اندازه ۲ تا ۶ میلی‌متر توسط روش آسپیراسیون با استفاده از سرنگ استریل پلاستیکی و سر سوزن شماره ۱۸ انجام گرفت. مشخصات ریخت‌شناسی (تعداد لایه‌های سلول‌های کومولوس و یکنواختی سیتوپلاسم سلول تخمک) مجموعه‌های کومولوس – تخمک توسط میکروسکوپ استریو مورد ارزیابی قرار گرفت و فقط آن دسته از سلول-های تخمک که حداقل دارای سه لایه کامل از سلول کومولوس در اطراف بودند و سیتوپلاسم حاوی گرانول‌های ریز و یکنواخت داشتند، جهت انجام مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. در مجموع این مطالعه تعداد ۵۲۶۸ عدد تخمک مورد آزمایش قرار گرفت. مجموعه‌های کومولوس – تخمک پس از انتخاب حداقل پنج مرتبه در قطره‌های محیط شستشوی تخمک که از قبل تهیه شده و به مدت حداقل سه ساعت در محیط انکوباتور به تعادل دمایی رسیده بودند، شستشو شدند. اجزای محیط شستشوی تخمک عبارتند از (Table 1):

Table.1: The components of washing media before maturation culture *in vitro*

Concentration/ amount	Company	Name
--	Sigma, M4530-500ML, St. Louis, MO, USA	HEPES-buffered TCM-199
10%	Sigma, M4530-500ML, St. Louis, MO, USA	FBS

برای نگهداری تخمک‌ها قبل از بلوغ، مجموعه تخمک-کومولوس اخذ شده در یک ویال استریل ۵ میلی‌لیتری، حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط نگهدارنده Embryo Holding (Singro) (گروه درمانی ۱ یا EHT) و HTCM-19 (گروه درمانی ۲ یا HTC) قرار داده شدند. بیش از ۴۰ عدد مجموعه تخمک-کومولوس در هر ویال قرارداده نشد. ویال‌ها با پارافیلم مهروموم شدند و سپس در یک لوله سانتریفیوژ ۵۰ سی‌سی حاوی آب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی در یک ظرف استریوفوم قرار گرفتند. سپس این لوله‌ها در دماهای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال)، ۲۲ درجه سانتی‌گراد (دمای اتاق) و ۳۸ درجه سانتی‌گراد (انکوباکتور) در مدت زمان ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت نگهداری شدند. در کنار گروه‌های درمانی، یک گروه کنترل نیز طراحی شد که در آن بلافاصله پس از اخذ تخمک و شستشو وارد محیط بلوغ استاندارد شدند (۲۴ گروه درمانی و یک گروه استاندارد).

پس از سپری شدن زمان‌های ذکر شده در دماهای فوق، تخمک‌ها با محیط شستشوی ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، شستشو و برای فرآیند بلوغ (IVM) آماده شدند که در مرحله بعد توضیح داده می‌شود (Osvaldo et al, 2018).

مجموعه تخمک-کومولوس‌های نابالغ در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر اصلاح شده بی‌کربنات TCM-199 به همراه ۲۰ درصد سرم جنین گوساله، ۵۰ mg/ml جنتامایسین و ۲۰ mg/ml از هورمون رشد اپیدرمال به مدت ۲۲ ساعت در دمای ۳۸/۵ و ۵ درصد CO2 و دارای رطوبت نگهداری شدند. پس از سپری شدن زمان لازم برای بلوغ تخمک‌ها، نیمی از تخمک - کومولوس هر گروه در محیط حاوی هیالورونیداز ۰/۰۱ درصد قرار گرفتند تا لایه کومولوس خود را از دست بدهند. تخمک‌هایی که دارای غشای ناسالم بودند، از آزمایش حذف شدند. سپس تخمک‌ها با فرمالدئید ۴ درصد تثبیت شدند و برای وضعیت بلوغ هسته‌ایی از رنگ‌آمیزی Hoechst 33342 استفاده شد. تخمک‌هایی که دارای جسم قطبی یا صفحات متافازی بودند، بالغ در نظر گرفته شدند (Osvaldo et al, 2018).

جهت انجام لقاح برون‌تنی (Invitro fertilization or IVF) از اسپرم منجمد گاو استفاده شد. اسپرم منجمد یخ زدایی شد و با محیط حاوی بافر بیکربنات Tyrode با ۶ میلی‌گرم BSA در هر میلی لیتر mg/ml 2/9 هپارین به صورت سوسپانسیون تهیه شد و غلظت اسپرم به ۱×۱۰^{۶} رسید. سپس تخمک‌های بالغ شده در محیط IVF شسته شدند و در هر پلیت ۴ قطره ۵۰۰ میکرو لیتری از محیط IVF تهیه شده قرار داده شدند و در ادامه تخمک‌های بالغ شده وارد این قطره‌ها شدند. تخمک‌های بالغ شده و اسپرم-ها دردمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد (انکوباکتور) به همراه ۵ درصد CO2 به مدت ۲۱ ساعت در مجاورت همدیگر قرار گرفتند. پس از سپری شدن ۲۱ ساعت مجاورت، شستشوی دیگری انجام شد تا اسپرم‌ها و کومولوس‌های باقی‌مانده شسته شوند و زیگوت‌های احتمالی ایجاد شده عاری از این موارد باشند. گروه‌های ۲۰ تا ۳۰ تایی زیگوت‌ها در محیط مایعات اویداکتی و sofaa حاوی BSA، انسولین و سلنیوم قرار گرفتند و توسط روغن پوشانده شدند. سپس در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد (انکوباکتور) به همراه ۵ درصد CO2، ۵ درصد اکسیژن و ۹۰ درصد N2 برای ۷ روز نگهداری شدند (Osvaldo et al, 2018).

اطلاعات جمع‌آوری شده مربوط به متغیرهای وابسته (تعداد تخمک‌های بالغ شده نسبت به کل تخمک‌ها و تعداد بلاستوسیت تولید شده نسبت به تخمک‌های استفاده شده) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. با استفاده از نرم-افزار SPSS24 و آزمون Kolmogorov–Smirnov مشخص شد که داده‌های مطالعه حاضر دارای توزیع نرمال نبودند

(P ≤۰/۰۰۱). بنابراین از آزمون نان پارامتریک Chi-squared و Fisher's exact استفاده شد و مقادیر P ≤۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند و نتایج در قالب جداول ثبت گردید.

نتایج

تعداد سلول‌های بالغ شده طی فرآیند IVM

تعداد سلول‌های بالغ شده در هر گروه پس از شمارش، مورد تحلیل آماری قرار گرفت و در گروهای مورد مطالعه در ساعات مختلف به نمایش در آمده است. در هر ستون گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار (P ≤۰/۰۵) دارند با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (Table 2). همچنین شمای کلی از این مقادیر در Figure 1 به تصویر کشیده شده است. در ادامه تعداد سلول‌های بالغ شده در هر یک از زمان‌های خوانش با هم مقایسه شده است. بدین ترتیب می‌توان اثر حفاظتی هر یک از نگهدارنده‌های مورد سنجش را در دما و زمان‌های مختلف با یکدیگر و گروه استاندارد مقایسه شد.

Table. 2: The number of maturated cells in various groups at different times

Group	temperature (°C)	6 h Total (mature)	12 h Total (mature)	18 h Total (mature)	24 h Total (mature)
EHT	38	108 (96)	102 (81)^{b}	104 (80)^{d}	105 (57)^{b}
EHT	22	104 (95)	106 (85)^{c}	103 (77)^{d}	91 (35)^{c}
EHT	4	108 (99)	102 (73)^{d}	93 (36)^{c}	100 (38)^{c}
HTC	38	100 (91)	102 (80)^{b}	103 (75)^{f}	104 (45)^{d}
HTC	22	102 (90)	104 (79)^{c}	104 (70)^{f}	103 (32)^{d}
HTC	4	101 (90)	103 (73)^{d}	102 (29)^{b}	100 (29)^{d}
Standard		115 (106)	115 (106)^{a}	115 (106)^{a}	115 (106)^{a}

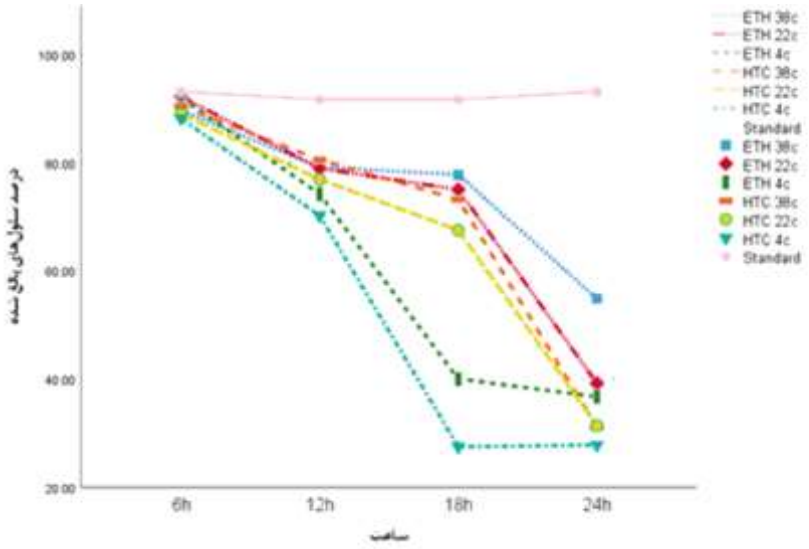

Figure 1: The percentage of maturated cells in various groups at different times

۶ ساعت: در این زمان بین هیچ یک از گروه‌های مورد سنجش و گروه استاندارد اختلاف معنی‌دار وجود ندارد.

۱۲ ساعت: در این زمان تعداد سلول‌های بالغ شده در تمامی گروه‌های تیمار نسبت به گروه استاندارد به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) کاهش یافته است. با این حال بین هیچ یک از نگهدارنده‌ها در زمان و دمای مشابه اختلاف معنی‌داری وجود نداشته است.

۱۸ ساعت: در این زمان تعداد سلول‌های بالغ شده در تمامی گروه‌های مورد سنجش به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) نسبت به گروه استاندارد کاهش یافته است. بیش‌ترین کاهش، در گروه‌های با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. به طوری که در هر دو نگهدارنده EHT و HTC در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش معنی‌دار (P ≤۰/۰۵) در تعداد سلول‌های بالغ شده نسبت به دیگر گروه‌ها وجود داشت. با این حال در تمامی دماها، EHT عملکرد بهتری نشان داده است. اثرات حفاظتی EHT در دمای ۴ درجه مشهودتر بود، به طوری که در این دما نسبت به گروه HTC در همین دما، تعداد سلول‌ها بالغ شده به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) بیش‌تر بودند. بیش‌ترین اثرات حفاظتی EHT در دمای ۳۸ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، به طوری که تعداد سلول‌های بالغ شده در این دو گروه، نسبت به گروه‌های HTC ۳۸ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد به طور معنی-داری (P ≤۰/۰۵) بیش‌تر بوده است.

۲۴ ساعت: در این زمان تعداد سلول‌های بالغ شده در تمامی گروه‌های مورد سنجش نسبت به گروه استاندارد به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) کاهش یافته است. اثر حفاظتی نگهدارنده EHT در تمامی دماها به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) از نگهدارنده HTC بهتر بوده است. بیش‌ترین اثرات حفاظتی در گروه EHT ۳۸ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است. در این گروه تعداد سلول‌های بالغ شده به طور معنی-داری (P ≤۰/۰۵) نسبت به دیگر گروه‌های مورد سنجش بیش‌تر بوده است. پس از آن EHT در دو دمای ۲۲ و ۴ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین اثرات حفاظتی را داشته است، به طوری که تعداد سلول‌های بالغ شده در گروه EHT در این دو دما به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) نسبت به HTC در تمامی دماها بیش‌تر بوده است. کم‌ترین اثرات حفاظتی در گروه‌های HTC مشاهده شده است. تعداد سلول‌های بالغ شده در این گروه‌ها به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) نسبت به دیگر گروه‌ها کم‌تر بوده است.

تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولید شده طی فرآیند IVF

تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولید شده در هر گروه پس از شمارش، مورد تحلیل آماری قرار گرفته است. تعداد سلول‌های بلاستوسیت در گروهای مورد مطالعه در ساعات مختلف به نمایش در آمده است. در هر ستون گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار (P≤۰/۰۵) دارند با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (Table 3). همچنین شمای کلی از این مقادیر در Figure 2 به تصویر کشیده شده است. در ادامه تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولید شده در هر یک از زمان‌های خوانش با هم مقایسه شده است. بدین ترتیب می‌توان اثر حفاظتی هر یک از محیط‌های مورد سنجش را در دما و زمان‌های مختلف با یکدیگر و گروه استاندارد مقایسه کرد.

Table 3: The number of blastocyst cells in various groups at different times

Group	temperature (°C)	6 h oocyte (blastocyst)	12 h oocyte (blastocyst)	18 h oocyte (blastocyst)	24 h oocyte (blastocyst)
EHT	38	104 (27)^{c}	99 (21)^{b}	101 (17)^{c}	104 (17)^{c}
EHT	22	102 (39)^{ac}	104 (32)^{c}	97 (19)^{b}	108 (15)^{c}
EHT	4	106 (24)^{b}	103 (13)^{d}	101 (3)^{d}	108 (4)^{b}
HTC	38	103 (25)^{c}	105 (22)^{b}	102 (14)^{c}	102 (10)^{c}
HTC	22	108 (40)^{ac}	106 (32)^{c}	102 (17)^{b}	104 (2)^{bd}
HTC	4	104 (23)^{b}	103 (11)^{d}	104 (3)^{d}	103 (4)^{b}
Standard		108 (44)^{a}	108 (44)^{a}	108 (44)^{a}	108 (44)^{a}

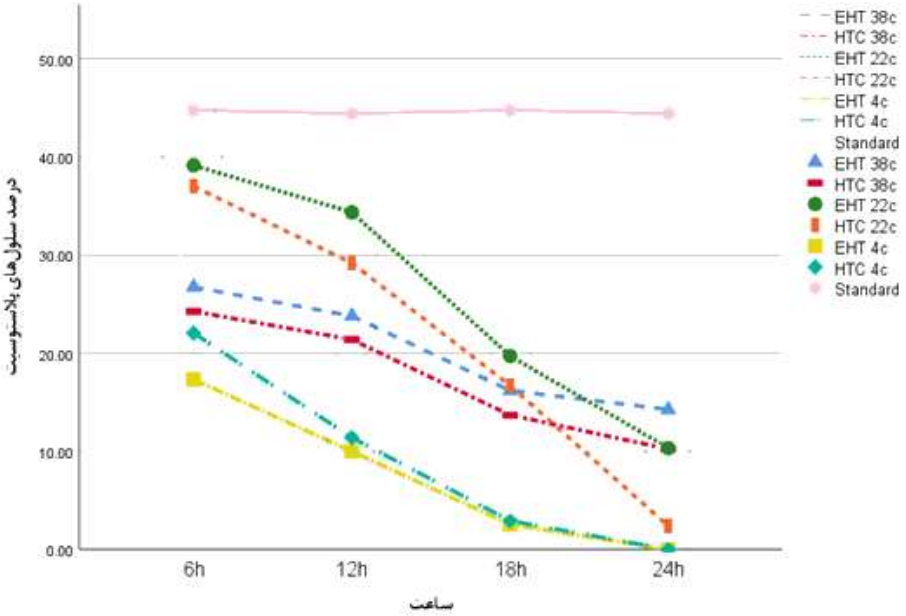

Figure 3: The percentage of blastocyst cells in various groups at different times

۶ ساعت: در این زمان، در بین گروهای درمانی، بیش‌ترین سلول‌های بلاستوسیت در دمای ۲۲ درجه تولید شده‌اند، به طوری که تعداد بلاستوسیت تولیدی در هر دو گروه EHT و HTC در این دما نسبت به دیگر گروه‌های مورد سنجش به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) بیش‌تر بوده است. همچنین بین بلاستوسیت‌های تولیدی در هر دو گروه EHT و HTC و گروه استاندارد در این زمان اختلاف معنی‌داری وجود نداشته است. کم‌ترین تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولیدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بوده است، به طوری که این مقدار در گروه EHT ۴ درجه سانتی‌گراد به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) نسبت به گروه‌های EHT ۲۲ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و HTC ۲۲ درجه سانتی‌گراد پایین‌تر بود.

۱۲ ساعت: در این زمان تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولیدی در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه استاندارد به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) کم‌تر بوده است. هیچ تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه درمانی در زمان و دمای یکسان مشاهده نشد. بیش‌ترین اثرات حفاظتی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است، به طوری که تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولید شده در این دما در هر دو گروه آزمایش، به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) نسبت به سلول‌های تولید شده در دماهای ۳۸ و ۴ درجه سانتی‌گراد بیش‌تر است. پس از آن در هر دو گروه آزمایش در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین اثرات حفاظتی معنی‌دار نسبت به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد وجود داشت (P≤۰/۰۵). کم‌ترین اثرات حفاظتی نیز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دیده شده که تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولیدی در آن به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) نسبت به دیگر گروه‌ها کم‌تر است.

۱۸ ساعت: در این زمان تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولیدی در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه استاندارد به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) کم‌تر بوده است. هیچ تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه درمانی در زمان و دمای یکسان مشاهده نشد. کم‌ترین اثرات حفاظتی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در هر دو محیط مشاهده شده است. به طوری که در این دما تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولیدی نسبت به دیگر گروه‌ها به طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) کاهش یافته است. همچنین قابل ذکر است، در بین هر دو محیط مورد آزمایش در دمای ۲۲ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد.

۲۴ ساعت: در این زمان تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولیدی در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه استاندارد به طور معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) کم‌تر بوده است. در این دما نیز کم‌ترین اثرات حفاظتی در گروه‌های با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است. به طوری که تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولید شده در این دما نسبت به دیگر گروه‌ها به طور معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) کم‌تر بوده است. به علاوه در این زمان تفاوت بین اثرات حفاظتی دو محیط مشهودتر است و تعداد سلول‌های بلاستوسیت تولید شده در گروه EHT ۲۲ درجه سانتی‌گراد نسبت به گروه HTC ۲۲ درجه سانتی‌گراد به طور معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) بیش‌تر بوده است.

بحث

مطالعات گذشته نشان می‌دهند که نقص و تأخیر در بلوغ سیتوپلاسمی تخمک و ناهمگنی در رشد آن، سه عامل اصلی در توسعه نامناسب سیستم IVM است. بنابراین ذخیره‌سازی مناسب تخمک‌های نابالغ و حفظ مرحله ژرمینال وزیکول باعث کاهش هزینه‌های تولید آزمایشگاهی رویان می‌شود از طرفی اگر تخمک‌های بالغ در زمان دیرتری لقاح یابند، به وسیله تغییرات پیچیده، عمیق و مضر سیتوپلاسمی پیر می‌شوند. روند پیری تخمک‌ها باعث کاهش فعالیت MPF (Maturation-promoting factor)، فعال شدن Exocytosis گرانول قشری، اختلال در جا به جایی میکروتوبول‌ها، تغییر در عملکرد میتوکندری و سطح ATP، سخت شدن زونا و وقوع آپوپتوزیز می‌شود و در ادامه قابلیت رشد و نمو آن‌ها کاهش می‌یابد (Suttirojpattana et al, 2016).

از آن جایی که در مورد پیری تخمک توضیح داده شد، به نظر می‌رسد اساسی‌ترین مشکل مسافت و زمانی است که برای انتقال تخمک به آزمایشگاه وجود دارد. بنابراین حفاظت از تخمک‌های نابالغ بدون کاهش توانایی آن‌ها برای سیستم IVF بسیار سودمند است. بنابراین نگهداری تخمک نابالغ قبل از شروع بلوغ، کمک به برنامه‌ریزی‌ها و دستکاری‌های بعدی می‌کند، به خصوص در زمانی که تخمک از تخمدان‌های کشتارگاهی تهیه می‌شود و حفاظت و جلوگیری از پیری تخمک‌ها اهمیت زیادی دارد (Alm et al, 2008). در مواردی برای حفظ تخمک‌ها و انتقال آن‌ها از انکوباتور استفاده می‌شود که قابلیت حمل و نقل آن به آسانی وجود ندارد. بنابراین لزوم وجود محیطی که بتواند بدون انکوباتور، بدون تأثیر منفی و سمی باعث حفظ مرحله ژرمینال وزیکول تخمک‌ها شود، وجود دارد.

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که تعداد بلوغ تخمک‌های نابالغ نگهداری شده در محیط EHT و HTCM-199 به مدت ۶ ساعت و در دمای اتاق قابل قبول است و با گروه استاندارد اختلاف آماری معنی‌داری نداشت ($P \leq ۰/۰۵$).

در گذشته مطالعات متفاوتی جهت نگهداری تخمک-های نابالغ انجام شده است. Patrick و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از بوتیرولاکتون I (B) به عنوان مهار کننده میوز، توانستند به مدت ۲۴ ساعت اجازه تقسیمات میوز را از تخمک‌ها بگیرند و سپس بلوغ این تخمک‌ها پس از انتقال به محیط IVM با گروه کنترل مقایسه کردند. نتایج نشان داد ۹۵ درصد تخمک‌های بلاک شده در مرحله اول با دز مصرفی ۱۵۰ میکرو مول بوتیرولاکتون I ، به متافاز ۲ رسیدند و تفاوتی با گروه شاهد نداشتند. با کاهش دز مصرفی این ماده به ۱۰۰ میکرومول، ۶۰ درصد تخمک‌ها بلاک شدند. در صورتی که در دز پایین‌تر میزان تولید بلاستوسیت بیش‌تر بود (۲۷ درصد در مقابل ۱۸/۸درصد). آن‌ها بیان کردند که می‌توان از این مهارکننده‌ها برای نگهداری اووسیتها قبل از IVM استفاده کرد.

Ponderato و همکارانش نشان دادند که استفاده از دزهای متفاوت بوتیرولاکتون (B) و رسکویتین (R) برای بلاک کردن میوز در بلوغ هسته‌ایی و رسیدن تخمک‌ها به مرحله متافاز ۲ تأثیر متفاوت دارد. البته ذکر کردند که دوزهای بالا می‌تواند اثرات سمی بر بلوغ تخمک داشته باشد (Ponderato et al. 2001).

Adona و همکاران در سال ۲۰۰۸ از B و R برای سرکوب و کنترل شتاب میوز استفاده کردند. با توجه به این که این مواد می‌توانند پس از انتقال به محیط بلوغ، سرعت بلوغ هسته‌ایی را افزایش دهند با دوزهای کم به محیط HTCM-199 اضافه شدند و جهت نگهداری تخمک‌های نابالغ استفاده شد. قبل از شروع IVM در ساعت صفر در گروهی که تنها B اضافه شده بود حفظ مرحله ژرمینال وزیکول درصد بالاتری نسبت به گروهی BR داشت (۱۰۰ درصد در مقابل ۸۹ درصد و $P \leq ۰/۰۵$). آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که گروه درمانی BR اثر کم‌تری در بلاک میوز دارد. همچنین گروه‌های درمانی با B و BR سرعت بیش‌تری به از سرگیری میوز در محیط بلوغ نسبت به گروه کنترل نشان دادند (۱۵ ساعت در مقابل ۱۸ ساعت).

در هر سه مطالعه ذکر شده در فوق اصرار بر استفاده دزهای پایین بلاک کننده‌ها می‌باشد و این مواد دارای دزهای مسمومیت‌زا هستند. بنابراین به کاربردن آن‌ها نیاز به تجربه و محاسبه دارد و تا حدودی می‌تواند کار را با مشکل مواجه کند.

در سال ۲۰۰۸ Alm و همکاران در ایده جدیدی، بدون استفاده از مهارکننده‌های میوز، تخمک‌های نابالغ را در دمای اتاق به مدت ۱۸ ساعت نگهداری و سپس وارد محیط بلوغ کردند. محیط به کار رفته در مطالعه آن‌ها 40% TCM-199 با نمک ارل، ۴۰ درصد TCM-199 با نمک هنکس و ۲۰ درصد FBS بود. پس از انتقال به محیط بلوغ وضعیت کروماتین تخمک‌های درمانی را در زمان‌های متفاوت بررسی کردند. تعداد بلوغ تخمک‌ها در مطالعه ذکر شده با مطالعه حاضر متفاوت بود. به صورتی که تعداد بلوغ تخمک‌ها در محیط EHT مطالعه حاضر در مقابل مطالعه Alm بیش‌تر بود. همچنین در مقایسه تعداد بلوغ تخمک‌ها و تعداد تولید بلاستوسیت در دمای اتاق به مدت ۱۸ ساعت در محیط HTCM مطالعه حاضر بیش‌تر از مطالعه Alm بود.

محققان بیان می‌کنند، میزان فسفات بالا در طی کشت سلولی در PH و هموستاز کلسیم دخالت دارد، بنابراین استفاده از HTCM-199 به واسطه کم‌تر بودن میزان فسفات نسبت به محیط PBS برتری دارد (Alm et al, 2008). با توجه به نتایج به دست آمده در دو مطالعه ذکر شده بهتر است در آینده مقایسه آماری نتایج انجام گیرد. ولی آنچه از نتایج مشخص است، محیط‌های نگهدارنده در تحقیق حاضر تعداد بالاتری را نسبت به مطالعه Alm و همکاران نشان دادند.

Osvaldo و همکاران در سال ۲۰۱۸ از محیط EHT برای نگهداری تخمک‌های نابالغ در محیط اتاق استفاده کردند و مدت زمان نگهداری ۶، ۱۰، ۱۴ ساعت را به کار بردند. در مطالعه ذکر شده نگهداری تخمک‌ها در دمای اتاق و مدت زمان ۶ و ۱۰ ساعت اثر سویی بر بلوغ تخمک‌ها و تعداد تولید بلاستوسیت نداشت. از طرفی میزان بلوغ در زمان ۱۴ ساعت نگهداری قابل قبول بود ولی عملکرد و تولید بلاستوسیت را کاهش داد. ولی در دمای ۴ و ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد میزان بلوغ تخمک و بلاستوسیت کاهش داشت. این نتایج با مطالعه حاضر در گروه‌های آزمایشی در زمان ۶ ساعت و دمای اتاق هم‌خوانی داشت. اما در مطالعه حاضر در زمان ۶ ساعت و استفاده از محیط EHT در هر سه دما، تعداد بلوغ تخمک‌ها با گروه استاندارد تفاوت آماری معنی-داری نداشت. در صورتی که تنها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد میزان تولید بلاستوسیت قابل قبول بود و با گروه استاندارد تفاوت آماری معنی‌دار نداشت (Tables 2 & 3).

همچنین در استفاده از محیط HTCM-199 در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶ ساعت تفاوت آماری معنی‌داری با گروه استاندارد مشاهده نشد و شبیه به محیط EHT عمل کرد. در بقیه زمان‌ها و دماها تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی و گروه استاندارد وجود داشت (Tables 2 & 3). بنابراین هر دو محیط استفاده شده در مطالعه حاضر عملکرد مناسبی داشتند.

مطالعات انجام شده در موش نشان داد که دما در حفظ مرحله متافاز ۲ تاثیر دارد و دمای مناسب برای حفظ تخمک‌های بالغ موش ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد است (Suttirojpattana et al, 2016; Wakayama et al, 2004; Wang et al, 2014). علاوه بر این، تفاوت بین گونه‌ایی

مختلف در حساسیت نگهداری تخمک‌ها بین گاو و موش وجود دارد. ویژگی‌های سیتوپلاسمی میکروتوبول‌ها و چربی در این تفاوت تأثیرگذار است. میکروتوبول‌ها نقش اساسی در تحرک و توزیع میتوکندری در سیتوپلاسم دارند و یک ساختار اصلی در دوک تقسیم میوز در تخمک‌ها است. تخمک گاو به واسطه داشتن مقدار زیاد چربی نسبت به موش دارای حساسیت بیش‌تری نسبت به کاهش دما می‌باشد (Suttirojpattana et al, 2016). بنابراین لزوم استفاده از محیطی که این اثرات را کاهش دهد، وجود دارد.

در بین دماهای استفاده شده، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دارای پایین‌ترین نرخ تعداد بلوغ تخمک و تولید بلاستوسیت بود. طبق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، اثرات سوء کاهش دما (۴ درجه سانتی‌گراد) و افزایش دما (۳۸ درجه سانتی‌گراد) بر بلوغ تخمک‌ها در زمان‌های ۱۸ و ۲۴ ساعت نگهداری در گروه آزمایشی EHT کم‌تر از گروه آزمایشی HTC بود.

محیط EHT برای نگهداری جنین اسب و گاو تولید شده است و ترکیبات آن توسط شرکت تولید کننده گزارش نشده است، ولی فاقد ترکیباتی با منشاء حیوانی مانند سرم است و با هیالورونان تکمیل شده است که در تنظیم بیان ژن جنین، تکثیر و تمایز سلولی نقش دارد (Osvaldo et al, 2018; Lapcik et al, 1998).

از آن جایی که مهار کننده‌های میوز مانند بوتیرولاکتون و رسکویتین باعث حفظ مرحله ژرمینال وزیکول می‌شوند ولی دوزهای بالا می‌تواند اثرات سوء و سمی در بلوغ تخمک و نهایتاً نرخ تولید بلاستوسیست داشته باشد (Alm et al, 2008)، حمل و نقل با حفظ PH و حفظ تعادل اسمزی و به همراه منبع کم CO2 و نمک‌های ارل و گلوکز ضروری است (Osvaldo et al, 2018).

محیط EHT و HTCM-199 در آزمایش حاضر نشان داد که بدون وجود مهارکننده‌های سمی میوز، فسفات و مواد مضر می‌تواند برای نگهداری تخمک نابالغ تا زمان ۶ ساعت در دمای اتاق مفید باشد و تأثیر سویی در بلوغ تخمک‌ها و تولید بلاستوسیت نداشته باشد و از همه مهم‌تر عدم نیاز به انکوباتور جهت حمل و نقل تخمک‌ها به آزمایشگاه است. پیشنهاد می‌شود مطالعات بیش‌تری در مورد محیط‌های مختلف نگهدارنده تخمک نابالغ انجام گیرد وآنالیزهای آماری بین مطالعات مختلف انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

در انتها از شرکت کشت و دام فکا کمال تشکر را داریم که در طول انجام مراحل کار با ما مساعدت لازم را به عمل آوردند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را در این پژوهش ندارند.

منابع مالی

کلیه هزینه‌های جاری در این تحقیق به صورت شخصی انجام گرفت.

منابع

Adona, P.R., Pires, P.R., Quetglas, M.D., Schwarz, K.R., and Leal, CL (2008) Nuclear maturation kinetics and in vitro embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. *Anim Reprod Sci* 104, 389-397.

Alm, H., Choi, Y., Love, L., Heleil, B., Torner, H., and Hinrichs, K. (2008) Holding bovine oocytes in theabsence of maturation inhibitors: kinetics of in vitro maturation and effect on blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology* 70, 1024–1029.

Azari-Dolatabadab. N., Rahmani. H.R., Hajian. M., Ostadhosseini. S., and Nasr-Esfahani. M.H. (2016). Effects of cilostamide and/or forskolin on the meiotic resumption and development competence of growing ovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. *Theriogenology* 85, 1483–1490.

Bilodeau-Goeseels, S. (2011) Cows are not mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 78, 734–743.

Blondin, P (2017) Logistics of large scale commercial IVF embryo production. *Reprod Fert Dev*; 29, 32–36.

Boni R (2012) Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Anim Reprod* 9, 362–369.

Carrocera, S., Caamaño, J.N., Trigal, B,. Martín, D,. and Díez, C (2016) Developmental kinetics of in vitro-produced bovine embryos: An aid for making decisions. *Theriogenology* 85(5):822-827.

Dini, P., Pascottini, O.B., Ducheyne, K., Hostens, M., and Daels, P. (2016) Holding equine oocytes in a commercial embryo-holding medium: New perspective on holding temperature and maturation time. *Theriogenology* 86, 1361–1368.

Lapčík, L., Lapcik, L., De Smedt, S., Demeester, J., and Chabrecek, P (1998) Hyaluronan: preparation structure, properties, and applications. *Chem Rev* 98: 2663–2684.

Osvaldo, B., Maaike, C., Ann Van, S., and Opsomer, G (2018). Holding immature bovine oocytes in a commercial embryo holding medium: High developmental competence for up to 10 h at room temperature. *Theriogenology*; 107, 63-69.

Patrick, L., Andras, D., Trudee, F., Xiangzhong, Y., and Maurice, B (2000) Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Molecular Reproduction and Development*; 57, 204-209.

Ponderato, N., Lagutina, I., Crotti, G., Turini, P., Galli, C., and Lazzari, G (2001) Bovine oocytes treated prior to in vitro maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. *Mol Reprod Dev*; 60, 579–585.

Suttirojpattana, T., Somfai, T., Matoba, S., Nagai, T., Parnpai, R., and Gesh, M (2016) The effect of temperature during liquid storage of in vitro-matured bovine oocytes on subsequent embryo development. *Theriogenology* 85(3): 509-518.

Tanghe, S. , Van Soom, A. , Nauwynck, H. , Coryn, M. , and de Kruif, A (2002) Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev*;61, 414-424

Wakayama, S., Thuan, N.V., Kishigami, S., Ohta, H., Mizutani, E., Hikichi, T., Miyake, M., and Wakayama, T (2004) Production of offspring from one-day-old oocytes stored at room temperature. *J Reprod Dev* 50(6):627-637.

Wang, T.Y., Li, Q., Li, Q., Li, H., Zhu, J., Cui, W., Jiao, G.Z, and Tan, J.H (2014) Non-frozen preservation protocols for mature mouse oocytes dramatically extend their developmental competence by reducing oxidative stress. *Mol Hum Reprod* 20(4),318-329.

Received: 27.10.2021
Accepted: 02.01.2022

Vol. 19, No. 2, Summer, 2023 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2022.312265.2410
DOR: 20.1001.1.17356873.1402.19.2.18.5

Comparison of Embryo Holding and HTCM-199 on bovine oocyte maturation outside the incubator and its effect on blastocyte production

Mohamadreza Nazem[1], Mehran Farhoodi Moghaddam[2*], Ghasem Akbari[3] and Mohammad Amin Eslampour[3]

[1] Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Brancch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Brancch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 27.10.2021 Accepted: 02.01.2022

Abstracts

Many cellular changes have been reported to play a role in the aging process of oocyte; however, few studies have been performed on the appropriate time and temperature for the storage. The main problem is the distance and time available for the transfer of oocytes to the laboratory, and protection of immature oocytes without reducing their ability to fertilize in vitro is very critical. The aim of this study was to compare the Embryo Holding (EH-Syngro) and HTCM-199 medium to store immature oocytes at room temperature without incubation. A total of 5268 oocytes were tested. The oocytes were stored at three temperature degrees including 4, 22 and 38 ° C for 6, 12, 18, and 24 hours. After spending the storage time, they were entered to the standard maturation environment and finally IVF was performed.There was no statistically significant difference between the experimental and control groups in terms of blastocyst production at storage of 6h. At 12 hours, oocyte maturation and blastocyst production in all groups were significantly lower than that of the standard group. EHT and HTCM-199 medium in our experiment showed that they can be useful for storing immature oocyte for up to 6 hours at room temperature and have no adverse effect on maturation of oocyte and blastocyst production, and most importantly do not need an incubator to transport the oocytes to the laboratory.

Key words: Oocyte, Blastocyst, Incubator, Embryo Holding, HTCM-199

[*] **Corresponding Author**: Mehran Farhoodi Moghaddam, Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Brancch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
E-mail: m_farhoodimog@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).