

بررسی اثر متقابل زمان و غلظت مواد محافظت کننده سرما بر انجماد شیشه‌ای تخمک‌های نابالغ گاوی با روش کرایوتاپ

کاوه علی‌زاده^۱، نجمه داودیان^{۲*}، علی کدیور^۳، ابراهیم احمدی^۲، ناصر شمس اسفندآبادی^۳

۱. دانشجوی دکتری تخصصی رشته فناوری‌های تولیدمثلی در دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

پذیرش: ۱ خردادماه ۱۴۰۵

دریافت: ۲۹ دی‌ماه ۱۴۰۴

چکیده

این مطالعه باهدف ارزیابی برهم‌کنش زمان و غلظت مواد محافظت‌کننده سرما (CPA) در انجماد شیشه‌ای تخمک‌های نابالغ گاوی انجام شد. در این پژوهش، ۲۱۲ مجموعه تخمک-سلول کومولوس (COC) نابالغ باکیفیت مطلوب در قالب پنج پروتکل متفاوت انجماد شیشه‌ای با روش کرایوتاپ مورد بررسی قرار گرفتند. متغیرهای مستقل شامل غلظت‌های مختلف اتیلن گلیکول (EG) و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) در محیط‌های تعادل (EM) و انجماد (VM) به همراه زمان‌های مواجهه متفاوت (۳۰ ثانیه تا ۳ دقیقه) بود. نتایج ارزیابی مورفولوژیک نشان داد که پروتکل اول (۱ دقیقه EM با ۱۰ درصد EG/DMSO و ۳۰ ثانیه VM با ۲۰ درصد EG/DMSO) بیشترین درصد تخمک‌های سالم ($4/24 \pm 83/34$) را به همراه داشت، اما هیچ‌یک از تخمک‌ها در درجه C (تخمک زنده و کمتر از نیمی از سلول‌های کومولوس مرده) قرار نگرفتند. در مقابل، پروتکل چهارم (۲ دقیقه EM با ۱۰ درصد EG/DMSO و ۴۵ ثانیه VM با ۲۰ درصد EG/DMSO) بالاترین درصد درجه C ($0/07 \pm 44/18$) را نشان داد. تحلیل رگرسیون لجستیک نیز تأیید کرد که زمان ۳۰ ثانیه در VM شانس قرارگیری در درجه B (تخمک زنده ولی بیش از نیمی از سلول‌های کومولوس مرده) را افزایش می‌دهد ($P < 0/001$)، درحالی‌که افزایش زمان EM به ۲ دقیقه شانس قرارگیری در درجه C را کاهش می‌دهد ($P < 0/001$). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که موفقیت در انجماد شیشه‌ای تخمک‌های نابالغ گاوی وابسته به تعادل بهینه بین غلظت و زمان مواجهه با ضدیخ‌هاست و پروتکل چهارم به‌عنوان روش بهینه برای حفظ هم‌زمان مورفولوژی و کیفیت زنده‌مانی معرفی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: انجماد شیشه‌ای، تخمک نابالغ گاوی، مواد محافظت‌کننده سرما، زنده‌مانی

مقدمه

اصلاح‌شده ایفا می‌کنند (۵). یکی از چالش‌های مهم در این حوزه، حفظ تخمک‌ها و رویان‌های تولیدشده در شرایط آزمایشگاهی است که برای این منظور، از روش‌های انجماد شیشه‌ای استفاده می‌شود (۱۲). انجماد شیشه‌ای یکی از روش‌های مؤثر در انجماد سلول‌های تولیدمثلی، به‌ویژه در حفظ تخمک‌ها و رویان‌های گاوی، کاربرد گسترده‌ای یافته است. در سال‌های اخیر، انجماد تخمک‌های نابالغ به‌عنوان یکی از روش‌های نوین در حفظ ذخایر ژنتیکی دام‌های بارزش و نیز حفظ تنوع ژنتیکی موردتوجه قرار گرفته است.

در سال‌های اخیر، استفاده از فناوری‌های کمک‌باروری (ARTs) در دامپزشکی و به‌ویژه در صنعت دامپروری، به‌عنوان ابزاری مؤثر در اصلاح نژاد، حفظ منابع ژنتیکی بارزش و افزایش بهره‌وری ژنتیکی موردتوجه قرار گرفته است (۱۵ و ۱۶). در این میان، روش‌هایی نظیر لقاح خارج‌رحمی (IVF)، کشت رویان (IVC)، انتقال رویان (ET)، کلونینگ از طریق انتقال هسته سلول سوماتیک (SCNT) و ویرایش ژنومی، نقش مهمی در تولید دام‌های

دیگری مانند ترکیب پایه محلول، حضور ساکارز نفوذناپذیر، نوع روش و تجهیزات انجماد (Cryolock, Cryotop), OPS) و دمای مرحله تعادل نیز بر نتایج انجماد تأثیر می‌گذارند (۱۳ و ۱۷). بسیاری از پژوهش‌های پیشین عمدتاً به بررسی اثرات مجزای غلظت مواد محافظت‌کننده سرما (CPA) با زمان مواجهه با آن‌ها پرداخته‌اند، اما اثر متقابل و تعاملی این دو عامل کلیدی (غلظت و زمان) به‌طور نظام‌مند و در قالب یک طراحی فاکتوریل کامل که بتواند بهترین ترکیب را شناسایی کند، کمتر مورد ارزیابی قرار گرفته است. همچنین، پروتکل واحد و بهینه‌ای که بتواند به‌طور قطعی برای انجماد شیشه‌ای تخمک‌های نابالغ گاوی با استفاده از روش کرایوتاپ، ضمن حفظ حداکثر بقای ساختاری و توان تکوینی، ارائه گردد، هنوز به‌طور کامل تدوین و تثبیت نشده است.

از دیدگاه کاربردی، تخمک‌های نابالغ جمع‌آوری‌شده از کشتارگاه، بیش از ۹۰ درصد کل تخمک‌های قابل‌استفاده در کشورهای درحال توسعه را تشکیل می‌دهند و هزینه تولید هر بلاستوسیست از این منبع، تقریباً یک‌دهم تخمک‌های بالغ حاصل از OPU-IVM است (۹ و ۱۶). از طرف دیگر، بسیاری از مطالعات پیشین تنها یک یا دو غلظت یا زمان را بررسی کرده‌اند و تعداد محدودی به روش فاکتوریل کامل، اثر ترکیبی غلظت و زمان را ارزیابی کرده‌اند؛ لذا هدف از مطالعه حاضر، بررسی هم‌زمان اثر غلظت‌های مختلف EG/DMSO (۰,۵، ۱، ۲ و ۳ درصد) و زمان‌های مواجهه (۳۰ ثانیه، ۴۵ ثانیه، ۱ و ۲ و ۳ دقیقه) در محیط‌های پایه (BM)، تعادل (EM) و انجماد (VM) بر بقای ساختاری، و درصد زنده‌مانی تخمک‌های به‌دست‌آمده از تخمدان‌های کشتارگاهی، پس از انجماد شیشه‌ای و ذوب به روش Cryotop (ابزار انجماد شیشه‌ای) و انتخاب بهینه‌ترین روش است.

مواد و روش کار

این پژوهش در پژوهشکده فناوری جنین دام دانشگاه شهرکرد انجام شد. تخمدان‌های گاو پس از جمع‌آوری از کشتارگاه (در کمتر از ۳-۲ ساعت) و در محلول سالین فیزیولوژی استریل (۳۲-۲۸ درجه سانتی‌گراد) به

در این روش، تخمک‌هایی که هنوز به مرحله‌ی متافاز دوم (MII) نرسیده‌اند، پس از بازیابی از تخمدان، بدون نیاز به تحریک هورمونی، منجمد می‌شوند. همچنین، امکان حفظ تخمک‌های نابالغ در شرایطی که امکان رسیدگی درون تخمدانی وجود ندارد (مانند شرایط سرطانی) فراهم می‌شود (۶). درحالی‌که موفقیت انجماد رویان‌های گاوی در مراحل مورولا و بلاستوسیست، بالا گزارش شده است (بقای بیش از ۹۰ درصد پس از ذوب و باروری ۴۰ تا ۵۰ درصد)، انجماد تخمک‌های نابالغ (GV) همچنان با محدودیت‌هایی همراه است (۱۴ و ۱۵). این محدودیت‌ها شامل کاهش بقای ساختاری (۸۰ تا ۸۵ درصد)، کاهش درصد بلوغ (۵۰ تا ۶۰ درصد) و کاهش نرخ تولید بلاستوسیست (۱۵ تا ۲۵ درصد) است (۱۴ و ۱۵). ویژگی‌های منحصربه‌فرد تخمک‌های نابالغ گاوی، از جمله نفوذپذیری پایین غشای پلاسمایی، نسبت حجم به سطح بالا، میتوکندری‌های نابالغ، سازمان‌دهی ناقص کروماتین، نقص در ترمیم DNA و حساسیت بالا به استرس اکسیداتیو و آپوپتوز، از عوامل اصلی این ناکارآمدی شناخته می‌شوند (۱-۳).

در فرایند انجماد شیشه‌ای، رعایت تعادل میان نفوذ کافی مواد محافظت‌کننده سرما (CPA) و کاهش زمان و حجم محلول، نقش تعیین‌کننده‌ای در موفقیت انجماد دارد (۲ و ۷). ترکیب اتیلن گلیکول (EG) و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به دلیل نفوذپذیری بالا و سمیت نسبتاً پایین، پرکاربردترین CPA در پروتکل‌های انجماد تخمک گاوی است (۱۱ و ۱۸ و ۱۹). با این حال، نتایج مطالعات اخیر درباره غلظت و زمان بهینه این ترکیب، متناقض گزارش شده است. برخی مطالعات استفاده از غلظت ۱۰ درصد EG/DMSO و زمان مواجهه ۱ تا ۲ دقیقه را پیشنهاد کرده‌اند که منجر به بقای ساختاری بالا و توان تکوینی متوسط می‌شود (۳ و ۴ و ۲۱). در مقابل، استفاده از غلظت ۲۰ درصد و زمان کوتاه (۳۰ تا ۴۵ ثانیه)، نرخ انجماد شیشه‌ای را افزایش می‌دهد؛ اما آسیب میتوکندریایی شدیدی ایجاد می‌کند (۱۰ و ۲۰). برخی مطالعات نیز غلظت‌های متوسط (۷/۵ تا ۱۰ درصد) و زمان ۲ تا ۳ دقیقه را بهترین تعادل بین بقا و توان تکوینی گزارش کرده‌اند (۳ و ۱۱). علاوه بر غلظت و زمان مواجهه، عوامل



شامل ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و محیط کشت HTCM بود.

COCها به سه محیط مجزا با ترکیبات و زمان مشخص منتقل شدند:

- ۱- محیط پایه (BM): به مدت ۱ دقیقه.
 - ۲- محیط تعادل (EM): شامل محیط پایه و غلظت‌های متفاوت اتیلن گلیکول و دی متیل سولفوکساید بوده و مدت زمان مواجهه باتوجه به پروتکل مورد استفاده (۱، ۲ یا ۳ دقیقه) تنظیم شد.
 - ۳- محیط انجماد (VM): شامل محیط پایه و غلظت‌های متفاوت اتیلن گلیکول، دی متیل سولفوکساید و سوکروز بوده و مدت زمان مواجهه باتوجه به پروتکل مورد استفاده (۳۰، ۴۵ یا ۶۰ ثانیه) تنظیم شد.
- در نهایت، پس از سپری شدن زمان‌های مشخص، COCها بلافاصله بر روی کرایوتاپ (Cryotop) قرار گرفته و درون مخزن حاوی نیتروژن مایع (N₂) نگهداری شدند.

در این مطالعه، پنج پروتکل انجماد شیشه‌ای متفاوت برای تخمک‌های نابالغ گاوی طراحی و اجرا شد. ترکیبات و زمان‌های مواجهه هر پروتکل در جدول ۱ آورده شده است.

آزمایشگاه منتقل شده و پس از حذف بافت‌های اضافی و سپس چند دفعه شست‌وشوی تخمدان‌ها در محلول نرمال سالین (دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد)، مجموعه تخمک-سلول‌های کومولوس (COC) با استفاده از روش آسپیراسیون و با استفاده از سرنگ و نیدل شماره ۱۸ جمع‌آوری شد. COCها بلافاصله از مایع فولیکولی جدا شده و در محیط HEPES-TCM حاوی ۱۰ درصد FBS شست‌وشو داده شدند.

به منظور شناسایی و انتخاب COCها، مایع حاصل از آسپیراسیون به یک پتری‌دیش بزرگ خط‌کشی شده ۱۰۰ میلی‌متری که بر روی صفحه گرم ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد قرار داشت، منتقل شد. COCهای باکیفیت مطلوب زیر میکروسکوپ نوری شناسایی و جدا شدند. معیارهای انتخاب شامل حداقل سه لایه سلول کومولوس متراکم و سیتوپلاسم یکنواخت و گرانوله بود. پس از انتخاب COCها به قطره‌های حاوی محیط شست‌وشو-HEPES (TCM 199 + FBS 10% منتقل شدند.

پس از چند مرحله شست‌وشو و شناسایی نهایی، COCهای منتخب شمارش شده و برای انجماد آماده شدند. محیط پایه (BM) در تمامی پروتکل‌ها ثابت بوده و

جدول ۱- مشخصات پروتکل‌های انجماد از نظر غلظت ضدیخ‌ها و زمان بندی مراحل فرایند انجماد شیشه‌ای تخمک‌های نابالغ گاوی

پروتکل‌ها	ترکیب محیط تعادل (EM)	زمان تعادل	ترکیب محیط انجماد (VM)	زمان انجماد
۱	HTCM+FBS+DMSO+EG ۱۰٪	۱ دقیقه	HTCM+FBS+DMSO+EG ۲۰٪ +۰/۵M sucrose	۳۰ ثانیه
۲	HTCM+FBS+DMSO+EG ۱۰٪	۳ دقیقه	HTCM+FBS+DMSO+EG ۲۰٪ +۰/۵M sucrose	۴۵ ثانیه
۲	HTCM+FBS+DMSO+EG ۶/۵٪	۳ دقیقه	HTCM+FBS+DMSO+EG ۱۰٪ +۰/۵M sucrose	۳۰ ثانیه
۴	HTCM+FBS+DMSO+EG ۱۰٪	۲ دقیقه	HTCM+FBS+DMSO+EG ۲۰٪ +۰/۵M sucrose	۴۵ ثانیه
۵	HTCM+FBS+DMSO+EG ۷/۵٪	۳ دقیقه	HTCM+FBS+DMSO+EG ۱۵٪ +۰/۵M sucrose	۶۰ ثانیه



تخمک‌های مرده: رنگ‌پذیری قرمز در سیتوپلاسم (آسیب غشای پلاسمایی و نفوذ PI به داخل سلول).
ارزیابی زنده‌مانی COCها در سه درجه کیفی انجام پذیرفت:

درجه A: COCها شامل تخمک مرده و بیش از نیمی از سلول‌های کومولوس مرده هستند. این درجه نشان‌دهنده آسیب مورفولوژی شدید است.

درجه B: COCها شامل تخمک زنده ولی بیش از نیمی از سلول‌های کومولوس مرده هستند.

درجه C: COCها شامل تخمک زنده و کمتر از نیمی از سلول‌های کومولوس مرده هستند.

در این پژوهش، به منظور ارزیابی اثرات متقابل زمان مواجهه و غلظت مواد محافظت‌کننده سرما (CPA) بر زنده‌مانی و کیفیت مورفولوژیک COCهای نابالغ گاوی، آزمایش‌ها در قالب ۵ پروتکل و در ۴ تکرار بیولوژیک تدوین شدند. در مجموع، ۲۱۲ عدد تخمک نابالغ گاوی با کیفیت ظاهری مناسب (دارای سیتوپلاسم یکنواخت و حداقل ۳ لایه سلول‌های کومولوس) انتخاب و به طور تصادفی در گروه‌های آزمایشی توزیع شدند. آزمایش در دو مرحله اصلی تعادل و انجماد شیشه‌ای طراحی گردید. متغیرهای مستقل شامل زمان مواجهه در محیط تعادل (EM_time)، غلظت ضدیخ‌ها در محیط تعادل (EM_CPA)، زمان مواجهه در محیط انجماد (VM_time) و غلظت ضدیخ‌ها در محیط انجماد (VM_CPA) بود. با استفاده از این پروتکل‌های مختلف، ابتدا مورفولوژی تخمک‌ها ارزیابی شد و سپس زنده‌مانی آن‌ها با روش رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید تعیین گردید.

برای بررسی تأثیر پروتکل‌های مختلف انجماد شیشه‌ای بر کیفیت تخمک‌ها از تحلیل‌های آماری استفاده شد. سطح معناداری در تمامی تحلیل‌ها ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد. برای مقایسه میانگین کیفیت تخمک‌ها در پنج پروتکل مختلف انجماد شیشه‌ای تحلیل واریانس یک‌طرفه انجام شد تا تفاوت‌های معناداری بین گروه‌ها مشخص شود. برای درک عمیق‌تر روابط و بررسی هم‌زمان چندین متغیر پیش‌بین، از مدل‌های خطی تعمیم‌یافته (GLM) استفاده شد. این رویکرد امکان در نظر گرفتن توزیع‌های غیرنرمال

ذوب با روش چهارمرحله‌ای انجام شد. کرایوتاپ‌ها به ترتیب زیر به چهار محیط ذوب منتقل شدند ابتدا محیط TS1 شامل $20\% \text{FBS} + 1\text{M sucrose} + \text{HTCM}$ سپس محیط TS2 شامل $20\% \text{FBS} + 0.5\text{M HTCM}$ پس از آن محیط TS3 شامل $20\% \text{FBS} + \text{HTCM}$ و در نهایت محیط BM شامل $20\% \text{FBS} + \text{HTCM}$ پروتکل ذوب COCها در چهار مرحله متوالی و با محلول‌های حاوی غلظت‌های پلکانی سوکروز انجام شد. ابتدا نمونه‌ها به مدت ۸۰ ثانیه در محلول TS1 قرار گرفتند. سپس به ترتیب به مدت ۴۰ ثانیه در TS2 و ۴۰ ثانیه در TS3 انتقال یافتند. در نهایت، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در محیط BM شستشو داده شدند تا تعادل اسمزی کامل برقرار گردد.

ارزیابی کیفیت تخمک‌ها پس از ذوب با ارزیابی مورفولوژی و ارزیابی زنده‌مانی انجام شد. برای ارزیابی مورفولوژی، پس از ذوب، مورفولوژی تخمک‌ها زیر میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی چشمی قرار گرفتند. تخمک‌های دارای غشای سالم، شکل کروی نرمال، سطح صاف، سیتوپلاسم تیره و گرانوله یکنواخت به‌عنوان تخمک‌های سالم در نظر گرفته شدند و تخمک‌های دارای غشای آسیب‌دیده و سیتوپلاسم قهوه‌ای کم‌رنگ، دجنره در نظر گرفته شدند.

به‌منظور تعیین دقیق میزان زنده‌مانی COCها پس از فرایند ذوب، از رنگ پروپیدیوم یدید (Propidium Iodide) استفاده شد. این رنگ به دلیل نفوذناپذیری نسبت به غشای سالم، تنها وارد سلول‌هایی می‌شود که یکپارچگی غشای پلاسمایی آن‌ها از دست‌رفته باشد.

پس از انجام فرایند ذوب، COCها پس از خروج از محیط پایه، به مدت ۵ دقیقه در محلول (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروپیدیوم یدید و ۱۰۰ میکرولیتر HTCM مکمل شده با ۱۰ درصد FBS) در محیط آزمایشگاه (دمای ۲۵ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. سپس، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفتند:

تخمک‌های زنده: عدم رنگ‌پذیری سیتوپلاسم (غشای پلاسمایی سالم و عدم نفوذ PI).



جدول ۲، پروتکل ۱ بیشترین درصد تخمک‌های سالم (۸۳/۳۴ درصد) را نشان داد. در مقابل، پروتکل ۵ با کمترین درصد تخمک‌های سالم (۶۸/۳۰ درصد) همراه بود. تحلیل آماری ANOVA نشان داد که علی‌رغم تفاوت‌های عددی، میانگین تعداد تخمک‌های سالم بین گروه‌ها از نظر آماری تفاوت معناداری نداشت ($P > 0.05$).

متغیر وابسته (کیفیت تخمک) را فراهم کرد و چندین متغیر پیش‌بین، شامل زمان تعادل، غلظت‌های ضدیخ (مانند اتیلن گلیکول و دی‌متیل سولفوکساید) و سایر پارامترهای انجماد شیشه‌ای، هم‌زمان وارد مدل شدند.

نتایج

پس از فرایند انجماد و ذوب، تخمک‌های نابالغ از نظر مورفولوژی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس داده‌های

جدول ۲- مقایسه ارزیابی مورفولوژیک تخمک‌های نابالغ گاوی پس از انجماد شیشه‌ای و ذوب با پروتکل‌های مختلف

پروتکل‌ها (تعداد تخمک-کومولوس‌ها)	تخمک-کومولوس‌های سالم (درصد)	تخمک-کومولوس‌های دجنره (درصد)
پروتکل ۱ (۳۶)	۸۳/۳۴ ^b	۱۶/۶۶ ^a
پروتکل ۲ (۵۰)	۷۰/۰۰ ^b	۳۰/۰۰ ^a
پروتکل ۳ (۴۲)	۶۹/۰۵ ^b	۳۰/۹۵ ^a
پروتکل (۴۳)	۷۶/۷۵ ^b	۲۳/۲۵ ^a
پروتکل (۴۱)	۶۸/۳۰ ^b	۳۱/۷۰ ^a

^{a,b,c} حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری ($P < 0.05$) است.

درصدهای مربوط به درجه B و C با یکدیگر برابر و معادل ۴۴/۱۸ درصد بودند و درجه A کمترین میزان (۱۱/۶۲ درصد) را شامل شد. در پروتکل ۵ که روی ۴۱ نمونه صورت گرفت، ۶۳/۴۱ درصد نتایج در درجه B، ۳۱/۷۰ درصد در درجه A و تنها ۴/۸۷ درصد در درجه C مشاهده گردید. در مقایسه پروتکل‌ها با همدیگر بیشترین درصد درجه C مربوط به پروتکل ۴ بود (۴۴/۱۸ درصد) و بیشترین درصد درجه B مربوط به پروتکل ۱ بود (۷۷/۷۷ درصد) و در نهایت بیشترین درصد درجه A در پروتکل ۵ مشاهده شد (۳۱/۷۰ درصد).

نتایج وضعیت زنده‌مانی مجموعه تخمک-کومولوس‌ها در سه درجه A، B و C در جدول ۳ آورده شده است. در پروتکل ۱ که با ۳۶ نمونه انجام شد، بیشترین میزان مربوط به درجه B (۷۷/۷۷ درصد) بود و پس از آن درجه A با ۲۲/۲۲ درصد قرار داشت، درحالی‌که درجه C هیچ درصدی (۰/۰۰ درصد) را به خود اختصاص نداد. در پروتکل ۲ با ۵۰ نمونه، درجه B معادل ۴۰/۰۰ درصد، درجه C معادل ۳۸/۰۰ درصد و درجه A معادل ۲۲/۰۰ درصد گزارش شد. در پروتکل ۳ که شامل ۴۲ نمونه بود، ۴۷/۶۱ درصد از نمونه‌ها در درجه B، ۳۳/۳۳ درصد در درجه C و ۱۹/۰۴ درصد در درجه A قرار داشتند. در پروتکل ۴ با ۴۳ نمونه،

جدول ۳- مقایسه زنده‌مانی COC های نابالغ گاوی منجمد و ذوب شده با روش انجماد شیشه‌ای

گروه‌ها (تعداد تخمک-کومولوس‌ها)	درجه A	درجه B	درجه C
پروتکل ۱ (۳۶)	۲۲/۲۲ ^{ab}	۷۷/۷۷ ^a	۰/۰۰ ^a
پروتکل ۲ (۵۰)	۲۲/۰۰ ^{ab}	۴۰/۰۰ ^b	۳۸/۰۰ ^b
پروتکل ۳ (۴۲)	۱۹/۰۴ ^{ab}	۴۷/۶۱ ^b	۳۳/۳۳ ^b
پروتکل (۴۳)	۱۱/۶۲ ^{ab}	۴۴/۱۸ ^b	۴۴/۱۸ ^b
پروتکل (۴۱)	۳۱/۷۰ ^{abc}	۶۳/۴۱ ^{ab}	۴/۸۷ ^a

^{a,b,c} حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری ($P < 0.05$) است.



بحث

انجماد شیشه‌ای تخمک‌های نابالغ گاوی به‌عنوان راهبردی کلیدی در حفظ ذخایر ژنتیکی و پشتیبانی از فناوری‌های کمک‌باروری، همچنان با چالش‌های بنیادین در حفظ یکپارچگی ساختاری و عملکردی سلول همراه است. یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که موفقیت این فرایند به تعامل دقیق میان غلظت و مدت‌زمان مواجهه با مواد محافظت‌کننده سرما (CPA) بستگی دارد. به‌عبارت‌دیگر، کیفیت زنده‌مانی تخمک‌های منجمدشده تابع تعادل میان نفوذپذیری غشایی، کنترل تنش اسمزی و محدودسازی سمیت شیمیایی است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پروتکل ۴ (زمان تعادل ۲ دقیقه در غلظت ۱۰ درصد EG/DMSO و زمان انجماد ۴۵ ثانیه در غلظت ۲۰ درصد) بالاترین درصد تخمک‌های درجه C را ایجاد کرد، درحالی‌که پروتکل ۱ با کوتاه‌ترین زمان مواجهه (۱ دقیقه تعادل و ۳۰ ثانیه انجماد) بیشترین درصد تخمک‌های ظاهرأ سالم از نظر مورفولوژی را نشان داد؛ اما فاقد تخمک‌های درجه C بود. این تناقض ظاهری بیانگر آن است که تنها سالم‌بودن تخمک از نظر مورفولوژی، نمی‌تواند شاخص کافی برای موفقیت انجماد باشد و باید معیارهای دیگری (کیفیت زنده‌مانی) نیز مدنظر قرار گیرد.

از دیدگاه مکانیسمی، آسیب‌های ناشی از انجماد شیشه‌ای چندلایه و پیچیده‌اند. نخست، تنش اسمزی نقش‌محوری دارد. نفوذ سریع CPAها موجب کاهش حجم سلولی و افزایش تنش غشایی می‌شود و در صورت کوتاه‌بودن زمان تعادل، ورود ناکافی CPA می‌تواند زمینه‌ساز تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی گردد. در مقابل، افزایش بیش از حد زمان مواجهه، خطر سمیت شیمیایی، تخریب پروتئین‌ها و اختلال در ساختارهای سیتواسکلتی را افزایش می‌دهد. همان‌گونه که Arav و همکاران در سال‌های ۲۰۱۴ و ۲۰۲۳ اشاره کرده‌اند، نفوذپذیری پایین غشای پلاسمایی تخمک‌های گاوی ایجاب می‌کند که زمان تعادل کافی برای برقراری هموستاز اسمزی در نظر گرفته شود، اما این زمان

با استفاده از رگرسیون لجستیک، تأثیر چهار متغیر مستقل زمان‌های VM، EM و ضدیخ‌های استفاده شده در مراحل EM و VM بر متغیرهای وابسته شامل تخمک-کومولوس‌های درجه A، B، C و تخمک‌های سالم و دجنره مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تخمک-کومولوس‌های درجه A، تأثیر هیچ‌کدام از متغیرهای مستقل در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار نبود و تنها تأثیر زمان EM به مدت ۲ دقیقه به سطح معنی‌داری نزدیک بود ($P = 0.069$ ، $B = 0.94$) که به این معنی است که به‌ازای هر ۱ واحد افزایش در زمان EM شانس قرارگرفتن تخمک در درجه A به میزان ۰/۹۴ برابر افزایش پیدا می‌کند.

برای تخمک-کومولوس‌های درجه B، تأثیر زمان VM به مدت ۳۰ ثانیه معنی‌دار بود ($P = 0.001$ ، $B = 1/658$) که به این معنی است که به‌ازای هر ۱ واحد افزایش در زمان VM شانس قرارگرفتن تخمک در درجه B برابر افزایش پیدا کرد؛ همچنین تأثیر EM به مدت ۲ دقیقه نیز نزدیک به معنی‌داری بود ($P = 0.079$ ، $B = 0.784$) که به این معنی است که به‌ازای هر ۱ واحد افزایش در زمان EM شانس قرارگرفتن تخمک در درجه B برابر افزایش پیدا کرد.

برای تخمک-کومولوس‌های درجه C، تأثیر EM به مدت ۲ دقیقه معنی‌دار بود ($P = 0.001$ ، $B = -2/737$) که به این معنی است که به‌ازای هر ۱ واحد افزایش در زمان EM شانس قرارگرفتن تخمک در درجه C به میزان ۲/۷۳ برابر کاهش پیدا کرد؛ همچنین در این گروه تأثیر VM به مدت ۳۰ ثانیه نیز معنی‌دار بود ($P = 0.001$ ، $B = -19/062$) که به این معنی است که به‌ازای هر ۱ واحد افزایش در زمان VM شانس قرارگرفتن تخمک در درجه C برابر کاهش پیدا کرد. در مجموع این داده‌ها نشان می‌دهند که افزایش زمان در مرحله تعادل و انجماد احتمال آسیب سلولی را افزایش می‌دهد. در مورد تخمک‌های دجنره تأثیر هیچ یک از متغیرهای مستقل معنی‌دار نبود.



غلظت‌های متعادل (۷/۵ درصد در محیط تعادل و ۱۵ درصد در محیط انجماد) مورفولوژی مناسبی ایجاد می‌کند، اما کیفیت زنده‌مانی و درصد تکوین همچنان پایین‌تر از تخمک‌های تازه باقی می‌ماند (۲۱). همچنین، مطالعه Kuwayama و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر اهمیت روش Cryotop به‌عنوان یک ابزار کارآمد برای انجماد شیشه‌ای با حداقل حجم محیط انجماد تأکید کرده است (۷). باین‌حال، موفقیت این روش وابسته به بهینه‌سازی پارامترهای زمانی و غلظتی است. در مطالعه حاضر، پروتکل ۵ با غلظت‌های مشابه و زمان طولانی‌تر (۳ دقیقه تعادل و ۶۰ ثانیه انجماد) بالاترین درصد درجه A را نشان داد که بیانگر حساسیت بالای تخمک‌های نابالغ به مواجهه طولانی حتی در غلظت‌های میانی است. در مقابل، یافته‌های Dinnyes و همکاران در سال ۲۰۰۰ مبنی بر موفقیت ترکیب ۱۰ درصد در محیط تعادل و ۲۰ درصد در محیط انجماد در دستیابی به درصد تکوینی بالا پس از فعال‌سازی پارتوژنتیک، IVF و SCNT (۴)، با نتایج پروتکل ۴ همخوانی دارد و نشان می‌دهد که این ترکیب غلظتی در صورت تنظیم دقیق زمان، می‌تواند کارآمد باشد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که موفقیت انجماد شیشه‌ای تخمک‌های نابالغ گاو با کیفیت زنده‌مانی و شاخص‌های عملکردی مرتبط است. پروتکل ۴ در این پژوهش با زمان تعادل ۲ دقیقه (۱۰ درصد EG/DMSO) و زمان انجماد ۴۵ ثانیه (۲۰ درصد EG/DMSO به همراه سوکروز) بهترین تناسب میان حفظ مورفولوژی و زنده‌مانی سلول را ایجاد کرده و به‌عنوان نقطه آغاز برای تدوین پروتکل‌های استاندارد توصیه می‌شود.

لازم به ذکر است که به‌منظور بررسی دقیق‌تر و تنظیم پروتکل‌های بهینه برای انجماد تخمک گاو، مطالعاتی در زمینه تحلیل تکوینی، ارزیابی شاخص‌های مولکولی و عملکردی، ارزیابی اثرات بلندمدت انجماد بر بیان ژنومیک و اپی‌ژنتیک جنین‌های حاصل از تخمک‌های منجمد شده، توسعه مدل‌های آماری پیشرفته‌تر برای تحلیل تعاملات پیچیده میان غلظت CPA، زمان مواجهه، و پارامترهای مورفولوژیک و عملکردی و مقایسه پروتکل‌های بهینه‌شده انجماد شیشه‌ای با

باید در محدوده‌ای باشد که از سمیت تجمعی جلوگیری کند (۱ و ۲). در این چارچوب، عملکرد برتر پروتکل ۴ را می‌توان ناشی از دستیابی به نقطه تعادل دینامیک میان نفوذ کافی CPA و پیشگیری از سمیت دانست؛ نقطه‌ای که در پروتکل‌های با زمان کوتاه‌تر (۳۰ ثانیه) یا طولانی‌تر (۶۰ ثانیه) به‌درستی حاصل نشده است. علاوه بر تنش اسمزی، آسیب به اسکلت سلولی و دوک میتوزی از عوامل تعیین‌کننده کاهش کیفیت تکوینی تخمک‌های منجمد شده است. DMSO و EG در غلظت‌های بالا می‌توانند موجب دپلمیریزه شدن میکروتوبول‌ها و اختلال در آرایش کروموزومی شوند که پیامد آن افزایش خطر آنوپلوئیدی و کاهش توان بلوغ هسته‌ای است. در تخمک‌های نابالغ گاو که به‌طور ذاتی دارای سازمان‌دهی سیتوپلاسمی حساس‌تری هستند، این اثرات تشدید می‌شود؛ بنابراین، انتخاب زمان ۴۵ ثانیه در محیط انجماد در پروتکل ۴ احتمالاً امکان نفوذ مؤثر CPA را فراهم کرده، بدون آنکه به سطحی از سمیت برسد که ساختارهای سیتواسکلتی را به‌طور گسترده مختل کند.

بعد دیگر آسیب، اختلال در عملکرد میتوکندری و افزایش استرس اکسیداتیو است. تحلیل رگرسیون لجستیک در مطالعه حاضر نشان داد که زمان مواجهه ۳۰ ثانیه‌ای در محیط انجماد شانس قرارگیری تخمک در درجه B را افزایش می‌دهد، اما افزایش زمان تعادل به ۲ دقیقه شانس درجه C را کاهش می‌دهد. این یافته‌ها با گزارش Catandi و همکاران در سال ۲۰۲۴ همسو است که نشان دادند تعامل غلظت-زمان CPA بر فعالیت میتوکندریایی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) اثرگذار است (۳). غلظت‌های بالا همراه با زمان کوتاه می‌توانند هرچند درصد انجماد اولیه موفق را افزایش دهند، اما با افزایش ROS و کاهش ATP، ظرفیت تکوینی را محدود کنند. در این زمینه، برتری نسبی پروتکل ۴ احتمالاً به دلیل حفظ بهتر تعادل اکسیداتیو و پایداری میتوکندریایی بوده است.

مقایسه یافته‌های حاضر با مطالعات پیشین نیز اهمیت تنظیم دقیق پارامترهای زمان و غلظت را تأیید می‌کند. Zhou و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که استفاده از



- human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 2007; 67(1): 73-80.
8. Luciano AM, Franciosi F, Modena SC, Lodde V. The mitochondrial life cycle during oocyte maturation and developmental competence in cattle. *International J Mol Sci*. 2021; 22(9): 4567.
 9. Lonergan P, Fair T. Lessons from cattle oocytes: implications for in vitro embryo production. *Theriogenology*. 2016; 86(8): 1874-1882.
 10. Magnusson V, Feitosa WB, Goissis MD, Yamada C, Tavares LMT, DAvila Assumpcao MEO, Visintin JA. Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. *Anim Reprod Sci*, 2008; 106(3-4): 265-273.
 11. Morató R, Mogas T. CPA toxicity in bovine oocytes: a review. *Anim Reprod Sci*. 2022; 241, 106933.
 12. Mara, L, Casu S, Carta A, Dattena M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim Reprod Sci*, 2013; 138: 25-38.
 13. Papis K, Shimizu M, Izaike Y. Vitrification devices for bovine oocytes: a comparative study. *CryoLetters*. 2019; 40(2): 123-130.
 14. Ribas IC, Silva CP, Figueiredo RA. Advances and challenges in bovine embryo cryopreservation and transfer. *Theriogenology*. 2021; 165: 100-110.
 15. Rocha CC, Bhat MH, Leao BC. Oocyte vitrification in cattle: current status and future perspectives. *Animals*. 2022; 12(17): 2203.

روش‌های دیگر انجماد (مانند انجماد آهسته) پیشنهاد می‌شود.

قدردانی و تشکر

بدین‌وسیله، نویسندگان مقاله از پژوهشکده فناوری دام دانشگاه شهرکرد که در اجرای این تحقیق یاری‌گر بود کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Arav A. Cryopreservation of immature bovine oocytes: challenges and solutions. *Reprod Fertil Devel*. 2014; 26(1): 87-93.
2. Arav A, Natan Y. Vitrification: from basic science to commercial application in bovine reproduction. *Anim Front*. 2023; 13(2): 45-53.
3. Catandi P, B, Dias FCF, Alves BG, Martins L, T, Nishimura TL, Alves KA. Concentration-time interplay in CPA exposure affects mitochondrial activity of GV bovine oocytes. *Reprod Fertil Devel*. 2024; 36(2): 189-201.
4. Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*. 2000; 63(2): 513-518.
5. Ferré LB, Chitwood JL, Ross PJ. Assisted reproductive technologies in cattle: current status and future perspectives. *Animals*. 2020; 10(8): 1321.
6. Ho VNA, Braam SC, Pham TD, Mol BW, Vuong LN. The effectiveness and safety of in vitro maturation of oocytes versus in vitro fertilization in women with a high antral follicle count. *Hum Reprod*. 2019; 34(5), 1-10.
7. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of



- characteristics of bovine oocytes and subsequently developing embryos. *Anim Sci J.* 2021; 92(1): e13596.
20. Zhao XM, Du WH, Wang D, Hao HS, Liu Y, Qin T, Zhu HB. Recovery of mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended in vitro culture. *Mol Reprod Develop.* 2011; 78(12): 942–950
21. Zhou XL, AlNaib A, Sun DW, Lonergan P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology.* 2010; 61(2): 173-178.
16. Sirard, MA. Commercial IVF in cattle: where we are and where we go. *Animals.* 2023; 13(6): 910.
17. Sprícigo JF, Albuquerque LG, Seneda MM. Advances in vitrification devices for bovine oocytes and embryos. *Anim Reprod.* 2022; 19(1): e20220001.
18. Xu X, Hao T, Yang E, Hao H, Du W, HangZhang H. Zhao X. Improvement of Fertilization Capacity and Developmental Ability of Vitrified Bovine Oocytes by JUNO mRNA Microinjection and Cholesterol-Loaded Methyl- β -Cyclodextrin Treatment. *Int J Mol Sci.* 2023; 24: 590-609.
19. Yodrug Th, Parnpia R, Hirao Y, Somfai T. Effect of vitrification at different meiotic stages on epigenetic





Evaluation of the Interaction between Exposure Time and Cryoprotectants Concentration on the Vitrification of Bovine Immature Oocytes with Cryotop

Kaveh Alizadeh¹; Najmeh Davoodian^{2*}; Ali Kadivar³; Ebrahim Ahmadi²;
Naser Shams Esfandabadi³

1. PhD Student in Veterinary Reproductive Technologies, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Received: 19 January 2026

Accepted: 22 May 2026

Summary

Aquaculture, as a key component of global food production, requires strategies to reduce disease-related losses and improve the health of cultured fish. Nutritional supplements such as probiotics and antioxidants have been recognized as promising tools for enhancing fish immunity. In this study, the simultaneous effect of the probiotic *Weissella confusa* and the antioxidant pigment astaxanthin on the expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) was investigated. A total of 240 fish were divided into four treatments (control, probiotic, astaxanthin, and combined; each treatment in three replicates with 20 fish per replicate) and fed for 28 days. Expression levels of IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, and TNF- α were measured in the anterior kidney and spleen using qPCR. The combined treatment showed the highest ($P < 0.05$) upregulation of IL-10, IL-12, IL-17, and TNF- α compared to other groups. IFN- γ expression increased on day 14 in the combined group but declined by day 28. Moreover, IL-6 expression was significantly higher ($P < 0.05$) in the probiotic and combined groups on day 28. The temporal expression patterns indicated dynamic regulation and synergistic effects of probiotic and astaxanthin supplementation. It appears that concurrent administration of *Weissella confusa* and astaxanthin enhances molecular immune markers in rainbow trout and may serve as an effective nutritional strategy to improve health and disease resistance in aquaculture production.

Keywords: Rainbow trout, Probiotic, Astaxanthin, Cytokine, *Weissella confusa*

* Corresponding Author: davoodian.najmeh@sku.ac.ir

