

آسیب‌های انجماد بر رشد تخمک و جنین حاصل

پگاه شایق^{۱،۲}، فاطمه رحمتی قزلجه^{۱،۲}، فرزانه بنی‌اسدی^۱، میثم جنگ‌خواه^۱، حسن رجبی مهام^{۲*}،
محمد رضا قلمبران^۳، روح‌الله فتاحی^{۱*}

مقاله مروری

مقدمه: حفظ توانایی باروری جهت جلوگیری از انقراض گونه‌های در معرض خطر و نیز کمک به درمان آن از اهمیت خاصی برخوردار است. از لحظه لقاح به بعد، فرآیندهای زندگی و رشد جنین با نظم یک ساعت زیستی اجرا می‌شود. دانش امروز به ما امکان دخالت در کار این ساعت را با متوقف کردن زمان زیستی آن و البته با رعایت مسائل اخلاق علمی می‌دهد. این مهم از طریق دانش سرمازیستی (Cryobiology) امکان‌پذیر است. در عمل این کار با ذخیره‌سازی سلول در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد (در دمای نیتروژن مایع) دمایی که تمام فرآیندهای متابولیکی متوقف می‌شوند؛ انجام می‌شود. حفظ سلول‌های زایا نیز جدید نبوده و قدمت آن به ۲۰۰ سال پیش بر می‌گردد. از آن زمان پیشرفت‌های زیادی حاصل شده و در زمانی که با خطر ناباروری روبه‌رو هستند، بافت تخمدان، فولیکول و تخمک آن‌ها با روش‌های مختلف انجمادی حفظ و نگهداری می‌شوند. این روش‌ها هر یک با میزان متفاوتی از موفقیت همراه هستند. از بین روش‌های انجمادی انجماد شیشه‌ای عملکرد بهتری داشته و بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. تخمک پستانداران ساختار سلولی پیچیده‌ای دارد. اجزاء این سلول نسبت به تغییرات حرارت و اسمز فوق‌العاده حساس است. برای نمونه می‌توان به تغییرات غشاء سلول طی بلوغ و باروری آزمایشگاهی و تفاوت قابلیت نفوذ آب و ضدیخ‌ها در آن اشاره کرد. انجماد تخمک باعث کاهش کیفیت و زنده‌مانی سلول‌ها بعد از ذوب شده و آسیب‌های مختلفی را به دنبال دارد.

نتیجه‌گیری: تحقیقات اخیر به دنبال راهی برای ارتقای روش‌های انجماد و افزایش کیفیت تخمک‌های منجمد شده می‌باشند. این مقاله مروری به اثرات مثبت و یا منفی انجماد بر تخمک و آینده آن یعنی تکوین جنین می‌پردازد.

واژه‌های کلیدی: انجماد، انجماد آهسته، انجماد شیشه‌ای، تخمک، جنین.

ارجاع: شایق پگاه، رحمتی قزلجه فاطمه، بنی‌اسدی فرزانه، جنگ‌خواه میثم، رجبی مهام حسن، قلمبران محمد رضا، فتاحی روح‌الله. آسیب‌های انجماد بر رشد تخمک و جنین حاصل. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۳؛ ۳۲ (۵): ۷۸۰۲-۷۷۸۵.

۱- گروه جنین‌شناسی، پژوهشکده تولید مثل پزشکی، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.

۲- گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

۳- گروه علوم گیاهی و فناوری زیستی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۹۴۷۹۶۲۱، پست الکترونیکی: rfathi79@royaninstitute.org، sfathi79@royaninstitute.org، صندوق پستی: ۱۴۸-۱۶۶۳۵

مقدمه

اثرات متناقض درجه حرارت پایین در طبیعت برای قرن‌ها از طریق نمونه‌هایی مانند خواب زمستانی و سرمازدگی شناخته می‌شد. بعد از دستیابی به حفظ سلول‌های زنده در دمای پایین و حتی زیر صفر و تکرار آن، درک انسان‌ها از مکانیسم سرما تغییر کرد؛ به طوری که تلاش برای حفظ تخمک از طریق انجماد که برای سالیان زیادی کنار گذاشته شده بود، مجدداً آغاز شد. انجماد تخمک در درمان ناباروری، بانک‌های ژنتیکی، علوم دامی و حفاظت از گونه‌های در حال انقراض نقش مهمی ایفا می‌کند. مضافاً انجماد تخمک این اجازه را می‌دهد تا در آینده توانایی تولیدمثل، ایجاد نسل جدید و حتی شبیه‌سازی نیز در موجودات تحقق یابد. کاربرد انجماد تخمک در ART (Assisted Reproductive Technology) که در آن تخمک‌ها در محیط آزمایشگاهی دست‌کاری می‌شوند حائز اهمیت است. برای درمان ناباروری با توجه به شرایط، انجماد نمونه‌های مختلف از جمله انجماد تخمک، تخمدان، جنین، اسپرم و بیضه مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر چند انجماد جنین قبل از لانه‌گزینی از گونه‌های مختلف مثل انسان، موش و حیوانات اهلی با موفقیت انجام شده است، اما به دلایلی چون مرگ یکی از زوجین، طلاق، هم‌چنین منع قانونی و مسائل اخلاقی و مذهبی انجماد تخمک نسبت به انجماد جنین بیشتر به کار می‌رود. استفاده از انجماد تخمک در ART علاوه بر اینکه مانع از هدررفت تخمک‌ها و جنین‌های اضافه در طول درمان می‌شود باعث جلوگیری از بازیابی دوباره تخمک از افراد می‌شود. انجماد تخمک ممکن است یک جایگزین مهم برای نگهداری باروری در خانم‌هایی باشد که نیاز به تعویق انداختن استفاده از گامت‌های خود به دلایل مختلف دارند، از جمله افراد مبتلا به اختلال تحریک بیش از حد تخمدان (OHSS) (۱)، افرادی که سابقه خانوادگی یائسگی پیش از موعد دارند، افراد مبتلا به بیماری نارسایی زودرس تخمدان، خانم‌هایی که مبتلا به بیماری‌هایی مانند سرطان هستند و باید هردو تخمدانشان جراحی شده یا رادیوتراپی لگنی و شیمی‌درمانی شوند که در نتیجه این درمان‌ها ممکن است قدرت باروری‌شان کاهش یافته

یا از دست برود (۲). برخی از خانم‌ها به دلایل مختلفی مانند نداشتن شریک مرد، پیشرفت اجتماعی، عدم علاقه و توانایی باروری در سنین پایین برای جلوگیری از کاهش کیفیت تخمک‌ها به دلیل افزایش سن تخمک‌های خود را برای استفاده در آینده منجمد و ذخیره می‌کنند. هم‌چنین در روند درمان ناباروری ممکن است در روز آسپیراسیون تخمک امکان دسترسی به اسپرم همسر وجود نداشته باشد و پزشک مجبور به انجماد تخمک شود.

روش‌های مرسوم در انجماد تخمک: به طور کلی انجماد تخمک به دو روش آهسته (Slow Freezing) و شیشه‌ای (Vitrification) انجام می‌شود. در این نوع انجماد غلظت ضدیخ‌ها کاهش یافته و سرعت انجماد سلول کند است. ابتدا دما را به ۵- یا ۷- درجه سانتی‌گراد رسانده که این کار باعث تبلور کریستال‌های یخ می‌شود در ادامه دما را به ۳۰- یا ۶۰- رسانده و سرعت کاهش دما ۰/۳ تا ۰/۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه است. پس از آن دما را با سرعت ۱۰- درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۱۵۰- درجه سانتی‌گراد رسیده و تخمک‌ها در نیتروژن مایع نگهداری می‌شوند. برای شروع ذوب، تخمک‌ها را ۴۰ ثانیه در دمای اتاق قرار داده پس از آن نی انجمادی حاوی نمونه‌ها ۶۰ ثانیه در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته است. تخمک‌ها به ترتیب به ۶ قطره منتقل می‌شوند که این قطره‌ها دارای محیط کشت بوده و غلظت ساکارز و ۱ و ۲ پروپاندیول در آن‌ها غلظت نزولی دارد. در انتها نمونه‌ها به انکوباتور منتقل شده و ۲ الی ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شوند (۳). در انجماد آهسته هنگامی که تخمک‌ها در معرض ضدیخ‌ها قرار می‌گیرند غلظت املاح خارج سلولی (اسمولالیت‌ه خارج سلولی) افزایش یافته در نتیجه پتانسیل آب داخل سلولی بیشتر از خارج سلول شده که باعث می‌شود تخمک دچار کم‌آبی شده و شکل آن تغییر کند اگر ضد یخ نفوذپذیر باشد سلول به دلیل جریان برگشتی آب به دنبال نفوذ ضد یخ به سیتوپلاسم متورم می‌شود. در ادامه طی فرایند ذوب و تخلیه ضد یخ برعکس این اتفاق برای تخمک رخ می‌دهد (۴، ۳). با توجه به این‌که در انجماد آهسته، تخمک‌ها

حجم: هرچه حجم کمتر باشد انتقال دما طی فرایند ذوب - انجماد بهتر و با سرعت بیشتری صورت می‌گیرد. برای کاهش حجم به منظور افزایش سرعت انجماد از حامل‌های مختلفی استفاده می‌شود.

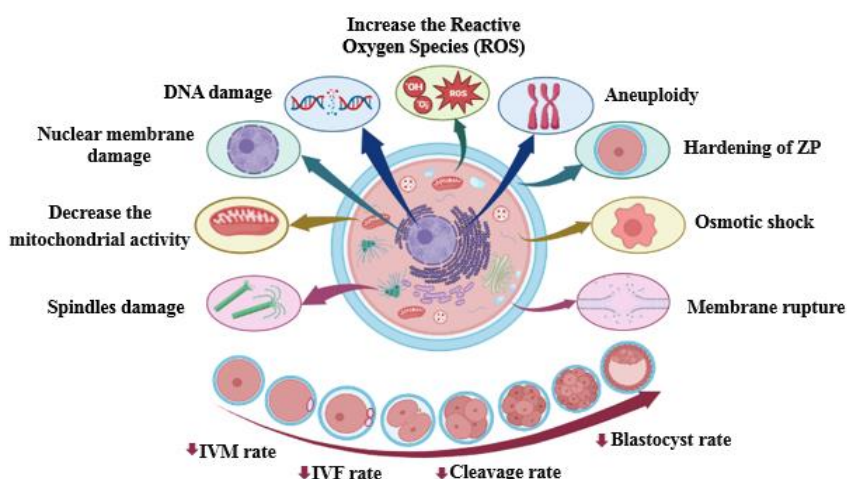
ویسکوزیته محلول انجمادی یا ضریب انتقال شیشه‌ای محلول انجمادی در دماهای پایین: با افزایش غلظت ضدیخ‌ها دما انتقال شیشه‌ای افزایش می‌یابد که باعث کاهش تشکیل و گسترش کریستال‌های یخ می‌شود. باید توجه داشت که سمیت و نفوذپذیری ضدیخ‌های مختلف متفاوت است. مزایا و معایب انجماد تخمک بالغ یا نابالغ انجماد تخمک نابالغ (GV) باعث کاهش یا عدم استفاده از هورمون‌ها و داروهای تحریک‌کننده رشد تخمک‌ها و تخمک‌گذاری، تحریکات بیش از حد تخمدان و آسیب‌های حاصل از آن در افراد سالم و بیماران سرطانی که نیاز به انجماد تخمک دارند می‌شود. هم‌چنین انجام درمان در مدت زمان کمتر صورت گرفته و تخمک‌ها را می‌توان بدون در نظر گرفتن سیکل قاعدگی دریافت کرد. پس از انجماد تخمک‌های GV مقدار مورد نیاز از آن‌ها را در هر بار درمان ذوب کرده و با استفاده از بلوغ آزمایشگاهی (IVM) می‌توان آن‌ها را بالغ کرد و مورد استفاده قرار داد؛ اما با وجود پیشرفت‌های زیادی که در انجماد تخمک‌های GV صورت گرفته میزان رشد و کلیواژ جنینی در تخمک‌های بالغ (MII) منجمد و ذوب شده نسبت به تخمک‌های GV ذوب‌شده که تحت بلوغ آزمایشگاهی به‌طور قابل‌توجهی بیشتر است (۹، ۱۰).

آسیب‌های وارده به تخمک در طول انجماد: انجماد تخمک در مراحل تکاملی مختلف نتایج متفاوتی به دنبال داشته است؛ که از دلایل آن می‌توان به اندازه سلول، میزان متابولیک متفاوت، مرحله سیکل سلول، وجود یا نبود گرانول‌های قشری و میزان لیپید داخل سلولی حساس به سرما اشاره کرد. به‌طور کلی احتمال ایجاد اختلالات کروموزومی، ناهنجاری دوکی، کاهش وعدم توانایی لقاح و رشد و لانه‌گزینی جنین حاصل از آن و سخت شدن زوناپلوسیدا در تخمک‌های منجمد شده افزایش می‌یابد.

زمان بیشتری در معرض ضدیخ‌ها قرار می‌گیرند و انجماد به‌کندی صورت می‌گیرد آسیب‌های سلولی ناشی از این اتفاق نسبت به انجماد شیشه‌ای زیاد است. در انجماد شیشه‌ای استفاده از غلظت بالای ضدیخ‌ها می‌تواند برای سلول سمیت ایجاد کند که می‌توان با کاهش زمان قرار گرفتن در معرض ضدیخ‌ها و افزایش سرعت انجماد اثرات سمیت و شوک اسمزی ناشی از ضدیخ‌ها را کاهش داد (۵). بر خلاف انجماد آهسته، در انجماد شیشه‌ای سلول‌ها با سرعت بیش از ۲۰۰۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه در نیتروژن مایع در دمای ۱۹۶- سانتی‌گراد منجمد می‌شوند. در انجماد شیشه‌ای سرعت انجماد نمونه‌ها و غلظت ضدیخ‌ها افزایش داشته ولی زمان انجماد کاهش می‌یابد تا بتوان از رشد و گسترش بلوره‌ای یخ جلوگیری کرد. با جلوگیری از رشد کریستال‌های یخ می‌توان آسیب‌های سلولی حاصل از آن را کاهش داد. مخلوطی از اتیلن‌گلیکول و دی‌متیل‌سولفواکسید ضدیخ‌هایی هستند که در انجماد شیشه‌ای تخمک مورد استقبال قرار می‌گیرند. مزایای انجماد شیشه‌ای شامل جلوگیری از شوک دمایی به مدت طولانی، استفاده از تجهیزات با قیمت کم، کنترل نفوذ املاح به داخل تخمک، کاهش هزینه‌ها، کنترل سرعت کم‌آبی تخمک، کم شدن مدت زمان نگه‌داشتن سلول خارج از انکوباتور، کاهش مدت زمان قرار گرفتن تخمک‌ها در معرض ضدیخ‌ها و کاهش رشد و تشکیل کریستال‌های یخ و آسیب‌های انجمادی ناشی از آن است (۶).

عوامل نقش‌آفرین در انجماد شیشه‌ای: عوامل مختلفی در حصول نتیجه مثبت در انجماد تخمک نقش دارند. به مهم‌ترین آن‌ها در ذیل به‌طور مختصر اشاره شده است:

میزان و سرعت کاهش دما و ذوب: در مطالعات پیشین محققان مشاهده شد افزایش سرعت کاهش دما طی انجماد باعث بهبود زنده‌مانی تخمک‌ها و جنین‌ها تا حدود ۳۷ درصد شد. در انجماد تخمک‌های موشی نیز مشخص شد سرعت گرم شدن طی ذوب نیز یک مؤلفه‌ی مهم برای بهبود انجماد است (۸، ۷).



شکل ۱: مشکلات و آسیب‌های سلولی انجماد تخمک.

کاهش میزان بلوغ درون آزمایشگاهی: انجماد، کلسیم داخل سلولی تخمک را افزایش می‌دهد که این رویداد باعث آزاد شدن وزیکول‌های قشری و سخت شدن زوناپلوسیدا می‌شود این اتفاقات به‌طور طبیعی در زمان لقاح روی می‌دهند، بنابراین ممکن است در حین انجماد قبل از لقاح سلول دچار بلوغ زودرس شود. این اتفاق کیفیت تخمک‌ها را پس از ذوب کاهش داده و توانایی لقاح آن را کم می‌کند. انجماد تخمک میزان زنده‌مانی و ظرفیت بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها را کم می‌کند (۱۱). در راستای افزایش میزان بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ و منجمد شده در پژوهشی از هم کشتی با سلول‌های گرانولوزای تازه در تخمک‌های منجمد به روش کرایولاک استفاده شد که باعث افزایش میزان بلوغ و زنده‌مانی تخمک‌های ذوب شده گشت (۱۲). آسیب به غشای هسته در زمان انجماد کریستال‌های یخ شروع به تشکیل شدن می‌کنند این کریستال‌ها در حین ذوب شدن به هم می‌پیوندند و بزرگ‌تر می‌شوند. حضور، رشد و گسترش این کریستال‌ها باعث آسیب و پارگی غشای هسته می‌شود. پارگی زیاد غشای هسته باعث ورود محتویات موجود در هسته از جمله کروموزوم‌ها به داخل سیتوپلاسم شده که در نتیجه آن سلول از حالت نرمال خود خارج می‌شود.

کاهش تعداد میتوکندری‌ها و پتانسیل غشای آن‌ها: میتوکندری در بلوغ و رشد تخمک، متابولیسم و سوخت‌وساز

پارگی غشای تخمک: با توجه به اینکه سیتوپلاسم تخمک لیپید زیادی دارد، نسبت به دماهای پایین حساس‌تر است. در زیر غشای آن میکروتوبول‌های اکتین کم است که در نتیجه آن استحکام غشایی کاهش می‌یابد. در حین انجماد سلول کریستال‌های یخ در محیط‌های داخل و خارج سلول شروع به تشکیل شدن می‌کنند و در زمان ذوب این کریستال‌ها بزرگ شده و گسترش می‌یابند که با توجه به کم بودن استحکام غشایی تخمک باعث آسیب و پارگی غشا می‌شوند.

ازهم‌گسیختگی میکروتوبول‌ها و دوک تقسیم: در انجماد استفاده از ضد یخ، قرار گرفتن در معرض دماهای پایین و تشکیل و گسترش کریستال یخ باعث آسیب و دپلمریزه شدن رشته‌های دوک و ریزرشته‌ها می‌شود. البته پس از یک ساعت ریکاوری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا حدی ترمیم می‌شوند اما ممکن است به دلیل آسیب بیش از حد به‌طور کامل ترمیم نشوند. زمانی که رشته‌های دوک به درستی تشکیل نشوند باعث ایجاد اختلالاتی در عملکرد آن‌ها و جدا کردن کروموزوم‌ها شده که در ادامه می‌تواند منجر به ناهنجاری‌های کاریوتایپی مانند آنیوپلوئیدی، پلی‌پلوئیدی شود. با توجه به حساس بودن میکروتوبول‌ها و رشته‌های دوک نسبت به انجماد و مواد ضد یخ در مرحله MII، انجماد تخمک در مرحله GV به دلیل عدم تشکیل این رشته‌ها آسیب کمتری ایجاد می‌کند.

آزاد شدن گرانول‌های قشری و سخت شدن زوناپلوسیدای تخمک می‌شود. این فرایند می‌تواند تخمک‌ها را به صورت مصنوعی فعال و بالغ کرده و از نفوذ اسپرم هنگام لقاح جلوگیری کند (۱۳). سخت شدن زوناپلوسیدا پس از انجماد ممکن است به دلیل استفاده از ضدیخ‌ها باشد (۱۴).

آنیوپلوئیدی: به اضافه یا کم شدن غیرمعمول کروموزوم‌ها آنیوپلوئیدی می‌گویند. تغییر در تعداد کروموزوم‌ها می‌تواند باعث اختلالاتی در اندام‌زایی، رشد، بقا و شکل‌گیری جنین‌ها و در برخی موارد سقط آن‌ها شود. آنیوپلوئیدی می‌تواند در مراحل مختلف شکل‌گیری و بلوغ سلول‌های جنسی اسپرم و تخمک، رشد و نمو جنین در بدن مادر و پس از تولد رخ دهد. در حین انجماد و ذوب تخمک، شکل‌گیری کریستال‌های یخ و شوک‌های فیزیکی، شیمیایی و اسمزی می‌تواند سبب آسیب به غشای هسته، میکروتوبول‌ها، رشته‌های دوک و کروموزوم‌ها شود. استفاده از مواد شیمیایی مختلف به عنوان ضدیخ در فرایند انجماد، احتمال بروز ناهنجاری‌های کروموزومی را افزایش می‌دهد. رشته‌های دوک نقش مهمی را در جدا کردن کروموزوم‌ها دارند آسیب به این رشته‌ها در حین انجماد ممکن است منجر به مشکلاتی در تشکیل و عملکرد آن‌ها و سرانجام تفکیک کروموزومی شود. هم‌چنین در آزمایشی مشاهده شد که آنیوپلوئیدی در زیگوت‌هایی که از تخمک‌های منجمد و ذوب شده ایجاد شدند سه برابر بیشتر از زیگوت‌های تخمک‌های غیر منجمد رخ داد (۱۴).

چروکیدگی تخمک و آسیب به اندامک‌های سلولی:

تخمک‌ها به دلیل کم بودن انتشار آب و نفوذپذیر بودن نسبت به برخی ضدیخ‌ها از حساسیت بالایی برخوردارند (۱۴). اکتین زیر غشایی تخمک کم‌تر بوده، بنابراین زمانی که در معرض ضد یخ قرار می‌گیرند اسمولالیته خارج سلولی زیاد شده و در ادامه تخمک مقداری از آب سیتوپلاسمی خود را از دست داده و چروک می‌شود. این اتفاق می‌تواند بر زنده‌مانی تخمک‌ها اثر منفی داشته باشد. استفاده از ضدیخ‌ها و تشکیل و گسترش کریستال‌های یخ حین انجماد و ذوب سلول می‌تواند منجر به آسیب به اندامک‌ها و اسکلت سلولی شود. در مطالعه‌ای که از

آن، لقاح و آپوپتوز نقش تأثیرگذاری دارد. در زمان بلوغ تخمک، توزیع میتوکندری در سیتوپلاسم تغییر کرده و نحوه آرایش آن‌ها پس از تقسیم میوز بسیار مهم و تأثیرگذار است. در تخمک‌های نابالغ موش میتوکندری‌ها در حین بلوغ به صورت محیطی داخل سیتوپلاسم آرایش می‌یابند. در هنگام بلوغ تخمک یکسری تبدلات بین سلولی بین سلول‌های گرانولوزا و تخمک از طریق اتصال شکاف دار اتفاق می‌افتد که نیاز به انرژی را در حاشیه سیتوپلاسم زیاد می‌کند؛ بنابراین میتوکندری‌ها آرایش محیطی می‌گیرند تا این انرژی را تأمین کنند. هم‌چنین آزاد شدن جسم قطبی و تشکیل شدن رشته‌های دوک نیاز به انرژی دارد. برای تأمین این انرژی میتوکندری‌ها به صورت قطبی در تخمک بالغ موش آرایش می‌یابند. حرکت طبیعی رشته‌های دوک و جدا شدن صحیح کروموزوم‌ها در حین بلوغ بسیار مهم می‌باشد بنابراین آرایش نادرست میتوکندری‌ها در این مرحله باعث اختلال در میوز خواهد شد. در مطالعه‌ای، مشاهده شد که میتوکندری‌ها در تخمک‌های منجمد شده به صورت یکنواخت در سیتوپلاسم پراکنده شده بودند، در حالیکه در گروه غیر منجمد آرایش قطبی داشتند. منجمد شدن تخمک باعث کاهش پتانسیل غشای میتوکندری نسبت به تخمک منجمد نشده می‌شود؛ که در نتیجه آن قدرت بازیابی تخمک پس از ذوب کاهش می‌یابد. در طی انجماد ممکن است تخمک، قطبیت میتوکندری خود را به صورت برگشت‌ناپذیری از دست داده که این اتفاق می‌تواند بعد از لقاح در سیگنال‌دهی کلسیم اختلال ایجاد کند (۱۲).

سخت شدن زوناپلوسیدا: مطالعات گذشته نشان دادند که انجماد تخمک ضخامت زوناپلوسیدا و قطر تخمک را تغییر نداده بلکه باعث سخت شدن زوناپلوسیدا می‌شود. هم‌چنین مشاهده شد که حل شدن زوناپلوسیدای تخمک‌های منجمد شده توسط کیموتریپسین شش برابر بیشتر از تخمک‌های غیر منجمد زمان می‌برد (۱۳). به‌طور طبیعی با ورود اسپرم به تخمک کلسیم سیتوپلاسمی افزایش یافته، گرانول‌های قشری به داخل PVS آزاد شده که در نتیجه آن زوناپلوسیدا سخت می‌شود. انجماد تخمک کلسیم داخل سلولی را زیاد کرده که این اتفاق باعث

پروپاندیول و ساکارز برای انجماد استفاده کردند مشاهده شد که استفاده از این ترکیب میزان گرانول‌های قشری و واکوئل‌هایی که به دلیل آسیب‌های انجمادی ایجاد می‌شوند را کم کرد. در انجماد آهسته نیز مشاهده شد که آسیب‌های ناشی از انجماد باعث ایجاد لیزوزوم‌ها، واکوئل‌های سلولی و اجسام چند وزیکولی پس از ذوب شد. انجماد در پراکندگی گرانول‌های قشری نیز اثر می‌گذارد. افزایش این واکوئل‌ها می‌تواند بر کیفیت لقاح و رشد جنین حاصل از آن در تخمک‌های انسانی اثر منفی بگذارد.

اثر انجماد بر انتقال گلوکز: انتقال گلوکز توسط انتقال‌دهنده سدیم گلوکز (SGLUT) یا GLUT (Glucose transporter) به صورت فعال انجام می‌شود. در پژوهشی مشاهده شد انجماد تخمک بالغ بیان نوعی انتقال‌دهنده گلوکز (GLUT1) را کاهش داده و سطوح ATP و Nicotinamide Dinucleotide Phosphate Adenine (NADPH) داخل سلولی را کاهش می‌دهد. متابولیسم گلوکز در بلوغ تخمک، بقا و رشد جنین قبل از لانه‌گزینی، پیر شدن تخمک و مرگ برنامه‌ریزی شده در مرحله جنینی تأثیرگذار است (۱۰).

تغییر پروفایل بیان ژن در تخمک: زمانی که تخمک در فرایند انجماد و ذوب تحت تأثیر عوامل استرس‌زایی مانند کاهش و افزایش سریع دما قرار می‌گیرد پروفایل بیان ژنی خود را تغییر داده و بیان برخی از پروتئین‌ها مانند پروتئین‌های شوک حرارتی را افزایش و بیان برخی دیگر را کاهش می‌دهد. در انجماد آهسته ژن‌هایی که باعث حفظ ساختار کروموزومی می‌شوند مانند KIF2C و KIF3A و ژن‌های دخیل در چرخه‌ی سلولی مانند CHEK2 و BCDKN1B تنظیم پایین شده که می‌تواند اثر منفی بر توانایی رشد تخمک بگذارد. همچنین کاهش بیان بسیاری از ژن‌های مسیر یوبیکوئیناسیون مانند زیرواحدهای پروتئازوم 26S و خانواده پپتیداز خاص یوبی کوئیتین در تخمک‌های منجمد شده مشاهده شد. با مهار شدن دستگاه تخریب حفاظت از پروتئین‌های تخمک که برای رشد ضروری اند رخ می‌دهد. در پژوهش‌هایی که بر روی انجماد تخمک‌های MII پستانداران مختلف صورت گرفته، مشاهده شده

است که انجماد بر بیان ژن‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو مانند سوپراکسید دیسموتاز و برخی پروتئین‌های شوک حرارتی، خانواده هیستون‌ها، ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی (سایکلین B)، خانواده پلیمرازها، ژن‌های مربوط به آپوپتوز (خانواده BCL2) تأثیر می‌گذارد. بررسی پروتئین‌های تخمک‌های بالغ موش نشان داد که به دلیل تفاوت بیان ژن‌ها در دو روش انجماد آهسته و شیشه‌ای میزان باروری و کیفیت تخمک‌ها در انجماد آهسته در مقایسه با انجماد شیشه‌ای کم است (۱۰).

تأثیر انجماد بر لیپیدهای سلولی: غشای سلولی از دولایه فسفولیپیدی تشکیل شده و حضور آن‌ها در غشاهای سلولی باعث ایجاد حالت ارتجاعی و انعطاف‌پذیر غشا می‌شود که از پارگی آن جلوگیری می‌کند. همچنین قطرات لیپید سیتوپلاسمی (LDs) برای ذخیره انرژی سلولی دارای لیپید است که با یک‌لایه فسفولیپیدی پوشیده شده است. LD بیشتر حاوی استرهای استرولی همچون کلسترول و تری‌گلیسرول‌ها است. LDها در متابولیسم پروتئین، تنظیم انرژی، محافظت از سلول و فعالیت‌های مربوط به هسته تأثیر گذارند و غلظت آن‌ها با زنده‌مانی تخمک پس از ذوب ارتباط دارد. یکی از مشکلات انجماد، انتقال فاز لیپیدها در دماهای پایین‌تر از دماهای فیزیولوژیکی و بالاتر از نقطه انجماد است. این دما در تخمک گونه‌های مختلف متفاوت است. این پدیده می‌تواند در غشای سیتوپلاسمی و اندامک‌ها رخ دهد و منجر به تبدیل شدن فاز مایع و ارتجاعی غشا به فاز جامد و سفت، توزیع مجدد لیپیدها در غشاهای سلولی، کاهش سرعت انتشار مواد آب‌گریز، آسیب‌های غشایی و کاهش نفوذپذیری غشای سلولی شود. به دنبال انتقال فاز، ممکن است توزیع لیپیدها در LDs تغییر کرده و اختلالاتی در اندامک‌هایی مانند شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری که از نظر عملکردی با آن‌ها در ارتباط هستند، رخ دهد. برای کاهش تأثیرات منفی لیپیدها در انجماد جنین و تخمک رویکردهایی همچون لیپولیز، حذف قطرات لیپیدی سیتوپلاسمی به صورت جزئی، تغییر و بهبود پروفایل لیپیدی به صورت شیمیایی، پلایزاسیون قطرات چربی در سلول با انجام سانتریفیوژ به کار گرفته شد. در پژوهشی در انجماد تخمک‌های

یون کلسیم باشد. احتمال می‌رود انجماد باعث آزاد شدن گرانول‌های قشری پیش از لقاح واقعی و سخت شدن زوناپلوسیدا شود. این اتفاق منجر به بلوغ زودرس و کاهش کیفیت تخمک‌ها می‌شود. DMSO (Dimethyl Sulfoxide) باعث آزاد شدن کلسیم شبکه آندوپلاسمی و اتیلن گلیکول باعث ورود کلسیم از محیط خارج سلولی به سیتوپلاسم می‌شود. این افزایش کلسیم داخل سلولی می‌تواند مشابه زمان لقاح عمل کرده و باعث سخت شدن زوناپلوسیدا شود. در پژوهشی مشاهده شد جلوگیری از افزایش کلسیم سیتوپلاسمی و اثرات منفی حاصل از آن به کمک چیلاتورهای (حذف‌کننده‌ها) یون کلسیم در محیط انجمادی، میزان لقاح و زنده‌مانی تخمک‌ها را افزایش داد (۱۸). در تخمک‌های منجمد شده افزایش Ca^{2+} از دو راه صورت می‌گیرد: انتشار یون کلسیم از شبکه سیتوپلاسمی (۱۹) و ورود کلسیم از محیط خارج سلولی به داخل سلول (۲۰) در مطالعه‌ای روی انجماد تخمک‌های موش در مرحله MII، مشاهده شد که انجماد تخمک از طریق افزایش بیان یکی از پروتئین‌های زیرواحد تنظیمی یونی پورتر کلسیم میتوکندری (MCU) به نام MICU۱ که در غشای داخلی میتوکندری قرار دارد، جذب کلسیم میتوکندری را افزایش می‌دهد. MICU۱ غلظت کلسیم داخل میتوکندری و سیتوپلاسم را حس کرده و آن را به طور دو طرفه کنترل می‌کند. این بدین معناست زمانی که کلسیم سیتوپلاسمی تا حد آستانه‌ای افزایش یابد، این پروتئین جذب کلسیم میتوکندری را تا حد آستانه‌ای افزایش می‌دهد و زمانی که سطح کلسیم سیتوپلاسمی پایین باشد، مانع از جذب کلسیم میتوکندری می‌شود. انجماد تخمک میزان ATP داخل سلولی را کاهش می‌دهد. افزایش کلسیم میتوکندری پس از انجماد منجر به فعال شدن آنزیم پیرووات دهیدروژناز می‌شود. فعال شدن این آنزیم اکسیداسیون پیرووات‌ها را افزایش داده تا از این طریق انرژی از دست رفته طی فرایند انجماد جبران شود و شایستگی تخمک برای رشد افزایش یابد (۲۱).

بالغ گاو همراه با سلول‌های کومولوس، اسید لینوئیک به محیط کشت بعد از ذوب اضافه شد که ترکیب لیپیدی تخمک را تغییر داد و باعث ارتقای نتایج انجماد شد. در مطالعه‌ای دیگر از cyclodextrin (CLC) cholesterol-loaded methyl-b-بارگذاری شده با کلسترول استفاده شد، مشاهده شد با بالا رفتن غلظت کلسترول در غشا، آسیب‌پذیری آن در دماهای پایین کاهش و میزان تقسیمات جنینی افزایش می‌یابد (۱۶، ۱۵).

افزایش کلسیم داخل سلولی: در مطالعات متعددی مشاهده شد که با انجماد تخمک، زوناپلوسیدا سخت شده و در نتیجه نفوذ اسپرم به تخمک و میزان لقاح و رشد جنین‌های حاصل از آن کاهش می‌یابد (۱۷). سخت شدن زونا پلوسیدای تخمک به دنبال انجماد در تخمک‌های موش، انسان، گوسفند و گاو (۱۷) مشاهده شده است. در مطالعه‌ای مشاهده شد با افزایش کلسیم داخل سلولی، گرانول‌های قشری آزاد شده و به دنبال آن زوناپلوسیدا سخت می‌شود (۱۸). در پژوهشی که حضور کلسیم را در محلول انجمادی تخمک‌های بالغ و نابالغ بررسی کرد مشاهده شد، حضور کلسیم سبب سخت شدن شد، اما ضخامت و قطر زوناپلوسیدا تغییر نکرد. هم‌چنین حضور کلسیم در محلول انجمادی پتانسیل رشد را در تخمک‌های منجمد شده به‌ویژه در گروهی که حاوی کلسیم بود را کاهش داد (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که حل کردن تخمک‌های منجمد شده در حضور کلسیم، شش برابر تخمک‌های غیر منجمد زمان برد و با حذف کلسیم از محلول انجماد سخت شدن به‌طور معناداری کاهش یافت (۱۲). به طور نرمال هنگام لقاح با اتصال اسپرم به تخمک، کلسیم داخل سلولی افزایش می‌یابد، گرانول‌های قشری محتویات خود را در فضای پری ویتلین آزاد کرده و زوناپلوسیدا سخت می‌شود تا از پلی‌اسپرمی جلوگیری کند. محققان احتمال می‌دهند Ca^{2+} در بلوغ تخمک‌های گاو، همستر و خوک تأثیرگذار باشد. در قشر تخمک‌های بالغ وزیکول‌های غشایی سه برابر تخمک‌های نابالغ بوده که احتمال دارد به دلیل تغییرات



شکل ۲: اثر انجماد بر کلسیم داخل سلولی تخمک و آسیب ناشی از آن.

شده که در نتیجه آن میتوکندری نمی‌تواند ROS کافی را برای تشکیل رشته‌های دوک ارائه کند که منجر به خطایی در تشکیل رشته‌های دوک می‌شود. انجماد تخمک می‌تواند باعث بهم خوردن تعادل اکسایش و کاهش سلول شده، تولیدات ROS را افزایش داده و منجر به کاهش پتانسیل رشد تخمک‌ها پس از ذوب شود (۲۲). با توجه به اینکه از تولیدکننده‌های اصلی ROS زنجیره تنفسی است، افزایش ROS می‌تواند موجب اختلال در این زنجیره شود (۲۳، ۲۴). در مطالعه‌ای که روی انجماد شیشه‌ای تخمک‌های بالغ صورت گرفت مشاهده شد که انجماد با افزایش تولید ROS باعث کاهش تعداد کپی‌های mt_DNA و فعالیت سیتوکروم اکسیداز میتوکندری شد و در ادامه، روی رشد جنین‌ها اثر گذاشت (۲۵).

آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده): علائم آپوپتوز عبارت‌اند از قطعه‌قطعه شدن کروماتین‌ها، افزایش تعداد وزیکول‌ها به میزان زیاد، انقباض و کاهش حجم تخمک. از آنزیم‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز می‌توان کاسپازها را نام برد. دو مسیر درونی و بیرونی برای آپوپتوز وجود دارد که کاسپازها در آن‌ها مؤثرند و هر دو مسیر در مرحله‌ای به کاسپاز ۳ می‌رسند و در انتها باعث غیرفعال شدن مسیر بقای سلولی مانند PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) شده و مسیر مرگ سلولی مانند CAD را فعال می‌کنند (۲۶). در مطالعه‌ای برای بررسی آپوپتوز سلولی در تخمک‌های بالغ خوک منجمد شده از دو مهارکننده مسیر بیرونی و درونی آپوپتوز استفاده شد. هم در گروهی که مسیر بیرونی آپوپتوز با Z-IETD-FMK به عنوان مهارکننده کاسپاز ۸ مسدود شد و هم در گروهی که مسیر درونی آپوپتوز با Z-LEHD-FMK

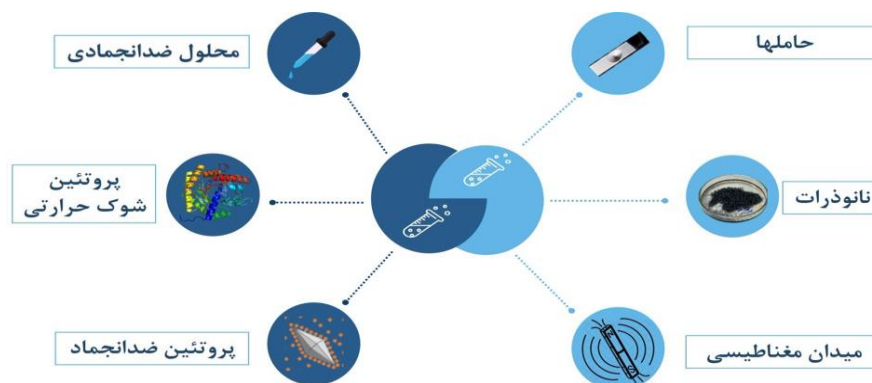
افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS): گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) به مولکول‌های آزاد که یک الکترون جفت نشده دارند و دارای انرژی زیاد، بسیار واکنش‌پذیر و فعال‌اند گویند. این مولکول‌ها در اثر شکستن یک پیوند پایدار به وجود می‌آیند. ROS چون دارای الکترون آزاد است انرژی زیادی داشته و زمانی که میزان آن از حد معمولی افزایش یابد می‌تواند به سلول آسیب بزند. این مولکول‌ها می‌توانند با بیومولکول‌های دیگر واکنش داده، باعث ایجاد واکنش‌های زنجیره‌ای شده و مولکول‌های ناپایدار بیشتری را تولید کنند. این واکنش زنجیره‌ای تا زمانی که رادیکال آزاد با آنتی‌اکسیدان‌ها واکنش دهد یا دو رادیکال آزاد با هم واکنش دهند و الکترون جفت نشده همدیگر را حذف کنند ادامه می‌یابد. فرایندهای طبیعی سلولی باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند و سلول برای خنثی کردن رادیکال‌های آزاد تولید شده آنتی‌اکسیدان تولید می‌کند. عدم تعادل میان ROS تولید شده و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند باعث ایجاد استرس اکسیداتیو شود. عملکرد سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی تخمک نسبتاً قوی نبوده و در برابر افزایش تولید ROS آسیب‌پذیر است. رادیکال‌های آزاد می‌توانند به DNA، لیپیدهای غشایی، آمینواسیدها به‌خصوص سیستئین و متیونین، آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و قندها آسیب بزنند و اختلالات سلولی ایجاد کنند. پراکسید هیدروژن، آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل، رادیکال نیتریک اکسید، رادیکال پراکسیل مثال‌هایی از گونه‌های فعال اکسیژن است. سطوح بالای ROS با پیری تخمک و القای رویدادهای مرتبط با آپوپتوز مانند گسست DNA مرتبط است. HQ باعث اختلال در عملکرد میتوکندری

منجمد شده‌ی خوک در مرحله GV در رشد جنین بررسی شد، مشاهده شد روش PICSI بیشترین کارایی را نسبت به روش‌های IVF و ICSI در افزایش نرخ بلاستوسیست داشت (۳۲).

کاهش اثرات مضر محلول‌های ضد انجماد: برای کاهش اثرات مضر ضدیخ‌ها می‌توان سیاست‌هایی به‌کار گرفت. می‌توان مدت زمان قرار گرفتن نمونه‌ها در معرض ضدیخ‌ها را کاهش داد (۲۹)، از ضدیخ‌هایی با سمیت کم یا مخلوطی از ضدیخ‌ها استفاده کرد. همچنین می‌توان غلظت ضدیخ‌ها را کاهش داده یا از ضدیخ‌های غیر نافذ استفاده کرد تا از اثرات مضر ضدیخ‌ها جلوگیری کرد. به دلیل اینکه ضدیخ‌های غیر نافذ وارد سلول نمی‌شوند باعث انقباض تخمک و کم‌آبی سلول می‌شوند. آب داخل سلولی باعث تشکیل کریستال‌های یخ می‌شود و کم شدن آن کریستال‌های یخ ناشی از آن را کم و در نتیجه آسیب‌های سلولی می‌شوند. ضدیخ‌های غیر نافذ وارد سلول نمی‌شوند در نتیجه ممکن است سمیتی که ممکن است در آن‌ها برای سلول ایجاد شود کاهش یابد. ضدیخ‌های نافذ که از جنس کربوهیدرات می‌باشند اثر مثبتی برای تثبیت غشای سلولی دارند. البته امروزه برای انجمادهای بسیار سریع سلولی از محلول‌های غلیظ ضدیخ‌های نافذ استفاده می‌شود و محلول انجمادی حاوی دی‌متیل‌سولفوکساید و اتیلن‌گلیکول که هر دو ضد یخ نافذ هستند برای انجماد تخمک مورد استقبال قرار گرفتند (۳۳).

به‌عنوان مهارکننده کاسپاز ۹ مسدود شد، میزان زنده‌مانی و میزان بلاستوسیست‌های حاصل از فعال‌سازی پارتنوژنیک نسبت به تخمک‌های منجمد شده افزایش یافت (۲۷). این نتایج نشان می‌دهد که هر دو مسیر بیرونی و درونی در آپوتوز تخمک‌های منجمد شده نقش دارند. از روش‌های کاهش آپوتوز در تخمک می‌توان به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها اشاره کرد، آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش سطوح ROS داخل سلولی و استرس اکسیداتیو از آپوتوز جلوگیری می‌کنند (۲۸، ۲۹).

اثر انجماد تخمک بر رشد جنین: پس از انجماد تخمک در مرحله GV، میزان بلوغ آزمایشگاهی، میزان لقاح و نرخ بلاستوسیست به دلیل آسیب‌های انجمادی مانند سمیت حاصل از ضدیخ‌ها و تشکیل کریستال‌های یخ کاهش می‌یابد (۳۰). برای تثبیت اسپرم در ICSI از پلی‌وینیل‌پیرولیدون استفاده می‌شود ولی این ماده اگر وارد تخمک شود می‌تواند ایجاد سمیت کرده و احتمال دارد بر لقاح تأثیر بگذارد (۳۱). برای این منظور پژوهش‌گران از اسید هیالورونیک به‌جای پلی‌وینیل‌پیرولیدون استفاده کردند که باعث ارتقاء روش ICSI شد، به این روش تزریق فیزیولوژیکی اسپرم داخل سیتوپلاسمی یا PICSI گفته می‌شود (۳۲). زمانی که اسپرم به اسید هیالورونیک متصل می‌شود، باعث تحریک واکنش آکروزومی و بهبود لقاح می‌شود. در پژوهشی که کارایی روش‌های IVF، ICSI و PICSI برای لقاح تخمک‌های



شکل ۳: مواد و ابزارهای مؤثر در بهبود کیفیت انجماد تخمک.

تأثیرگذار بوده و از اولین پروتئین‌هایی می‌باشند که جنین در حین رشد خود تولید می‌کند. یکی از موارد بیان ژن و تولید پروتئین‌های شوک حرارتی هنگام آسیب‌ها و تنش‌های سلولی

پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP): سلول‌ها با قرار گرفتن سلول‌ها در شرایط استرس‌زا نوعی پروتئین به نام پروتئین‌های شوک حرارتی تولید می‌کنند. این پروتئین‌ها در تولیدمثل

و ناشی از شوک مربوط تغییرات حرارتی، آلودگی میکروبی، ROS، اتانول و فلزات سنگین است. باید توجه داشت که بیان این پروتئین‌ها صرفاً زمانی که شوک حرارتی اتفاق می‌افتد صورت نمی‌گیرد بلکه ممکن است سلول دچار شوک حرارتی شده ولی پروتئین حرارتی تولید نشود یا در مواردی تولید بیش از اندازه پروتئین شوک حرارتی باعث افزایش مقاومت سلول در هنگام شوک حرارتی نشده است (۳۴). یکی از موارد بیان ژن و تولید پروتئین‌های شوک حرارتی هنگام آسیب‌ها و تنش‌های سلولی ناشی از شوک حرارتی مربوط به تغییرات حرارتی، آلودگی میکروبی، ROS، اتانول و فلزات سنگین است. بیان مقدار کمی از پروتئین‌های شوک حرارتی در هنگام تنش دمایی صورت گرفته، برخی دیگر هنگام استرس سلولی و وارد شدن شوک به سلول‌ها و برخی دیگر در شرایط طبیعی و دماهای معمولی صورت می‌گیرد. تمام ارگانسیم‌های زنده مانند پستانداران و انسان‌ها و حتی باکتری‌های پروکاریوتی با افزایش دمای سلولی تولید اکثر پروتئین‌های خود را متوقف کرده و برخی پروتئین‌ها مانند پروتئین‌های شوک حرارتی را تولید می‌کنند. پاسخ پروتئین‌های شوک حرارتی در طی مسیر تکاملی موجودات دستخوش تغییرات زیادی نشده و در موجودات و گونه‌های مختلف و متفاوت ساختار شبیه هم و حفاظت شده دارد. این شباهت در موجودات متفاوت ممکن است باعث ایجاد بیماری‌های خودایمنی شود برای مثال ممکن است نوعی پروتئین شوک حرارتی مربوط به یک باکتری در بدن میزبان نقش آنتی‌ژن را ایفا کرده و باعث بیماری خودایمنی شود. نام‌گذاری پروتئین‌های شوک حرارتی بر مبنای عملکرد آن‌ها نبوده، بلکه مربوط به وزن مولکولی آن‌ها است. مثلاً خانواده hsp70 مربوط به پروتئین‌های ۷۰ کیلو دالتونی است. hsp-ها دو عملکرد اصلی دارند، برخی از آن‌ها به‌عنوان محصولات پروتئینی القایی بوده و hsp نام دارند. برخی دیگر چپرون‌های مولکولی بوده که HSC نام دارند و در تا زدن پروتئین‌ها به عنوان وسط عمل می‌کنند. همچنین آن‌ها در تخریب و از بین بردن پروتئین‌ها، جابه‌جایی پروتئین‌ها، جلوگیری از تاخوردگی و پیوندهای نا به هنگام، اشتباه و

غیرطبیعی پروتئین‌ها، همچنین حفظ پروتئین‌ها به صورت غیرفعال دارند (۳۵). hsp90، hsp70 در تخمک پستانداران ساخته می‌شوند و به تنهایی باعث ایجاد مقاومت در برابر شوک حرارتی و تغییرات دمایی نمی‌شوند (۳۴). هنگام رشد تخمک پاسخ پروتئین‌های شوک حرارتی تا زمانی که تخمک به اندازه مناسب برسد افزایش می‌یابد و پس از آن کاهش یافته و در انتها زمانی که تخمک کامل تمایز می‌یابد و به مرحله فولیکول انتهایی می‌رسد متوقف می‌شود. در هنگام رشد میزان زیادی از پروتئین‌های hsp70 و hsp90 بیان می‌شوند (۳۴). در مطالعه دیگر نیز اثر مثبت پروتئین hsp27 در بهبود بلوغ آزمایشگاهی مشاهده شد. پروتئین HSPA1A در هنگام تنش، استرس خارجی و شوک حرارتی سبب حفاظت و تنظیم فعالیت سلول می‌شود (۳۶). در بررسی بیان پروتئین HSPA1A می‌توان به مطالعه Khodabandeh و همکاران در سال ۲۰۱۰ اشاره کرد. این گروه به بررسی اثر انجماد بر بیان این پروتئین در تخمک‌های بالغ موش پرداختند. بر اساس این مطالعه بیان پروتئین HSPA1A در گروهی که حاوی ضدیخ‌های پروپاندیسیول و اتیلن‌گلیکول بود کاهش یافته و متوقف شد. این پروتئین در گروهی که از ترکیب رایج ضدیخ DMSO و EG در انجماد استفاده شده بود؛ بیان داشت. با این حال از میزان بیان این پروتئین در گروه انجمادی نسبت به تخمک‌های منجمد نشده کاسته شده بود. این ممکن است نشانه‌ای از کاهش زنده ماندن تخمک‌ها پس از انجماد با اتیلن‌گلیکول و پروپاندیسیول به دلیل سمیت بالای آن‌ها باشد (۳۶).

استفاده از مواد و ابزار نوین در کاهش آسیب‌های ناشی از انجماد: با گذشت بیش از چهار دهه از آغاز انجماد تخمک تحقیقات برای بهبود و اصلاح پروتکل انجماد همچنان ادامه دارد (شکل ۱). برای مقابله با مشکلات انجماد تخمک و پیدا کردن راه‌حل مناسب، درک صحیح از پاسخ ارگانسیم‌های زنده به سرما لازم است. موجودات زنده در پاسخ به سرما این گونه رفتار می‌کنند که نخست سرما را دریافت می‌کنند که این عمل توسط غشاء سلول که همچون یک حسگر دمای پایین است؛ صورت می‌گیرد؛ چراکه غشاء مستحکم است و این استحکام

از آنجا که کلسیم مهم‌ترین بخش سیستم ارتباطی غشاء است، حدس درباره اثر میدان ساده‌تر می‌شود (جابه‌جایی یون‌های کلسیم) (۳۹). در واقع میدان ایستا شکل سلول، غشاء پلاسمایی را تغییر می‌دهد و در نتیجه‌ی آن غلظت یون‌های کلسیم در داخل سلول افزایش می‌یابد. این امر به دلیل نقش آنتی آپوپتوز کلسیم است. به‌کارگیری میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی در مبحث سرمازیستی به سال‌های اخیر بازمی‌گردد. در سال ۲۰۱۲ Moriguchi و همکارانش از میدان مغناطیسی در انجماد آهسته بافت کورتکس انسانی بهره بردند. در این بررسی از میدان مغناطیسی متغیر با زمان $0/3$ میلی‌تسلا با فرکانس ۲ کیلوهرتز و محلول ضدانجماد DMSO و سوکروز استفاده کردند. بعد از انجماد نمونه‌ها به مدت ۱ روز فراساختار تخمک در طول بافت تخمدان و شاخص‌های بیان ژن‌ها بررسی شدند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که شکل تخمک بعد از انجماد حفظ شده است؛ این در حالی است که بیان بعضی از ژن‌ها افزایش پیدا کرده است (۴۰). بعد از آن در سال ۲۰۱۴ Lean و همکارانش از میدان مغناطیسی ثابت برای انجماد سلول‌های بنیادی پالپ دندان کمک گرفتند. میدان مغناطیسی در این بررسی مقادیر متفاوت $0/1$ ، $0/4$ و $0/8$ تسلا بود که توسط یک آهنربای دائمی NdFeB تولید می‌شد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نمونه‌ی منجمد شده بدون DMSO در حضور میدان مغناطیسی $0/8$ تسلا در میان سایر گروه‌ها از نرخ بقای بالاتری برخوردار است؛ به‌عبارت‌دیگر میدان از آسیب‌های انجماد کاسته است (۴۱، ۴۲). در سال ۲۰۱۶ Jasemi و همکارانش اثر میدان مغناطیسی ثابت یک میلی‌تسلا را بر روی انجماد و پیوند بافت تخمدان موش NMRI به بیضه بررسی کردند. در این بررسی چهار گروه متفاوت ۱. پیوند بافت تخمدان تازه (FOT) به بیضه ۲. پیوند بافت تخمدان تازه تحت تأثیر میدان به مدت ۱۰ دقیقه به بیضه (FOT+) ۳. پیوند بافت تخمدان منجمد - ذوب شده (VOT) ۴. پیوند بافت تخمدان منجمد - ذوب شده که بعد از پیوند محل پیوند تحت تأثیر میدان مغناطیسی با همان شدت و مدت‌زمان قرار گرفته است (VOT+)، است. نتایج این بررسی نشان داد که

باعث بازآرایی اسکلت سلولی و تغییرات در هجوم یون‌ها به سلول می‌شود. با دریافت سرما توسط غشاء، سیگنال مناسب برای فعال یا خاموش شدن ژن مناسب جهت ایجاد تغییر در فرآیندهای بیوشیمی فرستاده می‌شود. با ایجاد این تغییرات سلول سعی بر حفظ قابلیت زیستی در دمای پایین دارد. در حالت کلی بیش از ۵۰ نوع ژن هستند که وظیفه حفظ سلول در برابر دمای پایین را دارند. دسته اول ژن‌هایی هستند که پروتئین‌های ساختاری را برای محافظت سلول در برابر سرما رمزگذاری می‌کنند (مانند دفاع آنتی‌اکسیدانی در برابر کمبود اکسیژن). دسته دوم ژن‌های تنظیمی هستند که مکانیسم کلی در برابر سرما را رمزگذاری می‌کنند. مطالعات انتقال سیگنال در گیاهان نشان می‌دهد که کلسیم داخل سلولی نقش مهمی در حفظ سلول در برابر سرما ایفا می‌کند. به‌طوری که کاهش دما با خود افزایش ویسکوزیته در غشاء و در نهایت باز شدن کانال‌های یونی - مکانیکی و افزایش غلظت درون‌سلولی را به همراه دارد (۳۷).

میدان‌های الکترومغناطیسی: با توجه به مطالعات می‌توان به دنبال عاملی بود که به کمک آن کلسیم داخل سلول را تا حد مطلوب افزایش داد. گزینه‌ی مناسب استفاده از میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی است. بدن دارای امواج الکترومغناطیسی با فرکانس پایین و ضعیف است؛ زیرا میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس‌های بالا و قوی سبب گرم شدن بافت و آسیب به آن‌ها می‌شود. به میدان‌ها در محدوده فرکانسی ۱-۳۰۰ هرتز میدان‌های با فرکانس ضعیف می‌گویند (۳۸). میدان‌های الکترومغناطیسی با اثر روی ذرات سازنده مولکول‌های زیستی، خواص دیامغناطیسی و پارامغناطیسی مولکول‌های غیرهمسان‌گرد، اثر زیمنان و جریان‌هایی که در ارگانیسم‌ها به‌واسطه میدان الکتریکی به وجود می‌آید؛ نقش‌آفرینی می‌کنند. وقتی سلول‌ها در معرض این میدان‌ها قرار می‌گیرند، در درجه اول غشاء سلول است که به آن‌ها پاسخ می‌دهد. غشاء یک ساختار غیرهمگن است که از بخش‌های متفاوتی تشکیل شده است که رفتار مختلفی نسبت به میدان دارد. لذا پیش‌بینی این رفتارها بسیار مشکل است. با این وجود،

مطالعه‌ای اثر حمایتی HESCM ESCCM موش بر IVM موش پشتیبانی مشاهده شد (۱۷). مطالعات جدید نشان داده‌اند که محیط شرطی شده با سلول کومولوس (CCCM) می‌تواند به‌طور معنی‌داری بر میزان IVM و IVF تأثیر بگذارد (۴۶، ۱۸). اثر CCCM و محیط شرطی شده سلولی گرانولوزا (GCCM) بر رشد و رشد فولیکول‌های اولیه موش‌ها در یک مطالعه جدید مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد که CCCM و GCCM با ترشح GFهای حمایت‌کننده در داخل محیط، نقش اساسی در بلوغ تخمک دارند (۱۴، ۱۳، ۱۱). نتایج مطالعه‌ای نشان داد که hCCCM از کشت سلول‌های کومولوس چسبده می‌تواند از IVM تخمک‌های GV موش پشتیبانی کند (۱۹). داده‌ها نشان داد که hTCCM، که حاوی فاکتورهای رشد فرضی است، می‌تواند به‌طور موثر IVM تخمک‌های GV موش را بهبود بخشد (۲۹). محیطی که دارای سلول گرانولوزا (GCCM) حاوی سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد مختلفی مانند فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد شبه انسولین (IGF) و فاکتور رشد تبدیل‌کننده بتا (TGFβ) (۴۷، ۱۷) است که از طریق تحریک میوز تخمک، از سرگیری میوز تخمک را تحریک می‌کند. مکمل (Granulosa Cell) GCCM (Conditioned Medium) در IVM باعث بهبود میوز در هر دو تخمک GV تازه و گرم شده با منجمد شده و بلوغ تخمک، لقاح و نرخ تشکیل جنین ۲ سلولی در تخمک‌های GV حاصل از انجماد را افزایش می‌دهد. به‌طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که GCCM نتایج انجماد را در تخمک‌های GV موش بهبود می‌بخشد (۳۹).

استفاده از نانوذرات در انجماد: هنگامی که از میکرو ذرات به سمت نانوذرات می‌رویم، تعداد زیادی از خصوصیات آن‌ها تغییر می‌کند. برای اینکه ذرات در محدوده نانوذرات قرار بگیرند می‌بایست دارای ابعادی کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر باشند؛ کوچک شدن ابعاد ذرات تا این اندازه باعث تغییر در خصوصیات الکترونیکی، فیزیکی، شیمیایی، مغناطیسی، اپتیکی و واکنش‌پذیری این مواد می‌گردد. سبب این تغییرات، افزایش نسبت سطح به حجم و اندازه حرکت ذرات است که قوانین

پایین درصد فولیکول‌های اولیه با مورفولوژی مرده و بالاترین درصد فولیکول اولیه با مورفولوژی دست‌نخورده متعلق به گروه FOT+ است. اگرچه کمترین میزان بلوغ، رشد و نمو جنینی و باروری در گروه VOT نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد؛ با این وجود تفاوت معنی‌داری در میزان باروری میان گروه‌های VOT و VOT+ وجود نداشت (۴۳). در مطالعه‌ای دیگر از میدان مغناطیسی ثابت ۶۰ mT برای انجماد تخمک کومولوس‌دار (COC) استفاده شد. استفاده از میدان مغناطیسی با شدت متوسط سبب کاهش آسیب‌های فراساختاری ناشی از انجماد، بهبود پتانسیل غشای میتوکندریایی و کلیواژ جنینی تا مرحله بلاستوسیست شد (۴۴). احتمال می‌رود استفاده از میدان مغناطیسی با شدت مناسب باعث جهت‌گیری مجدد فسفولیپیدهای غشایی و افزایش استحکام سلولی و کاهش آسیب‌های انجمادی شود (۴۴).

استفاده از محیط کشت آماده (conditioned medium): از آنجایی که نقص تخمک‌زایی علت ناباروری در برخی از زوج‌های نابارور است، IVM تخمک‌های وزیکول ژرمینال (GV) یک روش مهم در درمان ناباروری است (۳، ۲). یکی از مشکلات رشد و بلوغ تخمک‌های نابالغ، تهیه محیط کارآمدی است که شرایط *in vitro* را مشابه شرایط *in vivo* می‌کند (۳، ۴). یکی از استراتژی‌هایی که برای بلوغ تخمک تازه و منجمد به‌کار گرفته شده است، استفاده از محیط آماده حاوی منابع مختلف سلول‌های در حال رشد برای بهبود IVM است (۸، ۷). محیط آماده حاوی فاکتورهای رشد و هورمون‌هایی است که توسط سلول‌های در حال رشد ترشح می‌شوند که می‌توان از آن‌ها برای تحریک رشد سلول‌های دیگر استفاده کرد (۶). سلول‌های بنیادی جنینی (ESCs) سلول‌های پرتوانی هستند که از توده سلولی داخلی (ICM) جنین‌های قبل از لانه‌گزینی در مرحله بلاستوسیست به دست می‌آیند (۴۵، ۱۱). ESC ها می‌توانند محصولات بیولوژیکی و پروتئین‌های فعال ترشح کنند که متعاقباً یک کشت متوسط با عوامل میتوزنیک، فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و کموکاین‌ها فراهم می‌کنند (۱۷، ۱۲)، که ممکن است برای بهبود نتایج IVM مفید باشد. در

دیگر کمتر است. علاوه بر نرخ زنده‌مانی، نرخ بلوغ تخمک از مرحله GV تا رسیدن به MII بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که انجماد تخمک با نانوذرات میزان زنده‌مانی و رشدشان را بهبود می‌بخشد. در سال ۲۰۱۸ Abbasi و همکارانش از نانوذرات Fe_3O_4 با قطر متوسط ۵ نانومتر در انجماد شیشه‌ای تخمک‌های نابالغ (GV) بهره بردند. در این مطالعه، میزان IVM و همچنین لقاح آزمایشگاهی (Invitro Fertilization) تخمک‌های بالغ (۲PN) بررسی شد. نتایج حاکی بود که نرخ IVM و IVF در گروه‌های انجمادی با نانوذرات نسبت به گروه کنترل به طور معنادار ($P < 0.05$) افزایش یافته است. علاوه بر این در ارزیابی میزان بیان ژن‌های دخیل در تکوین جنین، در بیان ژن $Cdx2$ ، در گروه انجمادی با استفاده از نانوذرات نسبت به گروه انجمادی بدون استفاده از نانوذرات کاهش معناداری ($P < 0.05$) مشاهده کردند. با توجه به افزایش میزان بلوغ و لقاح آزمایشگاهی و تعدیل در میزان بیان ژن‌ها توسط نانوذرات نتیجتاً گزارش کردند که نانوذرات (Fe_3O_4) اثر مخربی بر تخمک نگذاشته بلکه باعث بهبود روند IVM و IVF شده است (۳۷). Baniasadi و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۲ از نانوذرات اکسید آهن همراه با میدان مغناطیسی ۶۰ میلی تسلا در انجماد تخمک بالغ با توده کومولوسی استفاده کردند. این گروه نشان دادند که استفاده هم‌زمان از میدان مغناطیسی ثابت و نانوذرات اکسید آهن در انجماد باعث بهبود کیفیت تخمک‌ها، افزایش میزان پتانسیل میتوکندریایی پس از ذوب، لقاح و رشد جنینی و میزان بلاستوسیت‌ها می‌شود. در عمل میدان مغناطیسی ثابت با ایجاد محافظت انجمادی و افزایش پایداری غشای سلولی باعث افزایش مقاومت غشای سیتوپلاسمی و اندامک‌ها در مقابل تنش‌های مکانیکی ناشی از تشکیل کریستال‌های یخ در حین انجماد می‌شود. مضافاً حضور نانوذره‌ی اکسید آهن منجر به افزایش شدت میدان مغناطیسی در محلول انجمادی شده است. این نانوذرات با افزایش رسانش حرارتی و یکنواختی سریع دما در کل سلول، به گرم شدن سریع تخمک‌های طی فرایند ذوب کمک کرده و رشد کریستال‌های یخ را محدود می‌کنند. همراه شدن این دو روش محافظت انجمادی،

مکانیک کوانتومی بر آن‌ها حاکم است؛ به عبارت دیگر هرچه از مکانیک کلاسیک به سمت مکانیک کوانتومی حرکت می‌کنیم، ذرات کوچک‌تر شده و رفتارهای کوانتومی بیشتری نشان می‌دهند. بهره‌وری از نانوذرات در علم سرما زیستی بسیار نوپا و محدود به چند مقاله علمی در سال‌های اخیر است. در سال ۲۰۰۸ Han و همکارانش اثر نانوذرات الماس، نقره، طلا و اکسید سلسیم را روی ضد انجمادهای مختلفی مانند اتیلن‌گلیکول، گلیسرول و پروپاندیول به روش انجماد آهسته بررسی کردند. آن‌ها با روش گرماسنجی تفاضلی (Differential Scanning Calorimetry) دمای هسته‌زایی و شیشه‌زدایی (Devitrification) را اندازه‌گیری کردند. نتایج اندازه‌گیری‌ها حاکی از افزایش دمای هسته‌زایی در طول انجماد و کاهش دمای شیشه‌زدایی در هنگام ذوب بود. با توجه به این نتایج نانوذرات می‌توانند نقش عامل تشکیل یخ‌های آمورف (Ice Nucleation Agent) را ایفا می‌کنند. در سال ۲۰۱۴ اثر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بر ویسکوزیته محلول‌های ضد یخ DMSO و گلیسرول بررسی شد. شواهد حاکی از آن بود که نانوذرات هیدروکسی آپاتیت ویسکوزیته محلول‌ها را نسبت به محلول‌های خالص بیشتر می‌کند. علاوه بر این حضور ذرات HA در محلول انجماد مانع از دهیدراته شدن سلولی، هسته‌زایی و رشد یخ در طی انجماد و ذوب می‌شود (۴۴). در مطالعه‌ای دیگر استفاده از نانوذرات در انجماد شیشه‌ای تخمک به کمک نانوذرات HA است. در سال ۲۰۱۵ تخمک‌های GV خوک را در حضور نانوذرات HA با قطر ۶۰ نانومتر با غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ به روش انجماد شیشه‌ای منجمد کردند. نتایج این پژوهش نشان می‌داد که میزان بقاء و نرخ بلوغ در محیط آزمایشگاه با افزایش غلظت نانوذرات از ۰ تا ۰/۰۵ درصد از مقدار ۹۳/۴٪ به بیشینه مقدار ۹۹/۴۳٪ می‌رسد. با این وجود نرخ بقاء برای غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۵ درصد روند نزولی داشته است. در مقاله‌ای دیگر توسط همین گروه، سمیت نانوذرات هیدروکسی آپاتیت، اکسید آلومینیوم، اکسید تیتانیوم و اکسید سیلیسیم در انجماد شیشه‌ای تخمک GV خوک بررسی شد. این مطالعه نشان داد که اثر سمیت هیدروکسی آپاتیت نسبت به نانوذرات

سازگار وجود دارند که به تخمک آسیب نمی‌رسانند و تخمک‌ها عملکرد خود را در حضور این ذرات حفظ می‌کند. حفظ و بهبود قابلیت‌های تخمک سبب می‌شود تا لقاح آزمایشگاهی بهتر پیش رود. به‌طور کلی فناوری‌های نوین چشم‌انداز عوامل فیزیکی را در سرما زیستی و تولیدمثل نمایان می‌سازد. **حامی مالی:** ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

در ایده، نگارش و ویرایش مقاله کلیه نویسندگان مشارکت داشتند.

باعث ارتقای کیفیت تخمک‌ها پس از ذوب شد و راهبردی در راستای ارتقای روش‌های انجماد تخمک است (۴۸).

نتیجه‌گیری

این مطالعه بر بررسی بر مزایای بالقوه، آسیب‌ها و چالش‌های عوامل فیزیکی و فناوری نوین در انجماد تخمک پرداخت. بر اساس این نتایج، منطقی به‌نظر می‌رسد که استفاده از میدان مغناطیسی و نانوذرات بتواند آسیب‌های زیستی ایجاد شده به دلیل تشکیل یخ در تخمک‌ها را کاهش دهد. استفاده از میدان مغناطیسی با شدت متوسط به حفظ قابلیت تخمک‌ها بعد از انجماد شیشه‌ای کمک می‌کند. در کنار میدان، نانوذرات زیست

References:

- 1-Shahedi A, Hosseini A, Khalili MA, Norouzian M, Salehi M, Piriaei A, et al. *The Effect of Vitrification on Ultrastructure of Human in Vitro Matured Germinal Vesicle Oocytes*. European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology 2013; 167(1): 69-75.
- 2-Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. *Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations*. Cell transplantation 2021; 30: 963689721999617.
- 3-Aghaz F, Khazaei M. *Recent Advances of the Egg's Freezing: An Overview*. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2018; 28(164): 192-213.
- 4-Zhao G, Fu J. *Microfluidics for Cryopreservation*. Biotechnology Advances 2017; 35(2): 323-36.
- 5-Huang H, He X, Yarmush ML. *Advanced Technologies for the Preservation of Mammalian Biospecimens*. Nature Biomedical Engineering 2021; 5(8): 793-804.
- 6-Youssry M, Ozmen B, Zohni K, Diedrich K, Al-Hasani S. *Current Aspects of Blastocyst Cryopreservation*. Reproductive Biomedicine Online 2008; 16(2): 311-20.
- 7-Park JK, Lee JH, Park EA, Lim HJ, Lyu SW, Lee WS, et al. *Development of Optimized Vitrification Procedures Using Closed Carrier System to Improve the Survival and Developmental Competence of Vitrified Mouse Oocytes*. Cells 2021; 10(7): 1670.
- 8-eki S, Mazur P. *Ultra-Rapid Warming Yields High Survival of Mouse Oocytes Cooled to -196°C in Dilutions of a Standard Vitrification Solution*. PloS one 2012; 7(4): e36058.
- 9-Palay P, Fathi D, Fathi R. *Oocyte Quality Evaluation: A Review of Engineering Approaches toward Clinical Challenges*. Biology of Reproduction 2022; 108(3): 393-407.

- 10- Shayegh P, Baniasadi F, Rajabimaham H, Ghalamboran MR, Fathi R. *Magnetic Nanoparticles Decreased ROS Levels in Vitrified-Warmed Mouse Immature and Mature Oocytes*. Cryobiology 2023; 113: 104779.
- 11- Yazdanpanah F, Khalili MA, Eftekhari M, Karimi H. *The Effect of Vitrification on Maturation and Viability Capacities of Immature Human Oocytes*. Arch Gynecol Obstet 2013; 288(2): 439-44.
- 12- Casillas F, Teteltitla-Silvestre M, Ducolomb Y, Lemus AE, Salazar Z, Casas E, et al. *Co-Culture with Granulosa Cells Improve the in Vitro Maturation Ability of Porcine Immature Oocytes Vitrified with Cryolock*. Cryobiology 2014; 69(2): 299-304.
- 13- Tao T, Del Valle A. *Human Oocyte and Ovarian Tissue Cryopreservation and Its Application*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 2008; 25(7): 287-96.
- 14- Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B. *Science of Cryopreservation in Reproductive Medicine - Embryos and Oocytes as Exemplars*. Early Human Development 2018; 126: 6-9.
- 15- Amstislavsky S, Mokrousova V, Brusentsev E, Okotrub K, Comizzoli P. *Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review*. Biopreservation and biobanking 2019; 17(1): 76-83.
- 16- Horvath G, Seidel GE, Jr. *Vitrification of Bovine Oocytes after Treatment with Cholesterol-Loaded Methyl-Beta-Cyclodextrin*. Theriogenology 2006; 66(4): 1026-33.
- 17- Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. *Calcium-Free Vitrification Reduces Cryoprotectant-Induced Zona Pellucida Hardening and Increases Fertilization Rates in Mouse Oocytes*. Reproduction (Cambridge, England) 2006; 131(1): 53-61.
- 18- Wang N, Hao HS, Li CY, Zhao YH, Wang HY, Yan CL, et al. *Calcium Ion Regulation by BAPTA-AM and Ruthenium Red Improved the Fertilisation Capacity and Developmental Ability of Vitrified Bovine Oocytes*. Scientific Reports 2017; 7(1): 10652.
- 19- Wang N, Li CY, Zhu HB, Hao HS, Wang HY, Yan CL, et al. *Effect of Vitrification on the Mrna Transcriptome of Bovine Oocytes. Reproduction in Domestic Animals*. Zuchthygiene 2017; 52(4): 531-41.
- 20- Larman MG, Katz-Jaffe MG, Sheehan CB, Gardner DK. *1, 2-Propanediol and the Type of Cryopreservation Procedure Adversely Affect Mouse Oocyte Physiology*. Human Reproduction 2006; 22(1): 250-9.
- 21- Lan T, Zhang K, Lin F, He Q, Wu S, Xu Z, et al. *Effects of MICU1-Mediated Mitochondrial Calcium Uptake on Energy Metabolism and Quality of Vitrified-Thawed Mouse Metaphase II Oocytes*. International Journal of Molecular Sciences 2022; 23(15):
- 22- Ma Y, Pan B, Yang H, Qazi IH, Wu Z, Zeng C, et al. *Expression of CD9 and CD81 in Bovine Germinal Vesicle Oocytes after Vitrification Followed by in Vitro Maturation*. Cryobiology 2018; 81: 206-9.
- 23- Kauppila TES, Kauppila JHK, Larsson NG. *Mammalian Mitochondria and Aging: An Update*. Cell metabolism 2017; 25(1): 57-71.
- 24- Liu JC, Lai FN, Li L, Sun XF, Cheng SF, Ge W, et al. *Di (2-Ethylhexyl) Phthalate Exposure Impairs*

- Meiotic Progression and DNA Damage Repair in Fetal Mouse Oocytes in Vitro*. Cell Death & Disease 2017; 8(8): E2966.
- 25- Amoushahi M, Salehnia M, Mowla SJ. *Vitrification of Mouse MII Oocyte Decreases the Mitochondrial DNA Copy Number, TFAM Gene Expression and Mitochondrial Enzyme Activity*. Journal of reproduction & infertility 2017; 18(4): 343-51.
- 26- Vining LM, Zak LJ, Harvey SC, Harvey KE. *The Role of Apoptosis in Cryopreserved Animal Oocytes and Embryos*. Theriogenology 2021; 173: 93-101.
- 27- Niu Y, Dai J, Wu C, Chen Y, Zhang S, Zhang D. *The Application of Apoptotic Inhibitor in Apoptotic Pathways of MII Stage Porcine Oocytes after Vitrification*. Reproduction in Domestic Animals Zuchthygiene 2016; 51(6): 953-9.
- 28- Castillo-Martín M, Bonet S, Morató R, Yeste M. *Comparative Effects of Adding B-Mercaptoethanol or L-Ascorbic Acid to Culture or Vitrification-Warming Media on IVF Porcine Embryos*. Reproduction, fertility, and development 2014; 26(6): 875-82.
- 29- Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. *Effect of Vitrification and Beta-Mercaptoethanol on Reactive Oxygen Species Activity and in Vitro Development of Oocytes Vitrified Before or after in Vitro Fertilization*. Fertility and Sterility 2010; 93(8): 2602-7.
- 30- Somfai T, Yoshioka K, Tanihara F, Kaneko H, Noguchi J, Kashiwazaki N, et al. *Generation of Live Piglets From Cryopreserved Oocytes for the First Time Using A Defined System for in Vitro Embryo Production*. PloS one 2014; 9(5): e97731.
- 31- Kato Y, Nagao Y. *Effect of Polyvinylpyrrolidone on Sperm Function and Early Embryonic Development Following Intracytoplasmic Sperm Injection in Human Assisted Reproduction*. Reproductive Medicine and Biology 2012; 11(4): 165-76.
- 32- Casillas F, Betancourt M, Cuello C, Ducolomb Y, López A, Juárez-Rojas L, et al. *An Efficiency Comparison of Different in Vitro Fertilization Methods: IVF, ICSI, and PICSI for Embryo Development to the Blastocyst Stage from Vitrified Porcine Immature Oocytes*. Porcine health management 2018; 4: 16.
- 33- Murray KA, Gibson MI. *Chemical Approaches to Cryopreservation*. Nature Reviews Chemistry 2022; 6(8): 579-93.
- 34- Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Jeremias J, Dieterle S, Korneeva I, et al. *Heat Shock Protein Expression During Gametogenesis and Embryogenesis*. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology 1999; 7(1-2): 10-6.
- 35- Curci A, Bevilacqua A, Mangia F. *Lack of Heat-Shock Response in Preovulatory Mouse Oocytes*. Developmental Biology 1987; 123(1): 154-60.
- 36- Khodabandeh Jahromi Z, Amidi F, Nori Mugehe S, Sobhani A, Mehrannia K, Abbasi M, et al. *Expression of Heat Shock Protein (HSP A1A) and Mnsod Genes Following Vitrification of Mouse MII Oocytes with Cryotop Method*. J Cell Journal (Yakhteh) 2010; 12(1): 113-9.

- 37- Abbasi Y, Hajiaghalou S, Baniasadi F, Mahabadi VP, Ghalamboran MR, Fathi R. *Fe(3)O(4) Magnetic Nanoparticles Improve the Vitrification of Mouse Immature Oocytes and Modulate the Pluripotent Genes Expression in Derived Pronuclear-Stage Embryos*. Cryobiology 2021; 100: 81-9.
- 38- Baniasadi F, Hajiaghalou S, Shahverdi A, Pirhajati V, Fathi R. *Static Magnetic Field Halves Cryoinjuries of Vitrified Mouse Cocs, Improves their Functions and Modulates Pluripotency of Derived Blastocysts*. Theriogenology 2021; 163: 31-42.
- 39- Adey WR. *Biological Effects of Electromagnetic Fields*. Journal of Cellular Biochemistry 1993; 51(4): 410-6.
- 40- Moriguchi H, Zhang Y, Mihara M, Sato C. *Successful Cryopreservation of Human Ovarian Cortex Tissues Using Supercooling*. Scientific Reports 2012; 2: 537.
- 41- Lin SL, Chang WJ, Lin CY, Hsieh SC, Lee SY, Fan KH, et al. *Static Magnetic Field Increases Survival Rate of Dental Pulp Stem Cells during DMSO-Free Cryopreservation*. Electromagnetic Biology and Medicine 2015; 34(4): 302-8.
- 42- Lin CY, Chang WJ, Lee SY, Feng SW, Lin CT, Fan KS, et al. *Influence of a Static Magnetic Field on the Slow Freezing of Human Erythrocytes*. International Journal of Radiation Biology 2013; 89(1): 51-6.
- 43- Kazemine Jaseemi VS, Samadi F, Eimani H, Hasani S, Fathi R, Shahverdi A. *Comparison of Allotransplantation of Fresh and Vitrified Mouse Ovaries to the Testicular Tissue Under Influence of the Static Magnetic Field*. Cell journal 2017; 19(3): 492-505.
- 44- Yi J, Tang H, Zhao G. *Influence of Hydroxyapatite Nanoparticles on the Viscosity of Dimethyl Sulfoxide-H2O-NaCl and Glycerol-H2O-NaCl Ternary Systems at Subzero Temperatures*. Cryobiology 2014; 69(2): 291-8.
- 45- Li Y, Wang P, Li R, Tao M, Liu Z, Qiao H. *A Survey of Multifingered Robotic Manipulation: Biological Results, Structural Evolvments, and Learning Methods*. Frontiers in Neurorobotics 2022; 16: 843267.
- 46- Fujiwara K, Sano D, Seita Y, Inomata T, Ito J, Kashiwazaki N. *Ethylene Glycol-Supplemented Calcium-Free Media Improve Zona Penetration of Vitrified Rat Oocytes by Sperm Cells*. The Journal of Reproduction and Development 2010; 56(1): 169-75.
- 47- Zhu X, Zhao S, Xu S, Zhang D, Zhu M, Pan Q, et al. *Granulosa Cells Improved Mare Oocyte Cytoplasmic Maturation By Providing Collagens*. Frontiers in Cell and Developmental Biology 2022; 10: 914735.
- 48- Baniasadi F, Hajiaghalou S, Shahverdi A, Ghalamboran MR, Pirhajati V, Fathi R. *The Beneficial Effects of Static Magnetic Field and Iron Oxide Nanoparticles on the Vitrification of Mature Mice Oocytes*. Reproductive Reprod Sci 2023; 30(7): 2122-36.

Damages of Freezing on the Development of Oocyte and Embryos

Pegah Shayegh^{1,2}, Fatemeh Rahmati^{1,2}, Farzaneh Baniasadi¹, Meisam Jangkhah¹,
Hasan Rajabimaham^{*2}, Mohammad Reza Ghalamboran³, Rouhollah Fathi^{*1}

Review Article

Introduction: To assist save endangered species from extinction and to aid in their care, it is crucial to sustaining their reproductive capacity. The fetus's life and growth processes begin at conception and proceed in accordance with a biological clock's timing. With today's understanding through cryobiology, observing scientific ethics problems and interfering with the clock's operation by stopping its biological time is possible. Practically, it is accomplished by storing the cell at -196 °C, or the temperature of liquid nitrogen, where all metabolic activity ceases. Since 200 years ago, germ cell preservation has been a common practice. Since then, there have been many improvements, particularly for at-risk women. Since then, significant progress has been achieved, and several freezing techniques are being used to preserve ovarian tissue, follicles, and oocytes in women who are at risk of infertility. Different approaches have different levels of success. Among preservation techniques, vitrification performs better and is used more frequently. The cellular configuration of the mammalian oocyte is intricate. This cell's constituent parts are particularly sensitive to osmosis and variations in temperature. For instance, the alterations to the cell membrane that occur during maturation, in vitro fertilization, and the differential between the permeability of water and cryoprotectants can all be mentioned. Oocyte freezing results in a variety of impairments, including a reduction in the quality and viability of cells after thawing.

Conclusion: Recent studies are looking for ways to enhance freezing procedures and raise the caliber of frozen oocytes. The favorable or negative effects of freezing on the oocyte and its potential, or embryo development, are the subject of this review article.

Keywords: Embryo, Freezing, Oocyte, Slow freezing, Vitrification.

Citation: Shayegh P, Rahmati F, Baniasadi F, Jangkhah M, Rajabi Maham H, Ghalamboran M.R, Fathi R. **Damages of Freezing on the Development of Oocyte and Embryos.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 32(5): 7785-7802.

¹Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.

²Department of Animal Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

³Plant Sciences and Biotechnology Department, Life Sciences and Biotechnology School, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Tel: 089129479621, email: rfathi79@royaninstitute.org, h_rajabi@sbu.ac.ir.