

## اثرات عدم تقارن در عملکرد جفت تخمدان‌های گاو بر ویژگی‌های بافت شناسی دسته‌جات مختلف فولیکول‌های پری‌آنترال انجماد یافته به روش شیشه‌سازی

محمد حامد شهسواری<sup>۱</sup>، غلامعلی مقدم<sup>۲\*</sup>، حسین دقیق‌کیا<sup>۱</sup>، آنایائولا ریبریو رودریگز<sup>۳</sup> و مجتبی دشتی زاد<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۲۶

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری دام گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

<sup>۲</sup> استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

<sup>۳</sup> استاد دانشکده دامپزشکی، موسسه تحقیقاتی لموفوپا، دانشگاه ایالتی سرآ فورتالزای برزیل

<sup>۴</sup> استادیار گروه علوم دامی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری. گروه زیست فناوری دامی. آزمایشگاه زیست فناوری رویان

\*مسئول مکاتبه: Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

### چکیده

**زمینه مطالعاتی:** تناقض‌های بسیاری در رابطه با اثرات مثبت یا منفی جسم زرد و فعالیت نابرابر دو سمت دستگاه تولید مثلی وجود دارد. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی اثرات جسم زرد و سمت تخمدان (راست در برابر چپ) بر ویژگی‌های بافت-شناسی انواع مختلف فولیکول‌های پره‌آنترال بعد از فرآیند انجماد بافت تخمدان گاو به روش شیشه‌سازی بوده است. **روش کار:** قطعات تخمدانی از هر یک از جفت تخمدان‌ها استحصال شدند. در گروه کنترل تازه نمونه‌های بافتی بلافاصله برای آنالیزهای بافتی تثبیت شدند در حالی که در گروه‌های تحت فرآیند انجماد به روش شیشه‌سازی [گروه‌های فاقد جسم زرد، واجد جسم زرد، راست و چپ] که سپس ۱ یا ۵ روز مورد کشت برون‌تنی قرار گرفتند، بافت‌های تخمدانی قبل و بعد از کشت تثبیت شده و از لحاظ بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. **نتایج:** نتایج این آزمایش نشان داد که اگرچه عدم حضور جسم زرد در تخمدان منجر به وقوع درصد بالاتری از فولیکول‌های نرمال از نوع انتقالی (نمونه‌های کشت داده شده در روز ۱) و اولیه (نمونه‌های گرم‌سازی شده) نسبت به نمونه‌هایی که از تخمدان‌های واجد جسم زرد گرفته شده است، شد اما یک مورد استثناء هم وجود داشت. این نتایج نشان دادند که در نمونه‌های بدست آمده از تخمدان‌های واجد جسم زرد، درصد بالاتری از فولیکول‌های مادری اولیه نرمال (نمونه‌های کشت داده شده در روز ۱) نسبت به تخمدان‌های فاقد جسم زرد مشاهده می‌شود (به ترتیب ۵۷/۶٪ در برابر ۳۹/۳٪). اگرچه برای تمامی انواع فولیکول‌های پره‌آنترال در تمامی مراحل آزمایش (گرم‌سازی، روز ۱ یا ۵ کشت برون‌تنی) هیچ تفاوت معنی‌داری از لحاظ درصد فولیکول‌های نرمال بین دو گروه راست و چپ وجود نداشت ( $P > 0/05$ ). **نتیجه‌گیری نهایی:** براساس نتایج بدست آمده از این مطالعه اینگونه میتوان استنتاج کرد که بسیاری از عوامل همچون حضور یا عدم حضور یک جسم زرد، نوع و رده فولیکول‌های پره‌آنترال، مراحل پس از انجماد (گرم‌سازی و روزهای کشت داده شده) و اثر متقابل بین این عوامل می‌توانند میزان موفقیت نتایج حاصل از انجماد به روش شیشه‌سازی را متأثر سازند.

**واژگان کلیدی:** جسم زرد، انجماد به روش شیشه‌سازی، کشت برون‌تنی، فولیکول انتقالی، فولیکول اولیه

## مقدمه

فرآیند محافظت در برابر سرما به‌طور موثری برای ذخیره‌سازی و حمل و نقل سلول‌های تفکیک شده بکار رفته است، اگرچه این کاربرد برای سیستم‌های پیچیده‌تر و چند سلولی محدودتر می‌باشد (تیلور و همکاران ۲۰۰۴). هم‌اکنون درک گسترده‌ای از مکانیسم‌های دخیل در آسیب به سلول‌ها در خلال انجماد و یخ‌گشایی وجود دارد، بطوریکه امروزه مشخص شده است که تقریباً بطور نامحدود و با نرخ بازیابی بالایی می‌توان از دماهای بسیار پایین برای حفظ بسیاری از انواع سلول‌ها استفاده کرد (کارلسون و تونر ۱۹۹۶). در راستای حفظ خطوط زاینده مادری<sup>۱</sup> برای حیوانات در خطر انقراض، فرآیند محافظت در برابر سرما در مورد بافت تخمدان نسبت به تخمک بالغ یا رویان مزایای بیشتری را ارائه می‌دهد. علیرغم این موضوع، فرآیند محافظت در برابر سرما در مورد بافت تخمدان هنوز واجد چالش‌های فراوانی می‌باشد و پروتوکل آن می‌بایست با توجه به وجود انواع مختلف سلول‌ها و اجزای این بافت از قبیل سلول‌های گرانولوزا، سلول‌های اندوتلیال و ماتریکس‌های خارج سلولی (هوواتا و همکاران ۲۰۰۵) و همچنین وجود تنوع زیستی بین گونه‌های مختلف، بهینه و استاندارد گردد (ویلدت و ومر ۱۹۹۹). با وجود آنکه اغلب هدف از فرآیند محافظت در برابر سرما در مورد بافت تخمدان، حفظ فولیکول‌های تخمدانی مادری آغازین (پریموردیال) است (کاتسکا-کسیازکویسز ۲۰۰۶ و سانتوس و همکاران ۲۰۱۰)، اما امکان زنده‌مانی مراحل پیشرفته‌تر فولیکول‌های پره-آنترال مانند فولیکول‌های انتقالی، اولیه و ثانویه نیز بعد از فرآیند محافظت در برابر سرما وجود دارد (سانتوس و همکاران ۲۰۰۸ و بارت و همکاران ۲۰۱۰). اگرچه می‌بایست در نظر داشت که فولیکول‌های مادری آغازین به دلیل این که تخمک موجود در آنها از لحاظ متابولیکی نسبتاً غیرفعال

بوده و فاقد دوک‌های تقسیم متافازی، لایه شفاف و گرانول‌های قشری هستند و از سویی مقادیر لیپید آنها اندک است، اغلب در مقایسه با دیگر انواع فولیکول که در مراحل پیشرفته‌تر رشد و نمو قرار دارند، به‌طور مؤثرتری در برابر سرما محافظت خواهند شد (هوواتا و همکاران ۲۰۰۵ و سانتوس و همکاران ۲۰۱۱). مطالعات انجام شده در دهه اخیر از امکان انجماد به روش شیشه‌سازی در مورد ناحیه قشری تخمدان که واجد فولیکول‌های پره‌آنترال هستند، شواهدی بدست داده‌اند. برای مثال دلپنا و همکاران (۲۰۰۲) از تولید موش‌هایی سالم گزارش نمودند که پس از کشت آزمایشگاهی فولیکول‌های پره‌آنترالی که قبلاً تحت انجماد شیشه‌سازی واقع شده و سپس مراحل بلوغ و لقاح آزمایشگاهی را طی نموده بودند، بدست آمد.

علیرغم تمامی پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه محافظت در برابر سرما در مورد بافت تخمدان، هنوز چالش‌های فراوانی سدّ راه آن وجود دارد و پروتوکل آن می‌بایست برای هماهنگی با تنوع سلول‌ها و اجزای مختلف این بافت از قبیل تخمک، سلول‌های گرانولوزا، سلول‌های اندوتلیال و ماتریکس خارج سلولی (هوواتا و همکاران ۲۰۰۵)، تفاوت‌ها بین انواع فولیکول‌های پره‌آنترال (سانتوس و همکاران ۲۰۱۱) و تنوع زیستی بین گونه‌ها، بهینه گردد (ویلدت و ومر ۱۹۹۹).

اصولاً براساس فرآیند رشد و نمو جنینی، می‌بایست دو سمت سیستم تناسلی از فعالیت یکسانی برخوردار باشند (گرس و همکاران ۲۰۱۱). با این وجود شواهد بسیاری در رابطه با وجود عدم تقارن در عملکرد سیستم تناسلی و تاثیرات آن بر فراسنجه‌های تولیدمثلی در منابع گذشته ذکر شده است. برای مثال تخمدان راست در انسان (فوکودا و همکاران ۲۰۰۰) و گاو (گرس و همکاران ۲۰۱۱) از لحاظ تخمک‌گذاری فعال‌تر هستند و در افراد متقاضی انجام فرآیند

<sup>۱</sup> . Female germline

### مواد و روش‌ها

این مطالعه تحت نظر و قوانین کمیته اخلاق برای استفاده از حیوانات دانشگاه ایالتی سرآ برزیل انجام پذیرفت. بجز مواردی که ذکر می‌گردد، تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت سیگما تأمین گردید.

### جمع‌آوری تخمدان‌ها و گروه‌های آزمایشی

تخمدان‌ها (۱۰ عدد) از پنج راس گاو ماده بالغ نژاد آمیخته و از یک کشتارگاه محلی جمع‌آوری شد. تخمدان‌های دام‌های آبستن (وضعیت آبستنی پس از کشتار دام‌ها از طریق بررسی بصری پرده‌های جنینی، کیسه آمنیوتیک، کوتیلدون-ها، جنین و یا تغییر در قوام و ظاهر رحم مشخص گردید) و آن دسته از تخمدان‌هایی که واجد حالات پاتولوژیک مانند وجود فولیکول‌های کیستی بودند، از مطالعه حاضر حذف گردیدند. همچنین تنها حیواناتی که واجد جسم زرد مرحله دی‌استروس بودند در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند، به طوری که گاوهای موجود در مرحله دی‌استروس واجد حداقل یک جسم زرد بر روی یکی از تخمدان‌های راست یا چپ خود بودند (حجاریان و همکاران ۲۰۱۶). تخمدان‌ها بر اساس وجود یا عدم وجود جسم زرد و سمت تخمدان‌ها به پنج دسته به قرار زیر تقسیم شدند: ۱- CL+ (واجد جسم زرد)، ۲- CL- (فاقد جسم زرد)، ۳- Right (تخمدان‌های سمت راست)، ۴- Left (تخمدان‌های سمت چپ)، ۵- Control (تخمدان‌هایی که هیچ‌گونه انتخابی بر اساس وجود یا عدم وجود جسم زرد و یا سمت تخمدان در مورد آنها انجام نگرفته است و نماینده شیوه معمول جمع‌آوری تخمدان‌ها می‌باشند).

به محض کشتار دام‌ها، تخمدان‌ها جدا شده و یکبار در اتانول ۷۰٪ و سپس دوبار در محلول MEM بافری شده با بافر هپس<sup>۳</sup> مکمل شده با ۱۰۰ µg/ml پنیسیلین و ۱۰۰ µg/ml

لقاح برون تنی (IVF)<sup>۱</sup> که واجد تخمدان‌های سالم هستند، پاسخ تخمدان راست نسبت به تخمدان چپ بیشتر است (لان و همکاران ۲۰۱۰). این فعالیت نابرابر دو سمت سیستم تناسلی ممکن است مربوط به تفاوت در میزان تخمک‌گذاری بین دو تخمدان راست و چپ، تفاوت‌ها بین محیط شاخ‌های رحمی راست و چپ و یا تفاوت در شایستگی ذاتی و تکاملی تخمک‌های نشأت گرفته از این تخمدان‌ها باشد (کرمی شبانکاره و همکاران ۲۰۱۵). مطالعات گذشته تصدیق نموده‌اند که ارتباط خاص بین رشد و نمو جسم زرد (CL)<sup>۲</sup> و رشد و نمو فولیکولی ممکن است موجب عدم تقارن در عملکرد اعضای تناسلی در گاوهای شیری شود (کونتراس-سولیس و همکاران ۲۰۰۸ و پنینتته-فیلهو و همکاران ۲۰۱۴). بوئدینو و همکاران (۱۹۹۳) و سوگوله و همکاران (۲۰۰۸) از پاره‌ای تناقضات در مورد آثار مثبت و منفی جسم زرد بر کیفیت تخمک‌ها شواهدی را بدست داده‌اند. بر طبق مطالعه صورت گرفته توسط کرمی شبانکاره و همکاران (۲۰۱۵) اثرات جسم زرد بر شایستگی تکاملی تخمک‌های گاوی خود متأثر از اندازه فولیکولی می‌باشد و بر این اساس نشان داده شده است که می‌توان با استفاده از تخمک‌های منشأ گرفته از فولیکول‌های بزرگ تخمدان‌های فاقد جسم زرد، برخی مشکلات مربوط به تولید برون تنی رویان‌های گاوی را کاهش داد (کرمی شبانکاره و همکاران ۱۳۹۴).

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات جسم زرد و سمت تخمدان (راست در برابر چپ) بر ویژگی‌های بافت‌شناسی انواع مختلف فولیکول‌های پره‌آنترال (مادری آغازین، انتقالی، اولیه و ثانویه) پس از انجام به روش شیشه‌سازی بافت تخمدان گاو می‌باشد.

<sup>۳</sup> . Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

<sup>۴</sup> . HEPES-buffered minimum essential medium (MEM)

<sup>۱</sup> . *In vitro* fertilization (IVF)

<sup>۲</sup> . Corpus luteum (CL)

### فرآیند انجماد به روش شیشه‌سازی و گرم‌سازی

تمامی مراحل و روش‌های به‌کارگرفته شده برای ارائه عوامل محافظ سرما (CPAs) و انجماد به روش شیشه‌سازی با استفاده از یک سیستم جدید انجماد بافت تخمدان (OTC)<sup>۴</sup> که در گذشته توسط تیم ما ابداع و استفاده گردیده بود، انجام پذیرفت (کاروالهو و همکاران ۲۰۱۳ و همکاران ۲۰۱۶). به‌طور خلاصه، در تعادل قرار دادن نمونه‌ها در محلول شیشه‌سازی (VS)<sup>۵</sup> به‌طور تدریجی در دو مرحله به صورت زیر انجام پذیرفت: ۱- VS1 شامل MEM مکمل شده با ۱۰ mg/ml BSA، ۰/۲۵ مولار ساکارز، ۱۰٪ اتیلن گلیکول (EG)<sup>۶</sup> و ۱۰٪ دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)<sup>۷</sup>؛ ۲- VS2 شامل MEM مکمل شده با ۱۰ mg/ml BSA، ۰/۲۵ مولار ساکارز، ۲۰٪ اتیلن گلیکول (EG) و ۲۰٪ دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO). پس از یک هفته از ذخیره نمونه‌های تخمدانی شیشه‌سازی شده در نیتروژن مایع، نمونه‌ها ابتدا به مدت یک دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتیگراد) مورد گرم‌سازی اولیه قرار گرفتند. برداشت CPAs از طریق شستشوی نمونه‌ها در سه محلول هر کدام به مدت ۵ دقیقه به قرار زیر انجام پذیرفت: ۱- MEM + αMEM + BSA ۳ mg/ml + ۰/۵ مولار ساکارز، ۲- MEM + αMEM + BSA ۳ mg/ml + ۰/۲۵ مولار ساکارز، ۳- MEM + αMEM + BSA ۳ mg/ml (سالز و همکاران ۲۰۱۶).

### کشت برون تنی

برای انجام فرآیند کشت برون تنی، نمونه‌های بخش قشری بافت تخمدان به ظرف‌های ۲۴ خانه‌ای کشت که هر یک حاوی ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت بودند، انتقال داده شدند. کشت در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسید-کربن در هوا انجام پذیرفت. محیط‌های کشت تازه یک ساعت

استریپتومایسین مورد شستشو قرار گرفتند. سپس تخمدان‌ها در محلول MEM در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و طی مدت یک ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه بافت‌های اضافی و چربی از تخمدان‌ها زدوده شده و بخش قشری هر یک از جفت تخمدان‌ها (پس از دسته‌بندی بر اساس وجود یا عدم وجود جسم زرد و سمت تخمدان‌ها) با استفاده از یک دستگاه برش بافت<sup>۱</sup> به ۶۰ قطعه کوچک (۳ میلی‌متر × ۳ میلی‌متر × ۳ میلی‌متر) تحت شرایط استریل برش داده شدند. برای هر حیوان ۱۰ قطعه تخمدان به عنوان نمونه کنترل تازه؛<sup>۲</sup> ۱۰ قطعه به عنوان نمونه‌های تازه کشت داده شده<sup>۳</sup> (بدون انجام انجماد به روش شیشه‌سازی) که برای یک (D1) یا پنج روز (D5) مورد کشت قرار گرفتند. ۴۰ قطعه تخمدانی دیگر بطور تصادفی بین چهار گروه تیماری (در هر گروه ۱۰ قطعه) به قرار زیر توزیع شدند: ۱- CL+ (واجد جسم زرد)، ۲- CL- (فاقد جسم زرد)، ۳- Right (تخمدان‌های سمت راست)، ۴- Left (تخمدان‌های سمت چپ) که پس از انجماد به روش شیشه‌سازی برای یک (D1) یا پنج روز (D5) مورد کشت برون‌تنی قرار گرفتند. نمونه‌های کنترل تازه سریعاً برای انجام آنالیزهای بافت‌شناسی مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های تازه کشت داده شده نیز پس از کشت به مدت یک یا پنج روز تحت آنالیزهای بافت‌شناسی قرار گرفتند. در گروه‌هایی که مورد انجماد شیشه‌سازی قرار گرفته بودند، در هر گروه ۲ قطعه تخمدانی پس از گرم‌سازی برای انجام آنالیزهای بافت‌شناسی آماده شدند و قطعات دیگر (۸ قطعه) به مدت ۱ یا ۵ روز مورد کشت قرار گرفته و سپس آنالیزهای بافت‌شناسی در مورد آنها انجام پذیرفت.

۵. Vitrification solution (VS)

۶. Ethylene glycol (EG) (Dinâmica - Dinâmica Química, Diadema, Brazil)

۷. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Dinâmica)

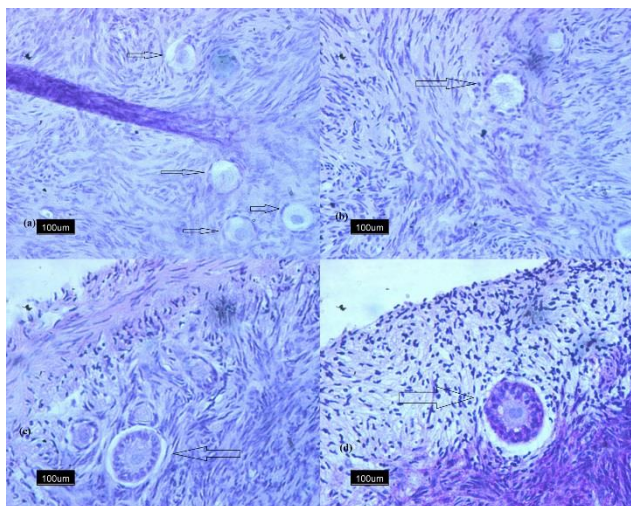
۱. Thomas Stadie-Riggs Tissue Slicer/Blades

۲. Fresh control

۳. Fresh cultured samples

۴. Ovarian Tissue Cryosystem (OTC)

گرانولوزای مکعبی (فولیکول ثانویه) دسته‌بندی شدند (سانتوس و همکاران ۲۰۱۱) (شکل ۱). کیفیت فولیکول‌های پره‌آنترال بر اساس پارامترهایی که در گذشته توصیف شده است بررسی گردید (پینتو و همکاران ۲۰۰۸). به‌طور مختصر، فولیکول‌هایی که از لحاظ شکل‌شناسی نرمال تلقی می‌گردند واجد یک تخمک و سلول‌های گرانولوزای سالم هستند در حالی که فولیکول‌های دژنره واجد یک تخمک با هسته پیکنوتیک، چروکیدگی اوپلاسم و یا سلول‌های گرانولوزایی هستند که بدرستی سازمان نیافته و از غشای پایه جدا شده‌اند. برای جلوگیری از ارزیابی و شمارش یک فولیکول بیش از یک بار، فولیکول‌های پره‌آنترال تنها در قطعاتی بررسی شدند که در آنها هسته تخمک مشاهده گردید (کاروالهو و همکاران ۲۰۱۳).



شکل ۱- فتومیکروگراف‌های بافت‌شناسی قطعات بافت

تخمدانی. (a) فولیکول مادری آغازین، (b) فولیکول انتقالی،

(c) فولیکول اولیه و (d) فولیکول ثانویه

**Figure 1. Histology photomicrographs of ovarian tissue. Primordial follicle (a), transitional follicle (b), primary follicle (c), secondary follicle (d)**

قبل از استفاده در شرایط ذکر شده انکوبه شده و هر دو روز یک بار مجدداً پر می‌شدند. محیط کشت پایه به‌کار گرفته شده در این مطالعه محیط McCoy همراه با بی-کربنات بوده است [تیم ما در مطالعه‌ای دیگر استفاده از محیط McCoy را برای کشت بافت‌های تخمدانی شیشه‌سازی شده گاو پیشنهاد نموده است (کاسترو و همکاران ۲۰۱۴)] که توسط بافر هپس (Invitrogen Ltd، ۲۰ میلی مولار)، گلوتامین (Invitrogen Ltd، ۳ میلی مولار)، BSA (Fraction V 0.1%)، پنسیلین (۰/۱ mg/ml)، استرپتومایسین (۰/۱ mg/ml)، ترانسفرین (۲/۵ mg/ml)، سلنیوم (۴ ng/ml) و آسکوربیک اسید (۵۰ mg/ml) مکمل شده بود. قطعات تخمدانی به مدت ۱ (D1) یا پنج روز (D5) مورد کشت قرار گرفتند (کاسترو و همکاران ۲۰۱۴ و مک لاقلین و تلفر ۲۰۱۰).

#### آنالیز بافت شناسی

نمونه‌ها در محلول Millonig (محلول فسفات بافری ۴۰٪ فرمالدهید در آب) به مدت ۲ ساعت فیکس شده و سپس در غلظت‌های صعودی اتانول آگیری شدند. پس از شفاف سازی در گزیلول و قالب‌گیری در پارافین برش‌های ۷ میکرومتری از آنها تهیه شد. هر پنج قطعه برش داده شده بر روی یک اسلاید شیشه‌ای منتقل شده و پس از رنگ‌آمیزی با PAS<sup>۱</sup> با استفاده از میکروسکوپ نوری (Nikon, Tokyo, Japan) با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفتند. در هر یک از گروه‌های تیماری ۱۵۰ فولیکول پره-آنترال (۳۰ فولیکول به ازای هر حیوان) مورد ارزیابی قرار گرفتند که به عنوان فولیکول‌های بدون حفره آنتروم با یک تخمک که توسط یک لایه از سلول‌های مسطح (فولیکول آغازین)، یک لایه از سلول‌های مسطح و مکعبی (فولیکول انتقالی)، یک لایه از سلول‌های گرانولوزای مکعبی (فولیکول اولیه) و یا تخمک‌هایی که با دو یا تعداد بیشتری سلول‌های

<sup>۱</sup> . Periodic acid-Schiff (PAS)

### تحلیل آماری

در این مطالعه داده‌هایی که دارای توزیع نرمال نبودند (Kolmogorov-Smirnov test) مورد تبدیل لگاریتمی<sup>۱</sup> قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها (فولیکول‌های نرمال از لحاظ شکل‌شناسی) با استفاده از آزمون Kruskal-Wallis و آزمون Mann-Whitney انجام پذیرفت. تمامی آزمون‌های آماری با استفاده از Sigma Plot 11 انجام شد و تفاوت‌ها زمانی معنی دار محسوب شدند که  $P < 0.05$  بود.

### نتایج

پس از مرحله گرم‌سازی درصد فولیکول‌های پره‌آنترال در هر یک از گروه‌های تیماری بررسی گردید. در این مرحله تفاوت معنی‌داری در درصد فولیکول‌های مادری آغازین طبیعی از لحاظ معیارهای شکل‌شناسی بین تیمارهای مورد بررسی، وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). همچنین میزان فولیکول‌های نرمال مادری آغازین در همه تیمارهای مورد بررسی در مرحله گرم‌سازی مشابه گروه کنترل تازه بود ( $P > 0.05$ ). روندی مشابه با آنچه در مورد فولیکول‌های مادری آغازین مشاهده شد، در مورد فولیکول‌های انتقالی نیز در مرحله گرم‌سازی ثبت گردید به طوری که تفاوت معنی‌داری در درصد فولیکول‌های نرمال انتقالی بین تیمارهای مورد بررسی، وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). همچنین مشخص شد که در این دسته فولیکولی (انتقالی) در مرحله گرم‌سازی، درصد فولیکول‌های طبیعی انتقالی در قطعات بدست آمده از تخمدان چپ بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل تازه بالاتر بوده است ( $P < 0.05$ ). در مورد فولیکول‌های اولیه در مرحله گرم‌سازی، نتایج نشان داد که درصد فولیکول‌های طبیعی در قطعات بدست آمده از تخمدان‌های فاقد جسم زرد (CL-) نسبت به قطعات بدست آمده از تخمدان‌های واجد جسم زرد (CL+) بیشتر بوده است (به

ترتیب ۱۳/۳٪ در برابر ۶/۱٪). همچنین مشخص شد که درصد فولیکول‌های طبیعی اولیه در قطعات بدست آمده از گروه (-) CL (۱۳/۳٪) نسبت به آن در گروه کنترل تازه (۷/۴٪) بیشتر بوده است. با وجود این تفاوت‌ها اختلاف معنی‌داری بین قطعات بدست آمده از تخمدان راست و چپ از لحاظ درصد فولیکول‌های طبیعی اولیه در مرحله گرم‌سازی وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). با وجود اینکه در مورد گروه‌های (+) CL و چپ فولیکول ثانویه‌ای در مرحله گرم‌سازی مشاهده نگردید اما مشخص شد که هیچ تفاوت معنی‌داری بین دو گروه (-) CL و راست از لحاظ درصد فولیکول‌های طبیعی ثانویه در مرحله گرم‌سازی وجود نداشت ( $P > 0.05$ ).

نتایج بدست آمده ۱ روز پس از کشت برون‌تنی قطعات تخمدانی گرم‌سازی شده مبین آن بوده که در رابطه با فولیکول‌های مادری اولیه درصد فولیکول‌های نرمال در گروه کنترل (پس از یک روز کشت) (۵۷/۳٪) و گروه (+) CL (۳۹/۳٪) به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه (-) CL (۳۹/۳٪) بوده است. اگرچه تفاوت معنی‌داری بین دیگر گروه‌ها از لحاظ درصد فولیکول‌های طبیعی مادری آغازین در یک روز پس از کشت برون‌تنی ثبت نگردید اما مشخص شد که در گروه (-) CL (۳۹/۳٪) درصد فولیکول‌های طبیعی مادری آغازین در یک روز پس از کشت برون‌تنی کمتر از این مقدار در گروه کنترل تازه بوده است (۵۹٪). در رابطه با فولیکول‌های انتقالی در یک روز پس از کشت برون‌تنی مشخص شد که اگرچه تفاوت معنی‌داری بین دو گروه راست و چپ از لحاظ درصد فولیکول‌های طبیعی وجود نداشت ( $P > 0.05$ ) اما گروه (-) CL (۵۶/۶٪) درصد فولیکول‌های انتقالی طبیعی بالاتری را نسبت به گروه‌های (+) CL (۳۳/۱٪) راست (۳۸/۳٪) و کنترل کشت داده شده در روز ۱ (۳۶٪) و همچنین گروه کنترل تازه (۳۰/۲٪) دارا بود. در مورد فولیکول‌های

<sup>2</sup>. Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., USA)

<sup>1</sup>. Logarithmic transformation

اساس در مورد گروه کنترل کشت داده شده مشاهده گردید که هیچ تفاوت معنی‌داری در این گروه از لحاظ درصد فولیکول‌های نرمال مادری آغازین، اولیه یا ثانویه بین روزهای ۱ و ۵ کشت برون‌تنی وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). با این وجود در مورد فولیکول‌های انتقالی روندی متفاوت مشاهده گردید به طوری که درصد فولیکول‌های طبیعی انتقالی در روز ۱ کشت برون‌تنی ( $36/0\%$ ) کمتر از این میزان در روز ۵ کشت برون‌تنی ( $44/6\%$ ) بود. با در نظر گرفتن هر یک از دستجات فولیکولی گروه  $CL(-)$  در مراحل مختلف مشخص شد که درصد فولیکول‌های طبیعی مادری آغازین، اولیه و ثانویه در مرحله گرم‌سازی نسبت به موارد مشابه در مرحله روز ۱ کشت برون‌تنی بالاتر بود ( $P < 0.05$ ). اگرچه در مورد فولیکول‌های انتقالی روند متفاوت بود و درصد فولیکول‌های طبیعی در این دسته در روز ۱ کشت برون‌تنی ( $56/6\%$ ) و روز ۵ کشت برون‌تنی ( $51/4\%$ ) بیشتر از آن در مرحله گرم‌سازی ( $31/6\%$ ) بود. همچنین با مقایسه فولیکول‌های مادری آغازین در دو مرحله گرم‌سازی و روز ۵ کشت برون‌تنی مشخص گردید که درصد فولیکول‌های نرمال در این دسته فولیکولی در مرحله روز ۵ کشت برون‌تنی ( $37/3\%$ ) کمتر از آن در مرحله گرم‌سازی ( $53/6\%$ ) نمی‌باشد.

اولیه در ۱ روز پس از کشت برون‌تنی مشخص شد که بین گروه‌های آزمایشی هیچ تفاوت معنی‌داری از لحاظ درصد فولیکول‌های نرمال وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). با وجود اینکه در مورد گروه‌های  $CL(-)$  کنترل و چپ فولیکول ثانویه‌ای در ۱ روز پس از کشت برون‌تنی مشاهده نگردید اما مشخص شد که هیچ تفاوت معنی‌داری بین دو گروه  $CL(+)$  و راست از لحاظ درصد فولیکول‌های طبیعی ثانویه وجود نداشت ( $P > 0.05$ ).

۵ روز پس از کشت برون‌تنی قطعات تخمدانی گرم‌سازی شده مشخص گردید که هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی از لحاظ درصد فولیکول‌های طبیعی مادری آغازین وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). اگرچه در مقایسه با گروه کنترل تازه ( $59\%$ )، گروه‌های  $CL(-)$  ( $37/3\%$ ) و چپ ( $39/8\%$ ) دارای درصد بالاتری از فولیکول‌های طبیعی مادری آغازین بودند. در مورد فولیکول‌های انتقالی در روز پنجم کشت، نتایج نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی از لحاظ درصد فولیکول‌های طبیعی انتقالی وجود نداشت ( $P > 0.05$ )، اما نسبت به گروه کنترل تازه ( $30/2\%$ )، تمامی گروه‌های مورد آزمایش دارای درصد پایین‌تری از فولیکول‌های طبیعی انتقالی بودند. در مورد دیگر دسته‌های فولیکولی یعنی فولیکول‌های اولیه و ثانویه نیز روند مشابهی مشاهده گردید به طوری که در روز پنجم کشت هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی از لحاظ درصد فولیکول‌های طبیعی اولیه یا ثانویه ثبت نگردید ( $P > 0.05$ ).

با مقایسه هر یک از دستجات فولیکولی در هر یک از گروه‌های آزمایشی بر اساس مرحله مورد بررسی (مرحله گرم‌سازی، روز ۱ کشت و روز ۵ کشت) شاهد ثبت تفاوت‌هایی معنی‌دار بود. بر این

جدول ۱- درصد میانگین (Mean± SEM) فولیکول‌های پره‌آنترال طبیعی از لحاظ معیارهای شکل‌شناسی

Table 1- Mean (± SEM) percentage of morphologically normal preantral follicles

	Preantral follicles				<i>In vitro</i> culture							
	Primordial	Transitory	Primary	Secondary	Day 1				Day 5			
Fresh control	59.0 ± 3.7	30.2 ± 3.4	7.4 ± 2.1	3.4 ± 1.3	Primordial	Transitory	Primary	Secondary	Primordial	Transitory	Primary	Secondary
Control	-	-	-	-	57.3 ± 5.3 <sup>aA</sup>	36.0 ± 5.1 <sup>aA</sup>	6.6 ± 2.8 <sup>aA</sup>	-	44.5 ± 5.2 <sup>aA</sup>	44.6 ± 5.1 <sup>aA*</sup>	9.3 ± 2.9 <sup>aA</sup>	1.3 ± 1.3 <sup>aA</sup>
CL(-) <sup>۱</sup>	53.6 ± 4.7 <sup>aA</sup>	31.6 ± 4.3 <sup>aA</sup>	13.3 ± 3.1 <sup>aA*</sup>	1.3 ± 1.1 <sup>aA</sup>	39.3 ± 5.0 <sup>bb*</sup>	56.6 ± 5.2 <sup>bb*</sup>	4.0 ± 1.9 <sup>ba</sup>	-	37.3 ± 6.2 <sup>ba*</sup>	51.4 ± 6.4 <sup>ba*</sup>	6.9 ± 3.6 <sup>abA</sup>	4.2 ± 2.9 <sup>aA</sup>
CL(+) <sup>۱</sup>	66.4 ± 5.2 <sup>aA</sup>	27.3 ± 4.9 <sup>aA</sup>	6.1 ± 3.1 <sup>aB</sup>	-	57.6 ± 6.6 <sup>abA</sup>	33.1 ± 6.2 <sup>abA</sup>	8.5 ± 4.1 <sup>aA</sup>	0.7 ± 0.7 <sup>aA</sup>	47.0 ± 6.6 <sup>ba</sup>	46.7 ± 6.6 <sup>ba*</sup>	4.1 ± 2.9 <sup>aA</sup>	2.1 ± 2.1 <sup>aA</sup>
Right <sup>۲</sup>	63.0 ± 5.6 <sup>aA</sup>	25.7 ± 4.9 <sup>aA</sup>	10.3 ± 3.6 <sup>aAB</sup>	0.8 ± 0.8 <sup>aA</sup>	50.0 ± 7.2 <sup>abAB</sup>	38.3 ± 7.0 <sup>abA</sup>	10.4 ± 4.5 <sup>aA</sup>	1.1 ± 1.1 <sup>aA</sup>	46.6 ± 4.4 <sup>ba</sup>	45.2 ± 4.4 <sup>ba*</sup>	8.1 ± 2.4 <sup>aA</sup>	-
Left <sup>۲</sup>	67.5 ± 5.8 <sup>aA</sup>	21.4 ± 5.0 <sup>Aa*</sup>	11.0 ± 3.8 <sup>aAB</sup>	-	46.7 ± 7.9 <sup>baB</sup>	46.4 ± 7.7 <sup>baB*</sup>	6.7 ± 3.9 <sup>aA</sup>	-	39.8 ± 6.7 <sup>ba*</sup>	47.9 ± 7.3 <sup>ba*</sup>	10.5 ± 4.2 <sup>aA</sup>	1.6 ± 1.1 <sup>aA</sup>

CL(-) and CL(+): ovarian samples collected from CL bearing and not bearing ovaries, respectively.

Right and left: ovarian samples collected from right or left ovaries, respectively.

<sup>a,b,c</sup> Percentages within a row and each follicle class differ significantly (P < 0.05).

<sup>A,B</sup> Percentages within a column and each follicle class differ significantly (P < 0.05).

\* Differ from fresh control group in each follicle class (P < 0.05).



#### بحث

در بسیاری از گونه‌های پستانداران (موش خرما؛ فریتزچ و همکاران ۲۰۰۰، انسان؛ فوکودا و همکاران ۲۰۰۰ و گوسفند؛ شبانکاره و همکاران ۲۰۰۹) عملکرد نابرابر دو سمت سیستم تولیدمثلی گزارش شده است و از وجود تناقضاتی در مورد اثرات مثبت و منفی جسم زرد بر فعالیت سیستم تولید مثلی شواهدی به‌دست داده است. بر اساس یافته‌های ما، این بررسی اولین مطالعه در نوع خود بوده که اقدام به بررسی اثرات جسم زرد و سمت تخمدان (راست در برابر چپ) بر ویژگی‌های بافت‌شناسی انواع مختلف فولیکول‌های پره-آنترال (مادری آغازین، انتقالی، اولیه و ثانویه) پس از انجماد به روش شیشه‌سازی بافت تخمدان گاو نموده است.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که آثار مثبت یا منفی جسم زرد و سمت تخمدان خود متاثر از مراحل مختلف (گرم‌سازی و روزهای متفاوت کشت برون‌تنی) و انواع مختلف فولیکول‌های پره-آنترال می‌باشد. بر این اساس در مرحله گرم‌سازی، درصد فولیکول‌های طبیعی در قطعات بدست آمده از تخمدان‌های فاقد جسم زرد (CL-) تنها در مورد فولیکول‌های اولیه بیشتر از گروه CL(+) و گروه کنترل تازه بود. در روز ۱ کشت برون‌تنی نیز روندی مشابه در مورد فولیکول‌های انتقالی مشاهده گردید به‌طوری که درصد فولیکول‌های نرمال انتقالی در گروه CL(-) بیشتر از این مقدار در اکثر غریب به یقین گروه‌ها بود (عدم معنی داری تنها نسبت به گروه چپ). این روند به‌طور مشابه در مورد فولیکول‌های انتقالی در روز ۵ کشت برون‌تنی نیز تا حدی تکرار شد به‌طوری که گروه CL(-) از لحاظ عددی بیشترین درصد فولیکول‌های نرمال انتقالی نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی را دارا بوده است و به‌طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل تازه بوده است. این نتایج در راستای مطالعات صورت گرفته در انسان بوده است که گزارش

با در نظر گرفتن هر یک از دستجات فولیکولی گروه CL(+) در مراحل مختلف مشخص شد که تنها تفاوت موجود بین هر یک از دستجات فولیکولی با در نظر گرفتن مراحل مورد بررسی در مورد فولیکول‌های مادری آغازین در مرحله روز ۵ کشت برون‌تنی ثبت گردید به‌طوری که درصد فولیکول‌های طبیعی مادری آغازین در روز ۵ کشت برون‌تنی (۴۷٪) به‌طور معنی‌داری کمتر از این مقدار در مرحله گرم‌سازی (۶۶/۴٪) و در روز ۱ کشت برون‌تنی (۵۷/۶٪) بود.

در مورد گروه راست تنها تفاوت‌های موجود در مورد فولیکول‌های مادری آغازین و انتقالی در مراحل گرم‌سازی و روز ۵ کشت برون‌تنی مشاهده گردید. بر این اساس درصد فولیکول‌های طبیعی مادری آغازین در گروه راست در مرحله گرم‌سازی (۶۳٪) بالاتر از این مقدار در مرحله روز ۵ کشت برون‌تنی (۴۶/۴٪) بود. در مورد فولیکول‌های انتقالی این روند در این دو مرحله از آزمایش متفاوت بود به‌طوری که درصد فولیکول‌های طبیعی انتقالی در مرحله گرم‌سازی (۲۵/۷٪) پایین‌تر از این مقدار در مرحله روز ۵ کشت برون‌تنی (۴۵/۲٪) بود.

همین روند مشاهده شده در مورد گروه راست، در رابطه با گروه چپ نیز تکرار گردید. بر این اساس درصد فولیکول‌های طبیعی مادری اولیه در گروه چپ در مرحله گرم‌سازی (۶۷/۵٪) بالاتر از این مقدار در مرحله روز ۱ کشت برون‌تنی (۴۶/۷٪) و روز ۵ کشت برون‌تنی (۳۹/۸٪) بوده است. در مورد فولیکول‌های انتقالی این روند از این لحاظ متفاوت بود به‌طوری که درصد فولیکول‌های طبیعی انتقالی در مرحله گرم‌سازی (۲۱/۴٪) پایین‌تر از این مقدار در مرحله روز ۱ کشت برون‌تنی (۴۶/۴٪) و روز ۵ کشت برون‌تنی (۴۷/۹٪) بود.

و تجدید مداوم رشد فولیکولی بوده است (تیلور و راجاماهندران ۱۹۹۴).

نتایج حاصل از این مطالعه هیچگونه تفاوت معنی‌داری در رابطه با درصد فولیکول‌های طبیعی در هیچ یک از دستجات فولیکولی در هیچ یک از مراحل مورد بررسی بین قطعات تخمدانی استحصالی از تخمدان‌های راست و چپ را ثبت نکرد. این نتایج با برخی مطالعات گذشته که از برتری یک سمت سیستم تولیدمثلی در برخی گونه‌ها شواهدی را بدست داده بودند، در تناقض بود (فوکودا و همکاران ۲۰۰۰ و گرس و همکاران ۲۰۱۱).

حال این سوال مطرح است که کدام عامل تخمدانی به‌صورت موضعی از جسم زرد موجب این تأثیر منفی بر فولیکول‌های هم‌جوار خواهد شد؟ پروژسترون که در مقادیر فراوان طی نیمه فاز لوتئال توسط جسم زرد ترشح می‌شود، یک کاندیدای آشکار در اعمال این اثر محسوب می‌شود (فوکودا و همکاران ۱۹۹۶). اثرات جانب‌ریزی و خودریزی اعمال شده توسط فولیکول‌ها و جسم زرد در بسیاری از مطالعات برون‌تنی گزارش شده است (فیندلی و همکاران ۲۰۰۱ و شبانکاره و همکاران ۲۰۱۳). علاوه بر این، بر روی تخمدان‌های گاوای گیرنده‌هایی برای هر دو هورمون استروژن و پروژسترون یافت شده‌اند (بریشا و همکاران ۲۰۰۲). در واقع عدم وجود اثرات غالبیت فولیکولی در خلال فاز جسم زرد فعال شواهدی مبنی بر حمایت از فرضیه آدامز (۱۹۹۹) در رابطه با وجود اثرات ممانعتی پروژسترون مترشحه از جسم زرد بر طول عمر فولیکول‌های غالب در گوسفندان، ارائه می‌دهد. مکانیسم سیستمیکی که پروژسترون به‌واسطه آن از رشد فولیکولی ممانعت می‌نماید از طریق سرکوب ضربان‌های ترشحی هورمون LH بوده که برای ادامه رشد فولیکول‌های بزرگ ضروری می‌باشد (فلین و همکاران ۱۹۹۹). پروژسترون همچنین ممکن است هم در تخمدان‌های واجد جسم زرد و هم فاقد جسم زرد اثراتی موضعی را

نموده‌اند که فولیکول‌های غالبی که در سمت مقابل تخمک-گذاری قبلی وجود دارند (CL<sup>-</sup>-ovary) از سلامت بیشتری نسبت به فولیکول‌هایی برخوردار بوده که در همان سمت تخمک‌گذاری قبلی (CL<sup>+</sup>-ovary) واقع شده‌اند و موجب نتایج بهتری پس از طی مراحل IVF شده‌اند (فوکودا و همکاران ۱۹۹۶). گزارش شده است که ممانعت از فرآیند تکامل فولیکولی و تخمک‌گذاری توسط جسم زرد بر روی تخمدانی که در سیکل قبلی تخمک‌گذاری نموده است (تخمدان واجد جسم زرد)، بارزتر می‌باشد (ایسلام و همکاران ۲۰۰۷ و سانتوس و همکاران ۲۰۰۷). علاوه بر این، نتایج مطالعات گذشته در نشخوارکنندگان مبین آن بوده است که تعداد متوسط تخمک‌های با کیفیت از تخمدان‌های فاقد جسم زرد در مقایسه با تخمدان‌های واجد جسم زرد، بیشتر بوده و از آنها می‌توان به‌طور مؤثری جهت اهداف IVF بهره جست (کومار و همکاران ۲۰۰۴ و جمیل و همکاران ۲۰۰۸). اگرچه در مطالعه حاضر مشخص شد که درصد فولیکول‌های نرمال در قطعات بدست آمده از تخمدان‌های فاقد جسم زرد (CL<sup>-</sup>) در فولیکول‌های مادری آغازین در مرحله روز ۱ کشت برون‌تنی کمتر از گروه‌های CL(+), کنترل کشت داده شده و کنترل تازه بود. در این راستا در مطالعه‌ای که بر روی گاو انجام شد، نشان داد که اگرچه نرخ کلیواژ تخمک-های استحصالی از تخمدان‌های فاقد جسم زرد نسبت به تخمدان‌های واجد جسم زرد بالاتر بود، اما میزان تولید بلاستوسیست روندی معکوس را نشان داد (بوئدینو و همکاران ۱۹۹۵). همچنین برخی مطالعات گذشته (بوئدینو و همکاران ۱۹۹۵ و پیرستانی و همکاران ۲۰۱۰) در گاوها میزان تولید بلاستوسیست بیشتری را از تخمک‌های استحصالی از تخمدان‌های موجود در فاز لوتئال یا تخمدان-های واجد جسم زرد در مقایسه با تخمدان‌های موجود در فاز فولیکولی یا تخمدان‌های فاقد جسم زرد، گزارش نمودند، که احتمالاً به‌علت غلظت بالاتر پروژسترون در گردش خون

تخمک‌ها مناسب‌تر از این مایعات در تخمدان‌های واجد جسم زرد می‌باشد چرا که داده‌های آنها نشان داد که محتوای متابولیکی مایعات فولیکولی استحصال شده از فولیکول‌های موجود بر روی تخمدان‌های گاوی فاقد جسم زرد در زمان استحصال نسبت به تخمدان‌های واجد جسم زرد بیشتر می‌باشد. بعد از تشکیل جسم زرد، عروق خونی جدید برای توسعه جسم زرد، تشکیل می‌شوند. جسم زرد تشکیل شده، نسبت به دیگر بافت‌های تخمدانی میزان بیشتری خون را دریافت خواهد کرد. در واقع افزایش جریان خون به سلول‌های فولیکولی در تخمدان‌های فاقد جسم زرد موجب افزایش در دسترس قرارگیری گونادوتروپین‌ها و دیگر عوامل بیوشیمیایی و هورمونی لازم برای رشد بهینه تخمک‌ها می‌گردد (آکوستا و میاموتو ۲۰۰۴).

نتایج حاصل از این مطالعه، برخی دلایل وجود تناقضات در رابطه با آثار مثبت یا منفی جسم زرد بر فراسنجه‌های تولیدمثلی را مشخص کرد. بر این اساس حداقل دو عامل دیگر در نوع این اثرات دخیل می‌باشند که عبارتند از نوع فولیکول پره‌آنترال و دیگری مرحله مورد بررسی و زمان کشت. در نتیجه امکان دارد با در نظر گرفتن این دو عامل موثر و اثرات جسم زرد در فرموله ساختن ترکیبات محافظ سرما و ابداع روش‌های انجمادی کارآمدتر بتوان در جهت تقلیل برخی چالش‌های پیش‌رو در فرآیند محافظت بافت‌ها در برابر سرما گام برداشت.

مستقل از تغییرات ترشح گونادوتروپین‌ها اعمال نماید (بارتلوسکی و همکاران ۲۰۰۱). کانترراس-سولیس و همکارانش (۲۰۰۸) نه‌تنها از وجود یک اثر سیستمیک از جانب جسم زرد بر دینامیک فولیکولی گوسفندان شواهدی بدست دادند، اثراتی داخل تخمدانی را نیز ثبت کردند که موجب کاهش معنی‌دار در رشد فولیکول‌هایی می‌گردد که در تخمدان واجد جسم زرد وجود دارند (بارتلوسکی و همکاران ۲۰۰۱). همچنین نتایج این مطالعات از وجود یک عامل ممانعتی که از جسم زرد آزاد شده شواهدی به‌دست داده‌اند (کانترراس-سولیس و همکاران ۲۰۰۸). اینهیبین که از جسم زرد بزها و گاوها ترشح (سانقا و همکاران ۲۰۰۲) و به‌داخل ورید تخمدانی تخلیه می‌شود (تسونیس و همکاران ۱۹۸۸) قادر است تا رشد فولیکولی را متأثر سازد (کمپیل و همکاران ۱۹۹۱).

در مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد که فولیکول‌هایی که در مراحل اولیه رشد و نمو بوده‌اند (فولیکول‌های مادری آغازین) به اندازه‌ای که فولیکول‌های رشد یافته تر (انتقالی و اولیه) از اثرات منفی جسم زرد متأثر شده‌اند، تحت تأثیر قرار نگرفته‌اند. در این رابطه نشان داده شده است که غلظت ترکیبات مایع فولیکولی با رشد فولیکولی و حضور یا عدم حضور جسم زرد تغییر می‌کند (شبانکاره و همکاران ۲۰۱۰). شبانکاره و همکاران (۲۰۱۳) بیان نمودند که مایعات فولیکولی استحصال شده از فولیکول‌های موجود بر روی تخمدان‌های گاوی فاقد جسم زرد جهت استفاده در بلوغ

#### منابع مورد استفاده

- Acosta TJ and Miyamoto A, 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science* 82:127-40.
- Adams G, 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 54:17-32.
- Barrett SL, Shea LD and Woodruff TK, 2010. Noninvasive Index of Cryorecovery and Growth Potential for Human Follicles In Vitro 1. *Biology of Reproduction* 82: 1180-9.

- Bartlewski PM, Beard AP and Rawlings NC, 2001. Ultrasonographic study of the effects of the corpus luteum on antral follicular development in unilaterally ovulating western white-faced ewes. *Animal Reproduction Science* 65:231-44.
- Berisha B, Pfaffl MW and Schams D, 2002. Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy. *Endocrine* 17:207-14.
- Boediono A, Rajamahendran R, Saha S, Sumantri C and Suzuki T, 1995. Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production in vitro in cattle. *Theriogenology* 43:169-169.
- Campbell B, Picton H, Mann G, McNeilly A and Baird D, 1991. Effect of steroid-and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 93:81-96.
- Carvalho AA, Faustino LR, Silva CM, Castro SV, Lopes CA, Santos RR, Bão SN, Figueiredo JR and Rodrigues AP, 2013. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). *Animal Reproduction Science* 138: 220-7.
- Castro SV, Carvalho AD, Silva CM, Santos FW, Campello CC, Figueiredo JR and Rodrigues AP, 2014. Fresh and vitrified bovine preantral follicles have different nutritional requirements during in vitro culture. *Cell and Tissue Banking* 15: 591-601.
- Contreras-Solis I, Diaz T, Lopez G, Caigua A, Lopez-Sebastian A and Gonzalez-Bulnes A, 2008. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. *Animal Reproduction Science* 104:47-55.
- Dela Pena EC, Takahashi Y, Katagiri S, Atabay EC and Nagano M, 2002. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reproduction* 123: 593-600.
- Findlay J, Drummond A, Dyson M, Baillie A, Robertson D and Ethier JF, 2001. Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology* 180:139-44.
- Flynn J, Duffy P, Boland M and Evans A, 1999. Effect of synchronisation of oestrus using a progestagen sponge on ovarian follicular dynamics and luteinising hormone pulse frequency in sheep *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 39.
- Fritzsche P, Riek M and Gattermann R, 2000. Effects of social stress on behavior and corpus luteum in female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Physiology & Behavior* 68:625-30.
- Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY and Byskov AG, 1996. Ovary and Ovulation: Contralateral selection of dominant follicle favours pre-embryo development. *Human Reproduction* 11:1958-62.
- Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY and Byskov AG, 2000. Right sided ovulation favours pregnancy more than left sided ovulation *Human Reproduction* 15:1921-1926 .
- Gereš D, Ževrnja B, Žubčić D, Zobel R, Vulić B, Staklarević N and Gracin K, 2011. Asymmetrical functional activities of ovaries and tubular part of reproductive organs of dairy cows . *Veterinarski arhiv* 81: 187-198 .
- Hajarian H, Shahsavari MH, Karami-shabankareh H and Dashtizad M, 2016. The presence of corpus luteum may have a negative impact on in vitro developmentl competency of bovine oocytes. *Reproductive Biology* 16:47-52.
- Hovatta I, Tennant RS, Helton R and Marr RA, 2005. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 438:662-6.
- Islam M, Khandoker M, Afroz S, Rahman M and Khan R, 2007. Qualitative and quantitative analysis of goat ovaries, follicles and oocytes in view of in vitro production of embryos. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 8:465-9.
- Jamil H, Samad HA, Qureshi ZI, Rehman NU and Lodhi LA, 2008. Harvesting and evaluation of riverine buffalo follicular oocytes. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 32: 25-30.

- Karami Shabankareh H, Hajarian H, Shahsavari MH and Foroutanifar S, 2016 In vitro developmental competence of bovine oocytes in relation to side of ovaries, presence of corpus luteum and follicle size. *Journal of Animal Science Researches* 25: 93-105.
- Karamishabankareh H, Hajarian H, Shahsavari M and Moradinejad R, 2015. In vivo and in vitro study of the function of the left and right bovine ovaries. *Theriogenology* 84:724–731.
- Karlsson JOM. and Toner M, 1996. Long-term storage of tissues by cryopreservation: Critical issues. *Biomaterials* 17:243–256.
- Kątska-Książkiewicz L, 2006. Recent achievements in in vitro culture and preservation of ovarian follicles in mammals. *Reproductive Biology* 6: 3-16.
- Kumar N, Paramasivan S, Sood P and Singh M, 2004. Micrometry of different category oocytes recovered from goat ovaries. *Indian Journal of Animal Sciences* 74:259–260.
- Lan KC, Huang FJ, Lin YC, Kung FT, Lan TH and Chang SY, 2010. Significantly superior response in the right ovary compared with the left ovary after stimulation with follicle-stimulating hormone in a pituitary down-regulation regimen. *Fertility and Sterility* 93:2269-2273.
- McLaughlin M and Telfer EE, 2010. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. *Reproduction* 139: 971-8.
- Penitente-Filho JM, Carrascal E, Oliveira FA, Zolini AM, Oliveira CT, Soares ÍA and Torres CA, 2014. Influence of dominant follicle and corpus luteum on recovery of good quality oocytes for in vitro embryo production in Cattle. *British Biotechnology Journal* 4:1305-1312.
- Pinto LC, Santos RR, Faustino LR, da Silva CM, Luz VB, Maia Junior JE, Soares AA, Celestino JJ, Mafezoli J, Campello CC and Figueiredo JR, 2008. Quantification of dimethyl sulfoxide perfusion in sheep ovarian tissue: a predictive parameter for follicular survival to cryopreservation. *Biopreserv Biobank* 6: 269-76.
- Pirestrani A, Morteza S, Hajian M, Forouzanfar M, Moulavi F and Avedi P, 2010. Effect of ovarian cyclic status on in vitro embryo production in cattle. *International Journal of Fertility and Sterility* 4:172-5.
- Sales AD, Duarte AB, Santos RR, Alves KA, Lima LF, Rodrigues GQ, Brito IR, Lobo CH, Bruno JB, Locatelli Y and Figueiredo JR, 2016. Modulation of aquaporins 3 and 9 after exposure of ovine ovarian tissue to cryoprotectants followed by in vitro culture. *Cell and Tissue Research* 365: 415-24.
- Sangha G, Sharma R and Guraya S, 2002. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research* 43:53-64.
- Santos M, Carrazzoni P, Paula-Lopes F, Neves J, Bartolomeu C and Lima P, 2007. Follicular dynamics in Anglo-Nubian goats using transrectal and transvaginal ultrasound. *Small Ruminant Research* 72:51-6.
- Santos RR, Amorim C, Cecconi S, Fassbender M, Imhof M, Lornage J, Paris M, Schoenfeldt V and Martinez-Madrid B, 2010. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Animal Reproduction Science* 122: 151-63.
- Santos RR, Van den Hurk R, Rodrigues AP and Figueiredo JR, 2011. Viability of oocytes and granulosa cells from cryopreserved ovine ovarian primordial, primary and secondary follicles. *Small Ruminant Research* 99: 203-7.
- Santos RR, Van Haeften T, Roelen BA, Knijn HM, Colenbrander B, Gadella BM and Van den Hurk R, 2008. Osmotic tolerance and freezability of isolated caprine early-staged follicles. *Cell and Tissue Research* 333: 323.
- Shabankareh HK, Habibizad J, Sarsaifi K, Cheghamirza K and Jasemi VK, 2010. The effect of the absence or presence of a corpus luteum on the ovarian follicular population and serum oestradiol concentrations during the estrous cycle in Sanjabi ewes. *Small Ruminant Research* 93:180-5.
- Shabankareh HK, Habibizad J and Torki M, 2009. Corpus luteum function following single and double ovulation during estrous cycle in Sanjabi ewes. *Animal Reproduction Science* 114:362-9.

- Shabankareh HK, Kor NM and Hajarian H, 2013. The influence of the corpus luteum on metabolites composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 140:109-14.
- Sugulle AH, Dochi O and Koyama H, 2008. Developmental competence of bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue Staining: Effect of the presence of corpus luteum on embryo development. *Journal of Mammalian Ova Research* 25:50-5.
- Taylor C and Rajamahendran R, 1994. Effect of mid-luteal phase progesterone levels on the first wave dominant follicle in cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 74:281-5.
- Taylor M, Song Y and Brockbank K, 2004. 22 Vitrification in Tissue Preservation: New Developments. *Life in the Frozen State*, BJ Fuller, N Lane, and EE Benson, eds, CRC Press, Boca Raton, FL 604-41.
- Tsonis C, Baird D, Campbell B, Leask R and Scaramuzzi R, 1988. The sheep corpus luteum secretes inhibin. *Journal of Endocrinology* 116:R3-R5.
- Wildt DE and Wemmer C, 1999. Sex and wildlife: the role of reproductive science in conservation. *Biodiversity Conserv* 8: 965-76.

## Impacts of asymmetry in activity of left and right bovine ovaries on histological characteristics of various vitrified preantral follicle classes

MH Shahsavari<sup>1</sup>, Gh Moghaddam<sup>2\*</sup>, H Daghigh Kia<sup>2</sup>, A P Ribeiro Rodrigues<sup>3</sup> and M Dashtizad<sup>4</sup>

Received: October 3, 2017

Accepted: March 17, 2018

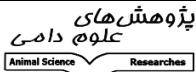

<sup>1</sup>PhD Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>2</sup>Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>3</sup>Professor, Faculty of Veterinary Medicine, LAMOFOPA, PPGCV, State University of Ceara, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>4</sup>Assistant Professor, Department of Animal Biotechnology, Embryo biotechnology Lab, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

\*Corresponding author: Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

 <p>پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Researches</p>	Journal of Animal Science/vol.29 No.3/ 2019/pp 1-16 <a href="https://animalscience.tabrizu.ac.ir">https://animalscience.tabrizu.ac.ir</a>	
© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. This is an open access article under the CC BY license ( <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</a> )		

**Introduction:** The success of ovarian tissue cryopreservation can be recognized by the live birth in different animal species (mice, rabbit, birds, sheep, and human). In spite of all the advances of cryopreservation of ovarian tissue, it is still a challenge and protocols should be optimized to handle the diversity of cell types and components of this tissue (oocyte, granulosa cells, endothelial cells, extra cellular matrix) and the biological variability among species. It was reported that there was a relationship between the development of corpus luteum (CL) and the development of follicles, which may cause asymmetry in the function of the reproductive organs in dairy cows. Previous studies confirmed asymmetry in the function of reproductive system in dairy cows due to differences in ovarian activity and probably because of physiological differences in the tubular parts of reproductive organs which result from the side of the previous gestation. There are many discrepancies about positive or negative effects of corpus luteum and unequal activity of sides of the reproductive system. Therefore, the aim of this study was to investigate the impacts of CL and side of ovaries (Right vs. Left) on histological characteristics of different types of preantral follicles after bovine ovarian tissue vitrification.

**Material and methods:** Ovaries ( $n=10$ ) were collected from five adult cross-bred cows at a local abattoir. Ovaries were categorized on the basis of the presence or absence of a CL and the side of ovaries and divided into five pools: 1/CL+ (with CL) group, 2/CL -(without CL) group, 3/right ovaries group, 4/left ovaries group and 5/C control group (ovaries which were not selected toward the presence or absence of CL or side of ovaries). From each bovine ovarian pair, fragments were recovered and immediately fixed for analysis (fresh control) or submitted to vitrification [CL (-); CL(+); Right and Left group), either followed by *in vitro* culture for 1 or 5 days. Samples were fixed in Millonig's for 2 h, dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene, embedded in paraffin wax, and serially sectioned into 7  $\mu$ m sections. Every fifth section was mounted on a glass slide, stained with Periodic acid-Schiff (PAS), and evaluated using a light microscope at magnification of 400 $\times$ . All procedures for exposure to cryoprotectant agents (CPAs) and vitrification were performed by using the new Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). For the *in vitro* culture, the cortex tissue samples were transferred to 24-well

culture dishes containing 1 mL of the culture medium per well. The culture was performed at 38.5 °C in 5 % CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. The ovarian tissue was histologically evaluated before and after culture. The quality of the preantral follicles was classified according to the parameters previously described. Briefly, morphologically normal follicles contained an intact oocyte and granulosa cells, whereas degenerated follicles contained an oocyte with a pyknotic nucleus, ooplasm shrinkage and/or granulosa cell layers that had disorganized and detached from the basement membrane. In each treatment, a total of 150 preantral follicles (30 per animal) were examined, which were classified as follicles without an antrum and with an oocyte, surrounded by one layer of flattened (primordial follicle), flattened and cuboidal (transitional follicle) or cuboidal granulosa cells (primary follicle), or with an oocyte surrounded by two or more layers of cuboidal granulosa cells (secondary follicle). In this study, data that were not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test), were submitted to logarithmic transformation. Comparisons of means (morphologically normal follicles) were analyzed by Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney test, when appropriate. All statistical tests were performed using Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., USA). Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

**Results and discussion:** Results of this experiment showed that although, absence of a CL (CL-) resulted in a greater percentage of normal follicles for transitional (cultured samples on day 1) and primary follicles (post-thawed samples) when compared to that of ovaries bearing a CL (CL+), there was an exception. These results indicate that CL (+) samples also resulted in a greater percentage of normal primordial follicles (cultured samples on day 1) than that of CL (-) samples (57.6% versus 39/3%, respectively). However, for all classes of preantral follicles during all stages (warming, day 1 or day 5), there were no significant differences in the percentages of normal follicles among Right and Left samples ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** It seems that follicles which are at beginning of their development (Primordial follicles) were not affected by presence of a CL as much as follicles at more advanced stages of development (transitional & primary). According to the results of this study, it can be concluded that, many factors such as presence or absence of a CL, types of preantral follicle classes, stages after vitrification (warming and days after culture) and interactions between these factors could influence the likelihood of a successful vitrification outcome.

**Keywords:** Corpus luteum, *In vitro* culture, Primary follicles, Transitional follicles, Vitrification