جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله تحقیقی

بررسی بقای فولیکولهای پرآنترال تخمدان منجمد شده شیشه‌ای موش نابالغ بوسیله کرایوتاپ

حسین ایمانی .Ph.D*، **، سمیه صفری ممزوجی.M.Sc*، ***، ملک سلیمانی مهرانجانی.Ph.D *** ، محمد حسین آبنوسی.Ph.D ***
مجتبی رضازاده ولوجردی.Ph.D *،****، پویک افتخاری یزدی.Ph.D *، عبدالحسین شاهوردی.Ph.D *
* پژوهشکده رویان،گروه جنین شناسی
** گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیةا...
*** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک
**** گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: بهمن‌ماه ۸۶ ، تاریخ پذیرش: فروردین‌ماه ۸۷

چکیده

هدف: مطالعه تاثیر انجماد شیشه ای بافت تخمدان بوسیله کرایوتاپ، بر بقایی فولیکولهای پرآنترال است.

مواد وروشها: تخمدان موشهای ۱٤روزه نژاد NMRI، به روش استریل جدا شده و در سه گروه انجمادی، سمی شده و کنترل دسته بندی شدند. در گروه انجماد شیشه ای، تخمدانها با استفاده از کرایوتاپ منجمد شدند در حالی که درگروه سمی شده ه تخمدانها پروسه انجماد و ذوب را بدون قرار گرفتن در نیتروژن مایع و انجماد طی کردند و در گروه کنترل تخمدانها پروسه انجمادی و انجماد را طی نکردند. تخمدانها دردو گروه انجمادی و سمی شده، طی دو مرحله درون محلول انجمادی حاوی HEPES-buffering TCM199 به همراه اتیلن گلیکول (EG: Ethylen Glycol)، دی متیل سولفوکسید (DMSO) و آلبومین سرم انسانی (HSA) قرار داده شدند. سپس در گروه تست سمیت تخمدانها (توکسی سیتی)، تخمدانها بلافاصله پروسه ذوب را طی کردند و در گروه انجمادی، تخمدانها روی کرایوتاپ قرار داده شده و به درون نیتروژن مایع منتقل شدند. تخمدانهای منجمد شده پس از سه هفته درمحلول ذوب شامل HEPES-buffering TCM199 و ساکاروز HSA، ذوب شدند.ابتدا بررسی بافت شناسی تخمدانها دز هر سه گروه انجام شد و در مرحله بعد فولیکولهای پرآنترال تخمدانهای هر سه گروه با تشریح مکانیکی جدا شده و فولیکولها با مورفولوژی مناسب انتخاب و به مدت چهارروز کشت داده شدند تا میزان بقایی فولیکولها در این سه گروه بررسی شود. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز شدند.

یافته‌ها: بررسی بافت شناسی تخمدانها نشان داد فولیکولهای پریموردیال و در حال رشد دزگروههای انجمادی توکسی سیتی مشابه گروه کنترل بودند. میزان بقایی فولیکولها در گروه توکسی سیتی (٪۹۷/٤) نسبت به گروه کنترل(٪۹۸/۷) تفاوت معنی داری نداشت در حالی که میزان بقا در این دو گروه نسبت به گروه انجماد شیشه ای (٪۹۲/۷) افزایش معناداری داشت ($P<0.05$). .همچنین افزایش در قطرفولیکولها پس از گذشت چهار روز در گروه انجمادی نسبت به دو گروه سمی شده وکنترل، کاهش معنی داری داشت ($P<0.05$).

آدرس مکاتبه: تهران-صندوق پستی ٤٦٤٤-۱۹۳۹۵ پژوهشکده رویان،گروه جنین شناسی
Email:Eimanih@royaninstitute.org

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نتیجه‌گیری: علیرغم معنی دار بودن تفاوت در بقا و قطر فولیکولهای پرآنترال در گروه انجمادی نسبت به کنترل، فولیکولهای پرآنترال حاصل از انجماد شیشه‌ای تخمدان، از بقای بالایی برخوردار بوده و به نظر می‌رسد استفاده از این روش برای انجماد شیشه‌ای تخمدان مناسب و موفقیت آمیز باشد.

کلید واژه‌ها: انجماد شیشه‌ای، بافت تخمدان، کشت آزمایشگاهی، فولیکول پرآنترال، کرایوتاپ

مقدمه

پیشرفتها درتشخیص ودرمان سرطانها در دوران کودکی، نوجوانی و بلوغ تا حد زیادی منجر به افزایش جمعیت بازمانده‌های نوجوان و بالغ، از بدخیمی‌های دوران کودکی می شود. چنانچه بر اساس آمار موجود یک نفر از هر ۲۵۰ نفرجمعیت زنان بالغ دارای چنین وضعیتی هستند و به دلیل نوع درمان و القای نقص تخمدانی و نابودی ذخیره تخمدانی تا پایان عمر از مشکل ناباروری رنج خواهند برد [۱]. از آنجایی که تخمدانها منابع عظیمی از تخمکهاهستند انجماد بافت تخمدان قبل از شروع درمان برای خانمهای جوانی که تحت شیمی درمانی وپرتودرمانی قرار گرفته یا مبتلا به بیماریهای ژنتیکی و خاصی هستند مفید خواهد بود، به خصوص دردختران نابالغ، انجماد تخمدان تنها گزینه برای ذخیره و حفظ تخمک و در نتیجه حفظ باروری است [۲]. امروزه برای حفظ باروری، پیشرفتهای قابل توجهی در روشهای انجمادی جنین صورت گرفته است اما تاکنون نتیجه رضایت بخشی از انجماد بافت تخمدان به دست نیامده است.[۳]. تخمدان در مقایسه با اووسیت یا جنین به عنوان یک واحد منفرد، ساختار پیچیده ای دارد و متشکل از چندین نوع مختلف سلولی از جمله سلولهای استرومایی و فولیکولها است که خود فولیکولها نیز حاوی تخمک، سلولهای گرانولوزا وسلولهای تکا است. از آن جا که انواع مختلف سلولها نیازهای متفاوتی برای بقای بهینه (Optimum) دارند انجمادبافت تخمدان سخت تر است [۲ و٤].برای کسب تخمکهای بالغ از بافت تخمدان منجمد و ذوب شده، دو روش وجود دارد: اولی پیوند و دیگری جداسازی و کشت آزمایشگاهی فولیکولهای تخمدانی است که در هر دو روش، به دست آوردن تخمکهای بقا یافته به تعداد زیاد از اهمیت زیادی برخوردار است [۳]. دو روش برای انجماد وجود دارد:یکی انجماد آهسته و دیگری روش انجمادی سریع به نام انجماد شیشه ای. انجماد تخمدان اغلبً با استفاده از انجماد آهسته انجام می شود. این روش به دلیل استفاده از ماشینهای کنترل کننده انجماد، یک روش گران قیمت است و همچنین می تواند به دلیل تشکیل کریستال یخ داخل سلولی موجب آسیب شود [۵]. در مقابل، انجماد شیشه‌ای یک روش ساده و ارزان قیمت است که با استفاده ازغلظتهای بالای ضد یخ به صورت جامد شیشه‌ای و شفاف، بدون تشکیل کریستال یخ قابل انجام است [٦ و۷]. در برخی مطالعات، انجماد شیشه ای موفق در تخمدان موش و انسان گزارش شده است [۸ و۹]. همچنین تولد نوزاد پس ازکشت آزمایشگاهی کمپلکس اووسیت- سلولهای گرانولوزا (OGC: Oocyte Cumulus Complex) حاصل از فولیکولهای پرآنترال تخمدان منجمد شده شیشه‌ای در موش گزارش شده است [۳].

در انجماد شیشه‌ای برای افزایش سرعت انجماد و ذوب نمونه، کم بودن حجم محلولهای انجمادی در اطراف نمونه منجمد شونده ضروری است. به منظور کاهش حجم

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

محلولهای انجمادی استفاده شده، تا کنون استراتژیهای مختلفی از جمله استفاده از گریدهای میکروسکوپ الکترونی [۱۰]، میکروقطره‌ها(micro droplet) [۱۱و۱۲]، نی‌های پلاستیکی کشیده شده باز(OPS) [۱۳]، شیشه‌های کم قطر و موی سان (Glass capillaries) [۱٤]، استفاده ازسطح سرد شده برای انجماد شیشه‌ای(SSV) [۱۵] وکرایولوپ [۱٦] پیشنهاد شده است.

درهر یک ازاین روشها میزان موفقیتهای مختلفی گزارش شده است. در واقع کلید موفقیت این روشها کاهش میزان محلولهای انجمادی در اطراف نمونه است که به نمونه اجازه می‌دهد به سرعت ازمنطقه دمایی حیاتی در حضور عوامل ضدیخ عبور کند [۱۷و۱۸]. وسیله دیگری که برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ توسط کوایاما (Kuwayama) برای انجماد جنین و اووسیت به کار برده شد کرایوتاپ نام داشت و تقریباً آخرین روش انجمادی با استفاده از حداقل حجم محلول انجمادی است [٦]. در مقالات متعددی تاثیر این وسیله جدید انجمادی در انجماد جنین و اووسیت بررسی شده که درصد موفقیت آن نسبت به سایر روشها بسیار بالا بوده است. به طوری که بالاترین تعداد تولد فرزند را پس از انجماد شیشه‌ای جنین و اووسیت انسان در تمام جهان به دنبال داشته است [٦].

در این مطالعه، هدف انجماد شیشه‌ای تخمدانهای موش نابالغ توسط کرایوتاپ و بررسی اثر این روش انجمادی بر مورفولوژی و بقای فولیکولهای پرآنترال است. به این منظور تخمدانها با کمک کرایوتاپ و با استفاده از ساکارز وترکیبی از ضدیخهای EG وDMSO منجمد شده و پس از ذوب کردن، فولیکولهای پرآنترال جدا شده از تخمدان به مدت ٤ روز کشت داده شدند. همچنین در این مطالعه سمیت ضدیخهای استفاده شده نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه تخمدانها: در این مطالعه از موشهای ١٤روزه نژادNMRI تهیه شده از انستیتو پاستور تهران (ایران) استفاده شد. موشها با روش قطع نخاع کشته شده و تخمدانهای آنها در شرایط استریل خارج و پس از جدا کردن بافتهای اضافی اطراف آنها در سه گروه انجمادی، تست سمیت و کنترل دسته بندی شدند.

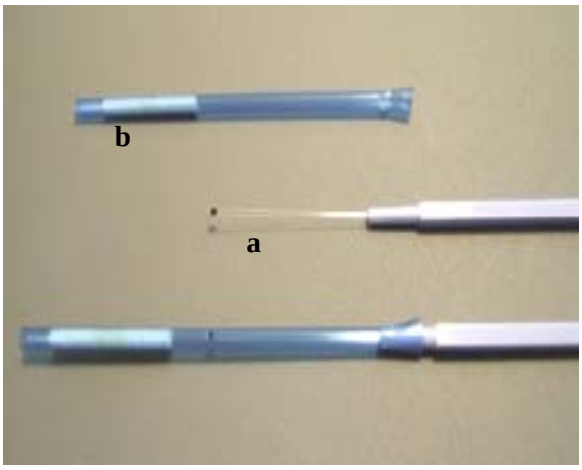
روش انجماد شیشه‌ای

تخمدانها در یک محلول تعادل (پیش تیمار یا متعادل کننده) متشکل از محیط کشت HEPES-buffering TCM199 حاوی EG ۷/۵ درصد، DMSO ۷/۵ درصد و HAS ۲۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و سپس به محلول vitrification حاوی HEPES-buffering TCM199 به همراه ۱۵DMSO درصد، EG ۱۵درصد، ساکارز ۰/۵ مولار و HSA ۲۰درصد منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد در این محلول باقی ماندند. هر جفت از تخمدانها با یک حجم بسیار کم از محلول انجمادی در اطرافشان، روی صفحه پلی استری یک کرایوتاپ قرار گرفتند (شکل۱). این صفحات به سرعت در نیتروژن مایع فرو برده شده و پوشش سرآنها در نیتروژن گذاشته شد و سپس به تانک نیتروژن منتقل و به مدت سه هفته ذخیره شدند.

روش ذوب کردن

به دنبال برداشتن نمونه از نیتروژن مایع، صفحات پلی استری کرایوتاپ مستقیماً وارد محلول ذوب متشکل از محیط کشت HEPES-buffering TCM199 حاوی ساکارز ۱ مولار وHSA ۲۰ درصد شده و تخمدانها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در این محلول باقی ماندند. سپس تخمدانها به محیط کشت αMEMحاوی FBS۱۰درصد و ترکیب آنتی بیوتیکی(۱۰۰IU/ml

پنـــی ســـیلین، ۱۰۰ میکروگـــرم در میلـــی لیتـــر(۱۰۰μg/ml)استرپتومایسین و۰/۲۵ میکروگرم در میلـی لیتـر (۰/۲۵ μg/ml) آمفوتریسینB) منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند.



شکل ۱. کرایوتاپ استفاده شده درانجمادتخمدان موش

a) صفحه پلی استری که نمونه روی آن قرارمی گیرد.
b) پوشش پوشاننده صفحه پلی استری

تست سمیت (توکسی سیتی)

تخمدانها پروسه انجماد و ذوب را طبق پروتکل گفته شـده و بدون قرارگیری در نیتروژن مایع سپری می کنند.

مطالعات بافت شناسی

تخمدانها، ازهر سه گروه به مدت ۲٤ سـاعت در تثبیـت کننـده بوئن تثبیت و پس از آماده سازی در قالبهـای پـارافین قـرار داده شده و به ضخامت ۵ میکرومتر برش زده شـدند. برشـها پـس از قرار گیری روی لام با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند.

جداســـازی مکـــانیکی و انتخـــاب فولیکولهـــای پرآنترال به منظور کشت آزمایشگاهی

تخمدانها به قطره‌های ۲۰۰ میکرولیتری محیطαMEM حاوی ۱۰FBSدر صد و ترکیب آنتی بیـوتیکی(۱۰۰IU پنـی سـیلین، ۱۰۰ میکروگـــرم در میلـــی لیتـــر(۱۰۰μg/ml استرپتومایـــسین و۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتـر(۰/۲۵ μg/ml) آمفوتریـسینB) انتقال یافتند. فولیکولهای پرآنترال به وسیله تـشریح مکـانیکی ازتخمدانها رها و برای کـشت انتخـاب شـدند. فولیکولهـایی برای کـشت انتخـاب شـدند کـه پـس از جداسـازی سـاختار فولیکولی سالم و کروی خود را حفظ کرده و دارای دو تا سه لایه سلولهای گرانولوزا و قطر۱۰۰– ۱۳۰میکرومتـر باشـند در این فولیکولها، اووسیتها گرد و قابل مشاهده بـود و در مرکـز فولیکول قرار گرفته داشت.

کشت آزمایشگاهی فولیکولهای پرآنترال

فولیکولهای پرآنترال جدا شده به طور منفرد در محیط کـشت αMEMحـاوی۱۰۰ mIU/ml ,hFSH ITS(10μg/ml انـسولین، ۵/۵μg/ml ترنسفرین ٦/٧ng/mlسلنیوم) و ۵ FBS درصدکـشت داده شدند.۲۰ فولیکول به طـور منفـرد در یـک پتـری دیـش کشت حاوی ۲۰ قطره ۱۰ میکرولیتری پوشیده شده با ۵ میلـی لیتر روغن مینرال، در داخـل انکوبـاتور بـا دمـای ۳۷ درجـه سانتی گراد و CO2 ۵٪ قرار گرفتند. در دومین روز کشت، ۱۰ میکرولیتر محیط کشت تازه به هر قطره اضافه شد. در اولین و چهارمین روز کشت، قطر فولیکولهـا بـدون در نظـر گـرفتن سلولهای تکا اندازه گیری شدند. ایـن سـنجش قطـر بـا یـک میکرومتر چشمی در میکروسکوپ معکوس و با اندازه گیـری دو قطر عمود بر هم انجام شد.

آنالیز آماری

درصد فولیکولهای پرآنترال بقای یافته پـس از چهـار روز بـه وسیله Z-test محاسبه و از نظر آماری معنی دار در نظر گرفتـه شد($p<0.05$). مقایسه قطر فولیکولهای پرآنترال بقا یافتـه بـین

هر سه گروه با استفاده از Duncan test Multiple rangeانجام و از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد ($p<0.05$).

یافته‌ها

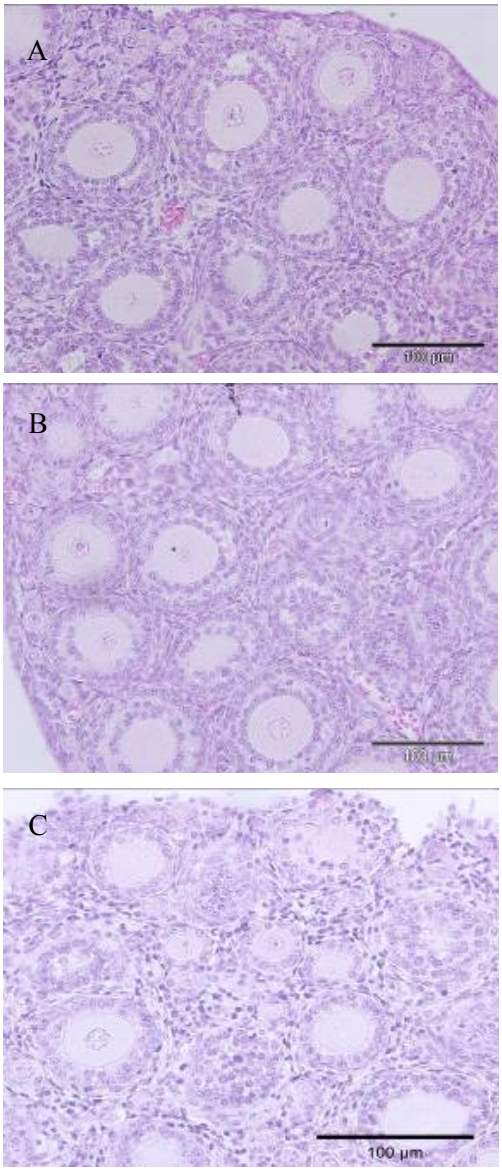
بررسی بافت شناسی تخمدانها

برای بررسی ساختار فولیکولهای پریموردیال و در حال رشد در سه گروه مورد آزمایش، ارزیابی بافت شناسی انجام شد. فولیکولهای پریموردیال و در حال رشد در برشهای تخمدانی گروه اتجمادی و سمی شده، شباهت مورفولوژیکی با برشهای گروه کنترل داشتند و هیچ تفاوت چشمگیری دراین برشها مشاهده نشد(شکل۲ :C وB، A).

قسمت اعظم فولیکولهای پرآنترال در برشهای گروه انجمادی، دارای تخمکی با سیتوپلاسم یکنواخت و ژرمینال وزیکول مرکزی بود که این وضعیت در گروه سمی شده وکنترل نیز دیده می شد. سازماندهی خوب مشاهده شده در ارتباطات سلول- سلول بین سلولهای گرانولوزای احاطه کننده اووسیت، همچنین اووسیت- سلولهای گرانولوزا، در گروه انجمادی، کاملاً مشابه گروه کنترل بود (شکل۳:A، B وC).

میزان بقا در فولیکولهای پرآنترال

در این مطالعه فولیکولهایی که ساختار طبیعی خود را در محیط کشت حفظ کرده و دارای ارتباط تنگاتنگ بین اووسیت و سلولهای گرانولوزای احاطه کننده شان بودند به عنوان فولیکولهای زنده بررسی شدند. اما اگر فولیکولها ساختار سه بعدی و کروی خود را از دست داده و اووسیت خود را رها کرده یا اینکه تیره شدند به عنوان فولیکولهای غیرزنده معرفی شدند. جدول ۱ نشان دهنده میزان بقای فولیکولها در محیط کشت پس از چهار روز است. همان طورکه دیده می شود میزان بقا در گروه سمی شده (٪۹۷/٤) نسبت به گروه کنترل (٪۹۸/۷) تفاوت نداشت. هرچند میزان بقای در گروه انجمادی نسبت به گروه توکسی سیتی وکنترل کاهش معنی داری داشت اما از میزان بالایی (٪۹۲/۷) برخوردار بود($p<0.05$).



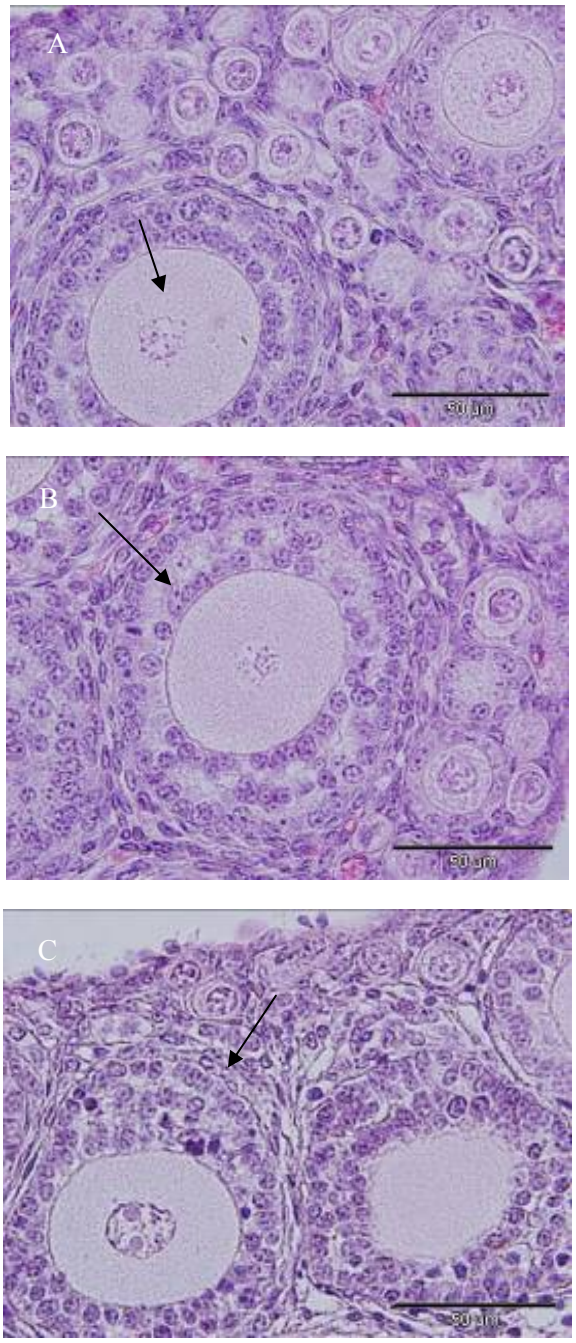
شکل۲. بررسی اثرسمیت ضدیخهاوانجمادوذوب، برتخمدان‌های موش، بار: ۱۰۰ میکرومتر، رنگ آمیزی: H&E.

A) برش ازتخمدان درگروه کنترل

B) برش ازتخمدان درگروه تست سمیت

C) برش ازتخمدان درگروه انجمادی

هیچ تفاوتی در نمای کلی بافت و انواع فولیکولها در این بررسی دیده نشد.



شکل۳. مقایسه فولیکولهای پریموردیال و پرآنترال در برشهای تخمدانی موش در سه گروه آزمایشی، بار: ۵۰ میکرومتر رنگ‌آمیزی: H&E

A) برش ازتخمدان در گروه کنترل

B) برش ازتخمدان در گروه تست سمیت

C) برش ازتخمدان در گروه انجمادی

هیچ تفاوت چشمگیری در فولیکولهای پریموردیالوپرآنترال بین سه برش فوق دیده نشد.

(فلشها نشان دهنده فولیکولهای پرآنترال هستند.)

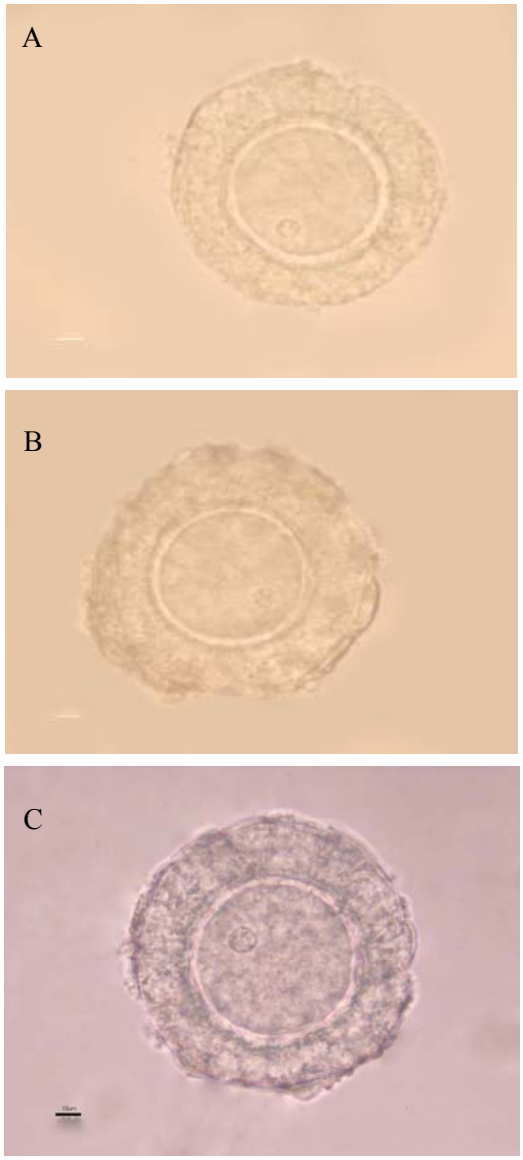
جدول۱. مقایسه میزان بقایی فولیکولهای پرآنترال حاصل از تخمدانها درگروههای مورد مطالعه پس از چهار روز کشت

فولیکولها	تعداد فولیکولها	
	کشت داده شده	بقای یافته
کنترل	٤٦٦	٤٦٠ (٩٨/٧%) a
سمی شده	٣٥٠	٣٤٤(٩٧/٤ %)b
انجمادی	٣٥٥	٣٢٩(٩٢/٧%)c

عدم وجود اختلاف معنی داربین a و b (p>0.05)

اختلاف معنی دار بین b و c (p<0.05)

اختلاف معنی دار بین a و c (p<0.0001)



شکل٤. فولیکولهای پرآنترال جدا شده از A) تخمدان در گروه کنترل، B) تخمدان در گروه سمی شده، C) تخمدان در گروه انجمادی.

میزان رشد فولیکولی

میانگین قطر فولیکولها درگروههای انجمادی، سمی شده وکنترل درروزصفربه ترتیب ۹/۱±۱۱۱/۱، ۱۲±۱۱۳و ۹/۶±۱۲۰/۲) و در روز چهارم ۱۹/۶±۱۲۷/۸، ۲۶/۵±۱۴۵/۹ و ۳۰±۱۵۶/۳ میکرومتر بود. جدول۲ نشان دهنده این حقیقت است که رشد فولیکولی در گروه توکسی سیتی و کنترل تفاوت معناداری داشت. در حالی که میانگین افزایش میزان قطر در گروه انجمادی۱۶/۶۳ میکرومتر بود که نسبت به گروه کنترل و سمی شده اختلاف معنی داری داشت ($p<0.05$).

جدول۲. مقایسه رشد فولیکولی پس از چهار روز، بین گروههای مورد مطالعه

گروهها	میانگین افزایش قطر	گروههایDuncan
کنترل	۳۶/۰۹	A
سمی شده	۳۲/۹۵	A
انجمادی	۱۶/۶۳	B

Duncan's Multiple Range Test

میانگین‌ها با حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروهها است

بحث

در زنانی که مبتلا به بیماریهای بدخیم لگنی، خارج لگنی، سیستمیک یا بیماریهای غیر بدخیم هستند و مجبورند تحت درمانهایی قرار گیرند که احتمالاً باعث آسیب باروری آنها در آینده شود انجماد بافت تخمدان باید پیشنهاد شود [۱]. انجماد شیشه‌ای مزایای با اهمیتی نسبت به انجماد متداول (انجماد آهسته) بافت دارد. انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان یک روش انجمادی نسبتاًجدید است که نیاز به استفاده از تجهیزات گران قیمت ندارد و بافت به همراه سلولها برای مدت کوتاهی در معرض غلظت بالای ضد یخها قرار می گیرد. با این روش تشکیل ساختارهای شبه کریستالی آمورف نسبت به کریستالهای واقعی [۲] شاید به دلیل اسمولاریته بالای محلولهای ضدیخ القا می شود. بنابراین طی انجماد شیشه ای، سرد کردن آنقدر سریع است که آسیبهای ساختاری در نتیجه تشکیل کریستال یخ اتفاق نیفتاده و ساختار جامد شبه شیشه‌ای به جای کریستال تشکیل می شود [۱۹]. در روشهای انجماد آهسته غلظت ضدیخها به ۱ یا ۱/۵ مولار محدود شده است و بنابراین سمیت ضدیخها نیز پایین است. در حالی که همان طور که گفته شد، غلظتهای استفاده شده برای انجماد شیشه‌ای بسیار بالاتر است و گاهی اوقات می تواند به بالاتر از ۸ مولار برسد [۲۰]. بنابراین ضرورت استفاده از غلظتهای بالای ضدیخها به دلیل ارتباط قوی بین غلظت ضدیخها و سرعت انجماد و ذوب طی پروسه انجماد شیشه‌ای است [۲۰] که می تواند به دلیل آثار سمی و اسموتیک این ضدیخها، موجب آسیب سلولی شود [۲۱].

بنابراین انتخاب ضدیخها با سمیت کم، برای انجماد شیشه‌ای ضروری است. درحال حاضر DMSO وEG معمولترین ضدیخهای نفوذپذیر هستند. DMSO نفوذپذیری بالاتری نسبت بهEG داشته وسمیت آن نیز بیشتراست [۲۲].

Rodrigues پس ازبررسی آثار گلیسرول، EG، DMSO و پروپیلن گلیکول بر مورفولوژی فولیکولهای پرآنترال نتیجه گرفت که EG وDMSO بهترین ضدیخها هستند [۲۳و۲۴]. به دنبال نتایج به دست آمده توسط Hasegawa [۳] که از ترکیب ۱۵DMSO درصد، EG ۱۵ درصد و ساکارز ۰/۵ مولاربه عنوان محلولهای انجمادی در انجماد تخمدان موش استفاده کرده بود؛ ما نیز با توجه به داده‌های آماری به دست آمده از کشت کوتاه مدت فولیکولها و بررسی برشهای بافتی نشان دادیم که استفاده از این ترکیب ضدیخی در انجماد شیشه‌ای تخمدان، اثرهای منفی بر مورفولوژی، بقا و رشد فولیکولهای پرآنترال موش ندارد.

سانتوس (Santos) نشان داد که وضعیت بقای فولیکولهای پرآنترال منجمد شده پس از کشت آزمایشگاهی نسبت به زمان ذوب دقیق تر تعیین می شود. بنا براین کشت

آزمایشگاهی فولیکولهای پرآنترال یک ابزار مهم برای ارزیابی موفقیت انجماد بافت تخمدان به نظر می رسد [۲۵]. در فولیکولهای پرآنترال که در معرض پروسه انجماد و ذوب قرار گرفته اند، آبگیری، و آبدهی طی برداشت ضدیخها می تواند موجب تغییراتی در مورفولوژی و بقای فولیکولها شود. برای بازگشت مورفولوژی طبیعی آنها و مشاهده اثرهای انجماد، به تعادل رسیدن در یک محیط گرم ضروری است که این مهم به وسیله کشت آزمایشگاهی کوتاه مدت به دست می آید. پروسه دوباره گرم کردن بافت منجمد شده در یک محیط غنی از مواد غذایی به سلولهای فولیکولی اجازه می دهد تا فعالیت متابولیکی و حجم طبیعی سلولی و ارتباطات سلول – سلول رادوباره به دست آورند [۲۶]. همان طور که گفته شد برای بررسی میزان موفقیت پروسه انجماد و ذوب و بررسی اینکه فولیکولهای جدا شده از تخمدانهای منجمد وذوب شده قادر به بقا و ادامه رشد خواهند بود یا خیر، این فولیکولها به محیط کشت منتقل شدند. فولیکولهای پرآنترال حاصل از بافت تخمدان منجمد شده به وسیله کرایوتاپ در هنگام تشریح، مورفولوژی خوب و کاملاً شبیه به فولیکولهای بافت تخمدانی کنترل داشتند وتوانستند مورفولوژی خوب خود را پس از چهار روز نیزحفظ کنند. بنابراین این فولیکولها تا حد زیادی توانسته اند خود را به شرایط طبیعی قبل از کشت برگردانند که میزان بقای بالای این فولیکولها (۹۲/۷ درصد) نیز بیانگر این مطلب است. همچنین این فولیکولها رشد را مانند فولیکولهای گروه کنترل آغاز کردند اما رشد آنها کاهش معنی داری داشت. نیوتون رشد فولیکولهای پرآنترال موشی جدا شده از بافت تخمدانی منجمد وذوب شده را مورد بررسی قرار داد و پیشنهاد کرد که میزان رشد پایین فولیکولهای منجمد وذوب شده ممکن است نتیجه تکثیر با تاخیر، یا شروع مرگ سلولهای گرانولوزا در پاسخ به پروسه انجماد و ذوب باشد [۲۷]. بنابراین اطلاعات به دست آمده از این مطالعه نشان دهنده این واقعیت است که استفاده از کرایوتاپ، یک روش موثر درانجماد شیشه‌ای بافت تخمدان موش می باشد.این روش برای اولین بار برای انجماد شیشه‌ای اووسیت وجنین استفاده شد و اخیراً با اندکی تغییرات برای انجماد بافت تخمدان استفاده شده است [۳ و۲۸].

در مطالعه حاضر از روش‌هاسگاوا(Hasegawa) برای انجماد بافت تخمدان استفاده شد؛ به این ترتیب که پس از قرار گرفتن دو مرحله‌ای نمونه درمحلولهای انجمادی، بافت در یک حجم کمی از محلولهای انجمادی که سطحش را پوشانده است، روی کرایوتاپ قرار گرفته و مستقیماً وارد نیتروژن مایع می شود که این امر باعث سرد شدن نمونه با سرعت فوق العاده زیاد می شود. همان طور که می دانیم افزایش سرعت انجماد (که با کاهش محلولهای انجمادی اطراف نمونه و تماس مستقیم نمونه با نیتروژن مایع ارتباط مستقیم دارد) باعث القای انجماد شیشه‌ای می شود. میانگین سرعت انجماد و ذوب نمونه به روش کرایوتاپ به ترتیب ۲۳/۰۰۰°C/min و ۴۲/۰۰۰ °C/min است [۲۱]. با توجه به تمام مدارک ذکر شده در این بررسی، کرایوتاپ باعث القای مناسب انجماد شیشه‌ای در بافت تخمدان و به دنبال آن میزان بقای بالای فولیکولهای پرآنترال می شود و شاید بتوان در آینده از این روش برای انجماد نمونه‌های انسانی نیز استفاده کرد.

References

1. **Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonckt A, Demylle D, Dolmans MM**. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review, Hum Reprod 2006 12: 519-35.
2. **Hovatta O**. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue, Reprod Biomed Online

2005; 10: 729-34.

3. **Hasegawa A, Mochida N, Ogasawara T, Koyama K**. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. Fertil Steril 2006 86: 1182-1192.
4. **Segino M, Ikeda M, Hirahara F, Sato K**. In vitro follicular development of cryopreserved mouse ovarian tissue. Reproduction 2005; 130: 187-92.
5. **Santos RR, Tharasanit T, Van Haeften T, Figueiredo JR, Silva JR, Van den Hurk R**. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. Cell Tissue Res 2007; 327: 167-76.
6. **Kuwayama M.** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The cryotop method. Theriogenology 2007; 67: 73-80.
7. **Yeaman RR, Wolf DP, Lee DM**. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. Fertil Steril 2005; 83: 1248-5.
8. **Salehnia M, Abbasian Moghadam E, Rezazadeh Velojerdi M.** Ultra structure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. Fertil Steril 2002; 78: 644-5.
9. **Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, Nawroth F**. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2003; 108: 186-93.
10. **Martino A, Pollard JV, Leibo SP**, Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. Mol Reprod Dev 1996; 45: 503-12.
11. **Arav A, Sheh D, Mattioli M.** Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. J Reprod Fertil 1993; 99: 353–8.
12. **Arav A, Rubinsky B, Fletcher G, Seren E.** Cryogenic protection of oocyte with antifreeze proteins. Mol Reprod Dev 1993 36:488–93.
13. **Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H.** Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Cryo-letters 1997; 18: 191-5.
14. **Hochi S, Fujimoto T, Braun J, Oguri N**, Pregnancy following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. Theriogenology 1994; 42: 483-8.
15. **Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X**. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, and Somatic cell nuclear transfer. Biol Reprod 2000; 63: 513-8.
16. **Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK**. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. Fertil Steril 1999 72: 1073-8.
17. **Vajta G**, Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim Reprod Sci 2000; 60: 357-64.
18. **Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H**. New trend in gamete cryopreservation. Mol Cell Endocrinol 2002 187: 77-81.
19. **Stachecki JJ, Cohen J**. An overview of oocyte cryopreservation. Reprod Biomed Online 2004; 9:152-63.
20. **Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T**. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. J Reprod Dev 2004; 50: 685-96.
21. **Kuwayama M, Vajta G, Ieda1 S, Kato O.** Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. Reprod Biomed Online 2005; 11: 608-14.
22. **Shaw J, Oranratnachai A, Trounson A,** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue, Theriogenology 2000; 53: 59-72.
23. **Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, lucci CM, et al.** Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. Theriogenology

2004; 61: 1009-24.

24. **Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, lucci CM, et al.** Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. Anim Reprod Sci 2004; 84: 211-27.
25. **Santos RR, Tharasanit T, Figueiredo JR, Van Haeften T, Van Den Hurk R.** Improved preservation of caprine preantral follicles viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. Cell Tissue Res 2006; 325: 523-31.
26. **Paynter SJ, Cooper A, Fuller BJ, Shaw RW.** Cryopreservation of bovine ovarian tissue: strutural normality of follicles after thawing and culture in vitro. Cryobiology 1999; 38: 301-9.
27. **Newton H, Illingworth P.** In vitro growth of murine preantral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. Hum Reprod 2001; 16: 423-9.
28. **Kagawa N, Kuwayama M, Nakata K, Vajta G, Silber S, Manabe N, et al.** Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved pre- antral follicles of adult mice, Reprod Biomed Online 2007; 14: 693-9.