

مقایسه انجماد شیشه ای تخمدان موش نابالغ با استفاده از دو وسیله نی و کرایولاک

شبنم عبدی¹، مژده صالح نیا²، سامان حسینخانی³

1. دانشجوی دکتری تخصصی علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

2. استاد گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (مؤلف مسؤل) تلفن ثابت: 021-828803562/salehnm@modares.ac.ir

3. دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

مقدمه: انجماد شیشه ای بافت تخمدان روشی سودمند برای حفظ باروری است و تلاش های زیادی برای بهبود شرایط انجمادی صورت گرفته است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات دو روش انجماد شیشه ای با استفاده از دو وسیله نی و کرایولاک بر مورفولوژی بافت تخمدان موش نابالغ بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه که از نوع تجربی بود، از موش ماده ی سوری 7 روزه، نژاد NMRI استفاده شد. تخمدان ها از بدن خارج شدند و به گروه های غیر انجمادی، انجماد شیشه ای با نی، انجماد شیشه ای با کرایولاک و تست سمیت تقسیم شدند. در گروه انجماد شیشه ای، تخمدان ها در ترکیبی از 40% اتیلن گلیکول، 30% فایکول 70 (W/V)، ساکارز نیم مول به مدت 5 دقیقه آبگیری شدند. سپس در نی انجمادی و کرایولاک قرار داده شدند و به درون نیتروژن مایع منتقل شدند و به مدت یک هفته نگهداری شدند. در حالیکه در گروه تست سمیت برای ارزیابی سمیت محلول انجمادی تخمدان ها در محلول های انجماد (EFS40) و ذوب قرار گرفتند و مرحله غوطه ور سازی در ازت مایع حذف شد. سپس مورفولوژی فولیکول های تخمدان با میکروسکوپ نوری و الکترونی بررسی شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد اختلاف معناداری بین درصد فولیکول های بدوی و اولیه با مورفولوژی طبیعی در بین گروه ها وجود نداشت. اما درصد فولیکول پره آنترال با مورفولوژی طبیعی در روش انجمادی با نی انجمادی به طور معنادار کمتر از دو گروه دیگر مورد مطالعه بود. در بررسی های فراساختاری علایمی از دژنره شدن و چروکیدگی هسته سلول های گرانولوزا و تخمک در تعدادی از فولیکول ها پره آنترال در گروه انجمادی با روش نی مشاهده شد.

نتیجه گیری: انجماد شیشه ای بافت تخمدان موش نابالغ با استفاده از کرایولاک در مقایسه با نی می تواند مورفولوژی طبیعی بافت تخمدان را به خوبی حفظ کند و روش مناسبی برای حفظ تخمدان باشد.

کلمات کلیدی: انجماد شیشه ای، نی انجمادی، کرایولاک، بافت تخمدان

وصول مقاله: 92/2/31 اصلاحیه نهایی: 92/12/12 پذیرش: 93/3/7

مقدمه

کمیاب جانوران مورد توجه قرار گرفته است (2 و 1). به همین علت این تکنیک امروزه توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. در تکنیک انجماد شیشه ای از غلظت بالای ضد یخ استفاده می شود در نتیجه بدون تشکیل کریستال های یخ، بافت مورد نظر منجمد می شود و این حالت به عنوان شیشه ای شدن شناخته شده است (3). انجماد

از آنجایی که تخمدانها منابع عظیمی از تخمکها هستند، امروزه انجماد شیشه ای بافت تخمدان به عنوان یکی از روش های موثر در حفظ قدرت باروری در بیمارانی که به دلایل مختلفی مانند پرتودرمانی، شیمی درمانی دچار نارسایی زودرس تخمدان می شوند، به خصوص در دختران نابالغ و همچنین برای ذخیره مواد ژنتیکی در گونه های

آنها در مقایسه با تکنیک رایج افزایش یافته بود و آنها نتیجه گرفتند که در روش مستقیم، حداکثر سرعت سرد کردن موجب تسهیل انجماد شیشه‌ای می‌شود و از تشکیل کریستال‌های یخ جلوگیری می‌شود (19). اما بر خلاف آن عابدالهی، در طی مطالعه ای نشان داد که میزان زنده ماندن و مورفولوژی طبیعی فولیکول‌های اولیه و پره‌آنترال حاصل از انجماد شیشه‌ای تخمدان موش با روش کرایوتیوب بالاتر از گروه انجمادی به روش حاصل از پوشش مستقیم (Direct Cover vitrification) بود (21). چوری و همکاران، گزارش کردند که انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان در موش با استفاده از گرید میکروسکوپ الکترونی باعث کاهش رشد فولیکول‌های بدوی می‌شود و میزان نکروز را افزایش می‌دهد (20).

کرایوتاپ برای قرار دادن نمونه در حجم کوچکی طراحی شده است که موجب تماسی مطلوب با نیتروژن مایع می‌شوند و بالاترین سرعت سرد کردن را فراهم می‌کنند و از ایجاد کریستال یخ جلوگیری می‌کند. با این روش سرعت سرد کردن به 23000 درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش می‌یابد در نتیجه از صدمات ناشی از سرما جلوگیری می‌شود. علاوه بر آن با کاهش حجم محلول، سرعت گرم کردن مجدد نیز به 42000 درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش می‌یابد و در نتیجه از تشکیل کریستال‌های یخ حین گرم کردن جلوگیری می‌کند. این روش با موفقیت برای جنین و تخمک استفاده می‌شود. اما این روش در انجماد بافت تخمدان کمتر مورد توجه قرار گرفته است.

با توجه به اینکه در مطالعات مختلف نتایج متفاوتی گزارش شده است و پژوهش‌های محدودی در مورد انجماد بافت تخمدان با روش کرایولاک که نوعی کرایوتاپ است وجود دارد در نتیجه این مطالعه با هدف مقایسه مورفولوژی و فراساختار تخمدان‌های موش نابالغ پس انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایولاک و نی انجمادی صورت گرفت. به این منظور تخمدان‌ها با کمک کرایولاک و نی انجمادی و

شیشه‌ای موفق در تخمدان گونه‌های مختلفی از جمله موش (5و4)، گاو (6)، بز (7) و انسان (8) گزارش شده است. از مهمترین عوامل تعیین کننده حیات فولیکول‌ها بعد از پروسه انجماد و ذوب تخمدان می‌توان سرعت سرد کردن بالا را ذکر کرد (1). بنابراین برای پیدا کردن یک وسیله (carrier) مناسب در جهت افزایش سرعت سرد و گرم کردن و کاهش حجم محلول انجمادی تحقیقات مختلفی انجام شده است (9-12). این وسایل را می‌توان به طور کلی به دو گروه مستقیم (open) و غیر مستقیم (closed) تقسیم کرد، در وسایل غیر مستقیم نمونه در تماس مستقیم با نیتروژن قرار نمی‌گیرد و می‌توان به نی انجمادی، کرایوتیوب و کرایویال اشاره کرد، که به طور معمول برای انجماد بافت تخمدان استفاده می‌شود.

در سال 2003 میگی شیمای و همکاران با استفاده از کرایوتیوب بافت تخمدان موش را منجمد کردند و پس از پیوند بافت تخمدان چند تولد زنده را گزارش کردند (13) و در سال 2002 صالح نیا و همکاران بافت کامل تخمدان موش را با استفاده از کرایویال منجمد کردند و پس از پیوند داخل صفاقی تخمدان فولیکول‌های بدوی و اولیه طبیعی را مشاهده کردند (14). مازوچی و همکاران در سال 2008 با استفاده از تکنیک انجماد شیشه‌ای نی انجمادی در موش 12 روزه نشان دادند که درصد فولیکول‌های طبیعی و فراساختار طبیعی آنها در مقایسه با گروه کنترل هیچ تفاوتی وجود نداشت (15). اما لیونی و همکاران، تخمدان گربه را با استفاده از کرایوتیوب منجمد کردند ولی پس از کشت فولیکول‌ها به این نتیجه رسیدند که درصد رشد فولیکولی در گروه انجمادی کمتر از گروه غیر انجمادی است (16). در روش مستقیم، نمونه در تماس مستقیم با نیتروژن مایع قرار می‌گیرد که می‌توان از کرایوتاپ (17)، گرید میکروسکوپ الکترونی (18) و پوشش مستقیم (Direct cover) (19) نام برد. چن و همکاران، با استفاده از تکنیک انجماد شیشه‌ای پوشش مستقیم نشان دادند که درصد فولیکول‌های طبیعی، حیات فولیکول‌ها و فراساختار طبیعی

ساکارز 0/5 مول و Bovin Serum Albumin (BSA) (Sigma, USA) استفاده شد. در ابتدا محلول بافر فسفات PBI دارای 30% فایکول 70 و ساکارز نیم مول ساکاروز مخلوط شد. سپس با اضافه کردن اتیلن گلیکول غلظت 40% از آن تهیه شد. در هر دو روش های انجمادی، تخمدان ها (در هر گروه 5 تخمدان) در ابتدا با محلول EFS 40 (Ethylene Glycol, Ficoll,) 40% Sucrose) به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق آبیگری شدند (15). محلول های ذوب نیز به ترتیب شامل سوکروز 0/25، 0/5 و 1 مول بود که تخمدان ها به مدت 5 دقیقه در هر کدام قرار گرفتند. محلول آبیگری و ذوب در هر گروه انجمادی یکسان بود و مدت زمان انجماد یک هفته بود.

انجماد و ذوب به روش نی

برای انجماد، از نی های انجمادی فرانسوی 0/25 میلی لیتری (شکل 1 الف) متصل به سرنگ انسولین استفاده شد. در ابتدا نیمی از نی با ساکارز 1 مول و سپس حدود 1/5 سانتی متر با هوا پر شد. سپس تخمدان ها پس از آبیگری با مقدار کمی محلول ضد یخ به درون نی انجمادی کشیده شد. بعد از ایجاد یک فاصله 1/5 سانتی متری هوا، نی تا انتها با ساکارز 1 مول پر شد. انتهای نی توسط خمیر هماتوکریت مسدود گردید. نی های حاوی تخمدان در بخار ازت مایع به مدت 30 ثانیه نگه داشته شدند و سپس به درون ازت مایع غوطه ور شده و به مدت یک هفته نگهداری شدند. در موقع ذوب تخمدان ها، ابتدا نی انجمادی از ازت مایع بیرون آورده شد و 30 ثانیه در بخار ازت و سپس به مدت 30 ثانیه در درجه حرارت آزمایشگاه نگهداشته شد. در مرحله بعد، نی در آب 25°C قرار داده شد. با قطع دو انتهای نی، محتویات نی درون ساکارز 1 مول تخلیه شد و به ترتیب در قطرات ساکارز نزولی منتقل شد. پس از آن تخمدان ها به قطره محیط کشت α -MEM حاوی سرم در زیر پارافین منتقل شد و در انکوباتور CO_2 ، در دمای 37°C و رطوبت به مدت نیم ساعت نگهداری شدند.

با استفاده از محلول انجمادی اتیلن گلیکول و ساکارز منجمد شدند و پس از ذوب مورد بررسی مورفولوژی قرار گرفتند. همچنین در این مطالعه سمیت محلول انجمادی استفاده شده نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

این تحقیق از نوع مطالعه تجربی بود. حیوانات طبق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تربیت مدرس در درجه حرارت 25 ± 2 درجه سانتیگراد در اتاق مخصوص حیوانات در تناوب نوری 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب و غذا به صورت نامحدود در دسترس حیوانات قرار می گرفت.

در این مطالعه از 13 سر موشهای سوری نابالغ 7 روزه ماده نژاد NMRI تهیه شده از دانشگاه تربیت مدرس استفاده شد. موشها با روش قطع نخاع کشته شده و با ایجاد شکاف طولی در ناحیه شکم تخمدان های آنها از بدن خارج و در قطرات 200 میکرولیتری محیط کشت α -Minimal Essential Medium (Gibco, UK) حاوی 10 درصد سرم FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco; UK) قرار داده شدند. بافت های اضافی تخمدان به کمک سوزن سرنگ انسولین برداشته شد و پس از شستشو در محیط کشت تخمدان ها به مدت نیم ساعت در انکوباتور به تعادل رسیدند و در مراحل تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. تخمدان ها به شکل تصادفی در 4 گروه اصلی کنترل (غیرانجمادی)، گروه انجماد شیشه ای با نی و گروه انجماد شیشه ای با کرایولاک و یک گروه تست سمیت برای روش انجمادی مورد بررسی قرار گرفتند. این نکته قابل توجه است که در گروه های انجمادی محلول انجمادی و ذوب و همچنین زمان آبیگری یکسان بودند و فقط وسیله حامل بافت (carrier) آنها متفاوت بود.

محلول انجمادی

جهت انجماد شیشه ای از محلول ضد یخ حاوی 40% اتیلن گلیکول، 30% فایکول 70 (W/V) (Sigma, USA)،

از نیتروژن مایع بیرون آورده شد و بلافاصله در قطره محلول ساکارز 1 مول در دمای 37°C فرو برده شد و به ترتیب در قطرات ساکارز نزولی (ساکارز 1، 0/5 و 0/25 مول به ترتیب) منتقل شد. پس از این زمان تخمدان ها در قطره محیط کشت α -MEM حاوی سرم زیر روغن منتقل شد و در انکوباتور CO_2 ، در دمای 37°C و رطوبت به مدت نیم ساعت نگهداری شدند.



شکل 1. تصویرنی انجمادی (الف) و کرایولاک (ب)

تخمدان های منجمد شده و کنترل ابتدا در محلول 2/5 درصد گلو تار آلدهید تثبیت اولیه و سپس در محلول تترا اکسید اسمیوم تثبیت ثانویه شده و پس از آنگیری در الکل اتیلیک و استون توسط رزین (TAAB, UK) Epon 812 قالب گیری شدند. برش های نیمه نازک با ضخامت یک میکرون تهیه و با تولوئیدین بلو رنگ شدند. برش های نازک به ضخامت 50 نانومتر با اورانیل استات و سیرات سرب رنگ شده و توسط میکروسکوپ الکترونی انتقالی مشاهده شدند.

آنالیز آماری

آنالیزهای آماری در نرم افزار SPSS.15 انجام شد و درصد مورفولوژی فولیکول های نرمال تخمدان های منجمد شده، غیرانجمادی و تست سمیت مربوطه با آزمون های ANOVA و Tukey's در گروهها سنجیده شد. از نظر آماری در آزمون های فوق $P < 0/05$ معنی دار محسوب شد.

یافته ها

مشاهدات میکروسکوپ نوری

در تخمدان موش 7 روزه فولیکول های بدوی و اولیه با بیشترین درصد در قشر و تعدادی فولیکول پره آنترال در

انجماد و ذوب به روش کرایولاک

در روش کرایولاک (شکل 1 ب) تخمدان ها پس از آنگیری با روش مشابه روش قبلی با یک حجم بسیار کم از محلول انجمادی، روی صفحه کرایولاک (CryoLock) (Biodiseno) قرار گرفتند و به سرعت در نیتروژن مایع فرو برده شده و پوشش سر آنها در حالی که نمونه در ازت بود گذاشته شد و سپس کرایولاک به تانک نیتروژن منتقل شدند. همچنین برای ذوب نمونه ها کرایولاک سریع

تست سمیت

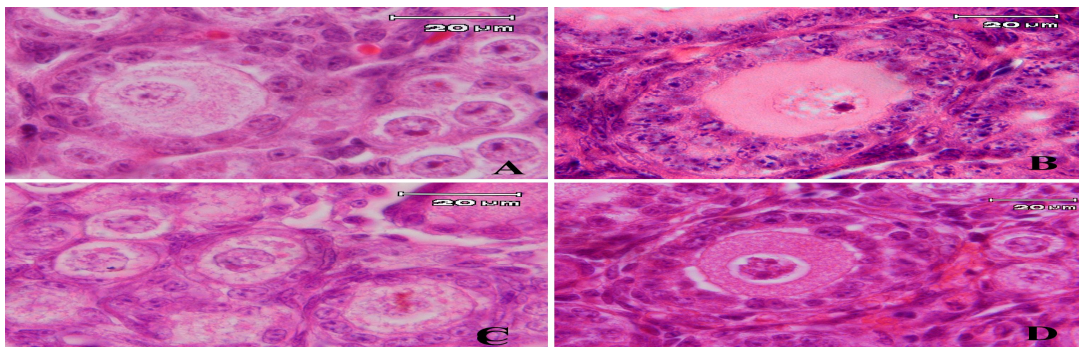
جهت بررسی تأثیر منفی و سمیت ضدیخ بر فولیکولها، تعدادی از تخمدان های جدا شده از موش تمام مراحل آنگیری و ذوب بر روی آنها انجام شد بدون اینکه وارد ازت مایع شوند.

مطالعات بافت شناسی

تخمدان های گروه کنترل، تست سمیت و دو گروه انجماد شیشه ای پس از ذوب به مدت نیم ساعت در محیط کشت به تعادل رسیدند، سپس در محلول بوئن به مدت 1 شب (overnight) تثبیت شدند (در هر گروه حداقل 5 نمونه). پس از مراحل پاساژ بافتی و تهیه بلوک پارافینی برش های 5 میکرومتر زده شد و رنگ آمیزی روتین هماتوکسیلین-اؤزین بر روی لام های تهیه شده انجام گرفت و در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. از هر نمونه بافتی حداقل 5 برش به شکل تصادفی انتخاب شد در زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. فقط فولیکول های با هسته مشخص در تخمک برای جلوگیری از شمارش مجدد شمارش شدند. در این مطالعه درصد فولیکول های طبیعی در مراحل بدوی، اولیه و پره آنترال در گروه ها با یکدیگر مقایسه شدند.

میکروسکوپ الکترونی

سلول‌های پهن با مرز مشخص و هسته برجسته مشابه با فیروپلاست بود. اما در تخمدان‌های منجمد شده با هر دو روش صدمات ناشی از انجماد شامل بهم ریختگی فاصله بین تخمک و سلول‌های گرانولوزای درونی، هسته‌های پیکنوتیک، جمع شدگی سیتوپلاسم و نکروز در تعدادی از فولیکول‌ها مشاهده شد و این تغییرات در گروه نی انجمادی مشخص تر بود (شکل 2).



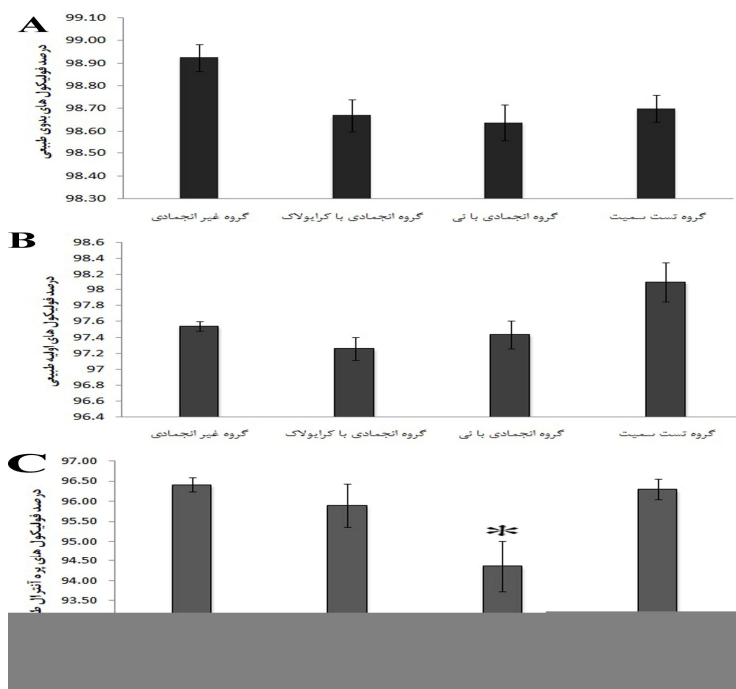
شکل 2: مورفولوژی فولیکول‌های بافت تخمدان انجمادی موش با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین. فولیکول‌های بدوی (که با فلش قرمز نشان داده می‌شود) و اولیه (A) و فولیکول‌های پره آنترال (B) با ظاهر طبیعی در گروه انجمادی با کرایولاک و فولیکول‌های بدوی و اولیه (C) و فولیکول‌های پره آنترال (B) با ظاهر غیرطبیعی در گروه انجمادی با نی با بزرگنمایی 100

97/26% و 95/9% و در تست سمیت به ترتیب 98/7%، 98/1% و 96/3% بود.

تفاوت معنی‌دار بین درصد فولیکول‌های بدوی و اولیه در گروه‌های کنترل و در دو گروه انجمادی وجود نداشت اما درصد فولیکول‌های پره آنترال طبیعی در گروه‌های انجمادی با روش نی به طور معنی‌دار پایین‌تر از گروه انجمادی با کرایولاک و غیر انجمادی بود ($P < 0/001$). تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تست سمیت انجمادی با گروه کنترل وجود نداشت.

درصد فولیکول‌های طبیعی بافت تخمدان

مقایسه آماری درصد فولیکول‌های طبیعی در مراحل مختلف تکوین فولیکولی در تخمدان غیر انجمادی و انجمادی موش با روش نی و کرایولاک و تست سمیت در شکل 3 آورده شده است. درصد فولیکول‌های بدوی، اولیه و پره آنترال با مورفولوژی طبیعی به ترتیب در گروه غیر انجمادی 98/92%، 97/54% و 96/41% و در گروه انجمادی با روش نی انجمادی به ترتیب 98/64%، 97/43% و 94/37% در گروه انجمادی با به کارگیری کرایولاک به ترتیب 98/67%

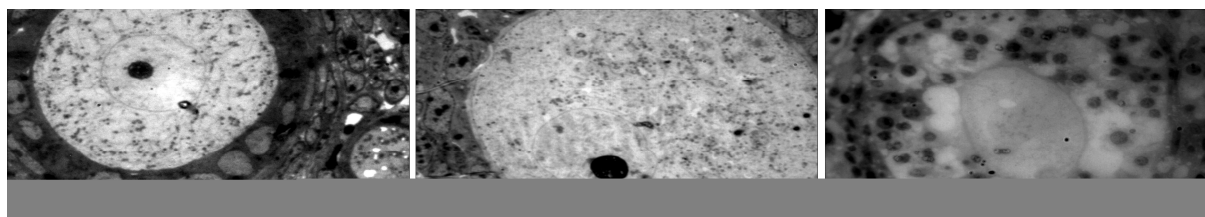


شکل 3: مقایسه درصد فولیکول های طبیعی در مراحل بدوی (A)، اولیه (B) و پره آنترال (C) تخمدان در گروه های غیرانجمادی و انجمادی با نی و کرایولاک و تست سمیت (در هر گروه 5 تخمدان). * وجود اختلاف معنی دار با گروه تخمدان غیر انجمادی و انجماد شیشه ای با کرایولاک و همچنین تست سمیت ($P < 0/001$).

مشاهدات میکروسکوپ الکترونی

میکروویلی های سطح تخمک در این فضا دیده می شود. سلول های گرانولوزا چند وجهی در یک تا دو لایه و هسته به اشکال مدور یا بیضی شکل و یوکروماتین با تراکم الکترونی کم مشاهده شد. سلول های تکا با شکل دوکی با هسته کشیده و هتروکروماتین کناری قابل مشاهده بود. در مطالعات فراساختاری گروه انجمادی با روش نی علائمی از آسیب در سلول های فولیکولی مانند چروکیدگی سلول، جدا شدن سلولهای گرانولوزا از همدیگر، جمع شدگی سیتوپلاسم و حبابدار شدن غشا مشاهده شد (شکل 4).

مطالعه فراساختار فولیکول ها در گروه انجماد شیشه ای با کرایولاک نشان داد که بسیاری از خصوصیات اندامک ها و ساختار سلول های تخمک و فولیکولار مشابه گروه غیر انجمادی بود و نمای فراساختاری تخمک کاملاً حفظ شده بود. تخمک سیتوپلاسمی متحدالشکل با گرانول های طبیعی داشت. هسته تخمک ها مدور و یوکروماتین بود. یک تا سه هستک در هسته مشاهده شد. اطراف تخمک زونا پلوسیدایی با ظاهری نسبتاً یکنواخت و ضخیم وجود داشت. از طرفی فضای دور زرده ای نیز در اکثر گروه ها تنگ بود و



شکل 4: میکروگراف میکروسکوپ الکترونی از بافت تخمدان انجماد شیشه ای شده با کرایولاک تصاویر A مربوط به فولیکول اولیه می باشد و تصویر B مربوط به فولیکول پره آنترال با بزرگنمایی 2000 (A) سیتوپلاسم تخمک با ظاهری طبیعی مشاهده می شود. در تصویر C فولیکول پره آنترال در بافت تخمدان انجماد شیشه ای شده با نی که آسیب دیده مشاهده می شود با بزرگنمایی 1000.

بحث

مشاهدات میکروسکوپ نوری نشان داد که انجماد شیشه ای بافت تخمدان با استفاده از محلول اتیلن گلیکول و دو روش کرایولاک و نی انجمادی تغییراتی را در فولیکول های بدوی و اولیه ایجاد نمی کند اما در گروه انجمادی با نی تعدادی از فولیکول های پره آنترال صدمه دیده مشاهده شد. نتایج حاصل از مطالعات فراساختاری این پژوهش نشان داد که سلول های گرانولوزا و تخمک در روش انجمادی با کرایولاک مورفولوژی خود را حفظ کرده و اندامک ها ساختار طبیعی دارند. اما در روش انجمادی با نی صدماتی در فولیکول های بزرگتر مشاهده شد. نتایج مورفولوژیکی گروه تست سمیت نشان داد که غلظت ضدیخ به کار گرفته شده برای انجماد شیشه ای اثرات سمی بر مورفولوژی فولیکول ها نداشت و مشابه گروه غیر انجمادی بود. عوامل متعددی وجود دارند که بر مورفولوژی و ساختار فولیکول ها در تخمدان های منجمد شده اثر می کنند که شامل روش های انجمادی، محلول های انجمادی و سرعت سرد کردن محلول انجمادی است. محلول انجمادی به کار رفته در این مطالعه اتیلن گلیکول بود که به علت وزن مولکولی کم و نفوذپذیری زیاد به آسانی به بافت تخمدانی نفوذ می کند و در نتیجه بافت تخمدانی کمتر دچار شوک های اسمزی طی انجماد و ذوب می شود.

یکی از مهمترین عوامل دیگر که می تواند منجر به تفاوت در روش های انجماد شیشه ای به کار گرفته شده شود، سرعت سرد کردن نمونه های انجمادی می باشد. در روش انجماد شیشه ای با نی ممکن است که به دلیل دیواره ضخیم، قطر نی و محلول انجمادی بیشتری که اطراف نمونه قرار دارد سرعت سرد کردن و گرم کردن بافت کاهش یابد و باعث تشکیل کریستال های یخ در سلول ها می شود در نتیجه باعث آسیب فولیکول های پره آنترال شوند. مشابه نتایج ما بابایی و همکاران، در مطالعه ای که در سال 2007 انجام داده اند از وسیله نی پلاستیکی با قطر 0/5 میلی متر برای انجماد شیشه ای تخمدان موش بالغ استفاده کرده اند. نتایج

بافت شناسی نشان داد که درصد فولیکول های بدوی طبیعی در گروه انجمادی و غیر انجمادی تفاوتی نداشتند اما درصد فولیکول های نرمال مرحله آنترال در گروه انجمادی کمتر از گروه غیر انجمادی بود (22). اما برخلاف نتایج ما مازوچی و همکاران در سال 2008 نشان دادند که انجماد شیشه ای بافت تخمدان موش نابالغ 12 روزه با نی انجمادی می تواند ساختار و مورفولوژی فولیکول های پره آنترال را پس از انجماد و ذوب به خوبی حفظ کند (15). این تفاوت ممکن است به خاطر تفاوت های سن موش باشد، که در مطالعه آنها از موش با سن بیشتر استفاده شده است.

کرایولاک استفاده شده در این مطالعه شامل یک نوار پلی پروپیلن با عرض 0/8 میلیمتر و طول 20 میلیمتر و ضخامت 0/1 میلیمتر است که به یک دسته پلاستیکی متصل شده است و مجهز به یک نی پوششی است. در این روش، تخمدان در حجم بسیار کمی از محلول انجمادی روی نوار نازک قرار می گیرند و وارد نیتروژن مایع می شوند. در زیر نیتروژن مایع، پوشش پلاستیکی روی نوار قرار می گیرد که باعث حفاظت از نمونه در نیتروژن مایع می شود. اما این وسیله برای قطعات کوچک بافت تخمدان قابل استفاده است. کرایولاک برای قرار دادن بافت تخمدان در حجم کوچکی طراحی شده اند که موجب تماسی مطلوب با نیتروژن مایع می شوند و بالاترین سرعت سرد کردن را فراهم می کنند و زمان لازم را برای تشکیل یخ را در اختیار سلول قرار نمیدهد. همچنین استفاده از کرایولاک برای انجماد شیشه ای بافت تخمدان باعث کاهش حجم محلول انجمادی در اطراف نمونه می شود، در نتیجه از هسته گذاری هتروژنوس در محیط خارج سلولی جلوگیری به عمل می آورد و شانس تشکیل کریستال یخ را کاهش می دهد، در نتیجه بافت تخمدان به خوبی حفظ شده بود. اما کرایولاک برای نمونه هایی با سایز کوچک مانند موش مناسب است اما برای نمونه های بزرگتر پستانداران مانند انسان امکان پذیر نمی باشد. در مطالعه ای مشابه، ایمانی و همکاران در سال 2007 میزان رشد و بقای فولیکول های پره

شده است. به همین دلیل در فولیکول های پره آنترال در گروه انجمادی با نی آسیب بیشتری مشاهده شد.

نتیجه گیری

نتایج بررسی های مورفولوژیکی و فراساختاری نشان داد که مورفولوژی بافت تخمدان پس از انجماد با استفاده از کرایولاک در مقایسه با استفاده از نی به خوبی حفظ شده بود و می توان از این روش را برای نگهداری و حفظ بافت تخمدان به مدت طولانی استفاده کرد و شاید بتوان در آینده از این روش برای انجماد نمونه های انسانی نیز استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی گروه علوم تشریح است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران کشور انجام شده است و همچنین بدین وسیله از همکاری آقای شهرام پوربیرانوند و خانم سعیده ابراهیمی کارشناسان گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس قدردانی می گردد.

آنترال موش را پس از انجماد شیشه ای با روش نی و کرایوتا پ را با یکدیگر مقایسه کردند. آنها گزارش کردند که میزان حیات فولیکول ها پس از 4 روز کشت در گروه انجمادی کرایوتا پ بالاتر بود و مورفولوژی فولیکول های پره آنترال به خوبی حفظ شده بودند (23).

همچنین کاگاو و همکاران در سال 2007 با استفاده از محلول 15% DMSO و 15% اتیلن گلیکول کرایوتا پ قطعات بافت تخمدان را منجمد کردند و بعد از ذوب به کپسول کلیه پیوند زدند و پس از کشت آزمایشگاهی IVF (in vitro fertilization) تولد زنده گزارش کردند (24). نکته حائز اهمیت دیگر در انجماد بافت تخمدانی و میزان زنده ماندن فولیکول ها درون بافت تخمدانی مربوط به قرارگیری فولیکول ها در تخمدان و نوع فولیکول است. فولیکول های بدوی و اولیه در نقاط سطحی تر تخمدان قرار گرفته اند ولی فولیکول های پره آنترال در مناطق عمیق تر می باشند. بنابراین میزان سرد شدن طی مراحل انجماد و ذوب در فولیکول های اولیه سرعت بیشتری داشته ولی در فولیکول هایی که در عمق تخمدان واقع شده اند سرعت نفوذ کمتری بوده که باعث صدمه در فولیکول های پره آنترال

References

1. Jeong K, Aslan E, Ozkaya E, Sonmezer M, Oktay K. Ovarian cryopreservation. *Minerva Med* 2012; 103: 37-46.
2. Anderson RA, Wallace WH, Baird DT. Ovarian cryopreservation for fertility preservation: indications and outcomes. *Reproduction* 2008; 136: 681-9.
3. Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011; 23: 160-86.
4. Wang Y, Xiao Z, Li L, Fan W, Li SW. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum Reprod* 2008; 23: 2256-65.
5. Wang X, Catt S, Pangestu M, Temple-Smith P. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice. *Reproduction* 2009; 138: 527-35.
6. Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 568-77.
7. Santos RR, Tharasanit T, Van Haefen T, Figueiredo JR, Silva JR, Van den Hurk R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res* 2007; 327: 167-76.
8. Khosravi F, Reid RL, Moini A, Abolhassani F, Valojerdi MR, Kan FW. In vitro development of human primordial follicles to preantral stage after vitrification. *J Assist Reprod Genet.* 2013; 30: 1397-406.

9. Bos-Mikich A, Marques L, Rodrigues JL, Lothhammer N, Frantz N. The use of a metal container for vitrification of mouse ovaries, as a clinical grade model for human ovarian tissue cryopreservation, after different times and temperatures of transport. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 1267-71.
10. Tan X, Song E, Liu X, Liu G, Cheng H, Wan F. Successful vitrification of mouse ovaries using less-concentrated cryoprotectants with Supercool X-1000 supplementation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2012; 48: 69-74.
11. Zhou XH, Wu YJ, Shi J, Xia YX, Zheng SS. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology* 2010; 60: 101-5.
12. Liu LJ, Xie XY, Zhang RZ, Xu P, Bujard H, Jun M. Reproduction and fertility in wild-type and transgenic mice after orthotopic transplantation of cryopreserved ovaries from 10-d-old mice. *Lab Anim (NY)* 2008; 37: 353-7.
13. Migishima F, Suzuki-Migishima R, Song SY, Kuramochi T, Azuma S, Nishijima M, Yokoyama M. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod* 2003; 68: 881-7.
14. Salehnia M. Autograft of vitrified mouse ovaries using ethylene glycol as cryoprotectant. *Exp Anim* 2002; 51: 509-12.
15. Mazoochi T, Salehnia M, Rezazadeh Valojerdi M, Mowla J. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 2008; 90: 1480-6.
16. Luvoni GC, Tessaro I, Apparício M, Ruggeri E, Luciano AM, Modena SC. Effect of Vitrification of Feline Ovarian Cortex on Follicular and Oocyte Quality and Competence. *Reprod Domest Anim* 2012; 47: 385-91.
17. Kagawa N, Kuwayama M, Nakata K, et al. Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved preantral follicles of adult mice. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 693-9.
18. Choi WJ, Yeo HJ, Shin JK, Lee SA, Lee JH, Paik WY. Effect of vitrification method on survivability, follicular growth and ovulation of preantral follicles in mice. *J Obstet Gynaecol Res* 2007; 33: 128-33.
19. Chen SU, Chien CL, Wu MY. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod* 2006; 21: 2794-800.
20. Choi J, Lee JY, Lee E, Yoon BK, Bae D, Choi D. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development. *Cryobiology* 2007; 54: 55-62.
21. Abedelahi A, Salehnia M, Abdolamir A, Hajizadeh E. Comparison of ultrastructure and morphology of mouse ovarian follicles after conventional and direct cover vitrification using different concentrations of ethylene glycol. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2009; 7: 45-52.
22. Babaei H, Derakhshanfar A, Kheradmand A. Vitrification of mouse ovaries using ethylene glycol and DMSO as cryoprotectants: histopathological evaluation. *Veterinarski Arhiv* 2007; 77:19-27.
23. Eimani H, Mamzaji SS, Soleimani MM, Abnosi MH, Valojerdi MR, Yazdi PE, Shahverdi A, Guorabi H Survival rate of preantral follicles derived from vitrified neonate mouse ovarian tissue by Cryotop and conventional methods. *Biofactors* 2007; 31: 117-26.
24. Kagawa N, Kuwayama M, Nakata K, et al. Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved preantral follicles of adult mice. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 693-9.