مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره نوزدهم /پاییز 1393/102-94

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

**شبنم عبدی[1]، مژده صالح نیا[2]، سامان حسینخانی[3]**

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 (مولف مسوول) تلفن ثابت:021-828803562 salehnim@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. تخمدان‌ها 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 محلول‌های 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 نا بالغ 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

از آنجایی که تخمدانها منابع عظیمی از تخمکها هستند، امروزه انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان به عنوان یکی از روش‌های 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 گونه‌های کمیاب جانوران مورد توجه قرار گرفته است (2و 1). به همین علت این تکنیک امروزه توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. در تکنیک انجماد شیشه‌ای از غلظت بالای ضد یخ استفاده می‌شود در نتیجه بدون تشکیل کریستال‌های یخ، بافت مورد نظر منجمد می‌شود و این حالت به عنوان شیشه ای شدن شناخته شده است (3). انجماد

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: 10.22102/19.3.11 ]

شیشه‌ای موفق در تخمدان گونه های مختلفی از جمله موش (5و4)، گاو (6)، بز (7) و انسان (8) گزارش شده است. از مهمترین عوامل تعیین کننده حیات فولیکول ها 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 (12-9). این وسایل را می توان 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 می توان به نی انجمادی، کرایوتیوب و کرایوویال اشاره کرد، که به طور معمول برای انجماد بافت تخمدان استفاده می شود.

در سال 2003 میگی شیما و همکاران با استفاده از کرایوتیوپ 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 کرایوویال منجمد کردند و پس از پیوند داخل صفاقی تخمدان فولیکول های 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 فولیکول ها 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 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 می شود (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 شیشه ای تخمدان موش با روش کرایوتیوب بالاتر از گروه انجمادی به روش حاصل از پوشش مستقیم ( Direct Cover vitrification) بود (21). چوی و همکاران، گزارش کردندکه انجماد شیشه ای بافت تخمدان در موش با استفاده از گرید میکروسکوپ الکترونی باعث کاهش رشد فولیکول های بدوی می شود و میزان نکروز را افزایش می دهد (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 می کنند و از ایجاد کریستال یخ جلوگیری می کند. با این روش سرعت سرد کردن به 23000 درجه سانتی گراد در دقیقه افزایش می یابد در نتیجه از صدمات ناشی از سرما جلوگیری می شود. علاوه بر آن با کاهش حجم محلول، سرعت گرم کردن مجدد نیز به 42000 درجه سانتی گراد در دقیقه افزایش می یابد و در نتیجه از تشکیل کریستال‌های یخ حین گرم کردن جلوگیری می کند. این روش با موفقیت برای جنین و تخمک استفاده می شود. 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 پژوهش های 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



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: 10.22102/19.3.11 ]

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 2±25 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 تخمدان‌ها به مدت نیم ساعت در انکوباتور به تعادل رسیدند و در مراحل تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. تخمدان‌ها 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 گروه‌های انجمادی محلول انجمادی و ذوب و همچنین زمان آبگیری 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) ، ساکارز 0/5 مول و Bovin Serum Albumin (Sigma, USA) (BSA) استفاده شد. در ابتدا محلول بافر فسفات PBI دارای 30% فایکول 70 و ساکارز نیم مول ساکروز 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 (40% Ethylene Glycol, Ficoll, Sucrose ) به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق آبگیری 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 آبگیری 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 (شکل1 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 آبگیری 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 و30 ثانیه در بخار ازت و سپس به مدت 30 ثانیه در درجه حرارت آزمایشگاه نگهداشته شد. در مرحله بعد، نی در آب $25^{\circ}c$ قرار داده شد. با قطع دو انتهای نی، محتویات نی درون ساکروز 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 CO2، در دمای $37^{\circ}c$ و رطوبت به مدت نیم ساعت نگهداری شدند.

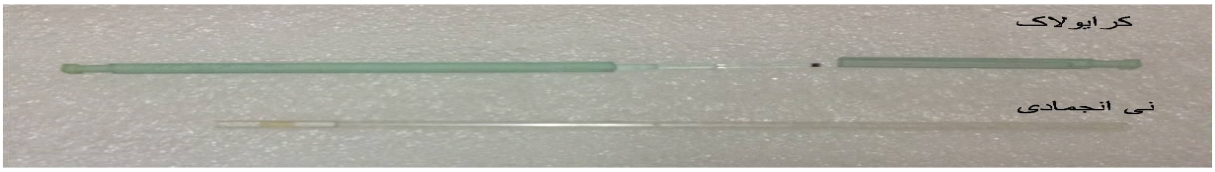


[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: 10.22102/19.3.11 ]

**انجماد و ذوب به روش کرایولاک**

در روش کرایولاک (شکل1 ب) تخمدان ها پس از آبگیری 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 سرآنها در حالی که نمونه در ازت بود گذاشته شد و سپس کرایولاک به تانک نیتروژن منتقل شدند. همچنین برای ذوب نمونه ها کرایولاک سریع از نیتروژن مایع بیرون آورده شد و بلافاصله در قطره محلول ساکارز 1 مول در دمای c ° 37 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 CO2، در دمایc ° 37 و رطوبت به مدت نیم ساعت نگهداری شدند.




شکل 1. تصویر نی انجمادی (الف) و کرایولاک (ب)

**تست سمیت**

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

**مطالعات بافت شناسی**

تخمدان‌های 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-ائوزین 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 فولیکول‌های 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**

تخمدان های منجمد شده و کنترل ابتدا در محلول 2/5 درصد گلوتارآلدهید تثبیت اولیه و سپس در محلول تتراکسید اسمیوم تثبیت ثانویه شده و پس از آبگیری 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 سیترات سرب رنگ شده و توسط میکروسکوپ الکترونی انتقالی مشاهده شدند.

**آنالیز آماری**

آنالیزهای آماری در نرم افزار SPSS.15 انجام شد و درصد مورفولوژی فولیکول‌های نرمال تخمدان‌های منجمد شده، غیرانجمادی و تست سمیت مربوطه با آزمون‌های ANOVA وTukey's در گروهها سنجیده شد. از نظر آماری در آزمون‌های فوق P<0/05 معنی‌دار محسوب شد.

## یافته ها

**مشاهدات میکروسکوپ نوری**

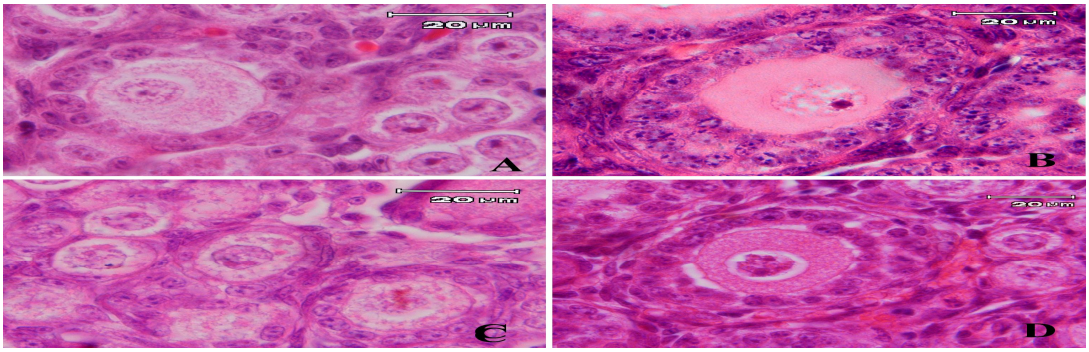
در تخمدان موش 7 روزه فولیکول های بدوی و اولیه با بیشترین درصد در قشر وتعدادی فولیکول پره آنترال در



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: 10.22102/19.3.11 ]

مرکز تخمدان قابل مشاهده بودند. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی روتین هماتوکسیلین-ائوزین نشان داد که تخمدان‌های انجمادی نمای طبیعی خود را حفظ کرده بودند. فولیکول های بدوی، اولیه و پره آنترال دارای تخمک در مرحله ژرمینال وزیکل با سیتوپلاسم یک دست و هسته مرکزی بود. اطراف تخمک عمدتاً 2 تا 3 لایه سلول‌های گرانولوزای مکعبی قرار داشت. لایه سلول های تکا به طور واضح اطراف فولیکول دیده می‌شد. بافت استروما دارای سلول‌های پهن با مرز مشخص و هسته برجسته مشابه با فیبروبلاست بود. اما در تخمدان های 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 فولیکول ها مشاهده شد و این تغییرات در گروه نی انجمادی مشخص تر بود (شکل2).




شکل2: مورفولوژی فولیکول های بافت تخمدان انجمادی موش با رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین. فولیکول های بدوی(که با فلش قرمز نشان داده می شود) و اولیه (A) و فولیکول های پره آنترال (B) با ظاهر طبیعی در گروه انجمادی با کرایولاک و فولیکول های بدوی و اولیه (C) و فولیکول های پره آنترال(B) با ظاهر غیرطبیعی در گروه انجمادی با نی با بزرگنمایی 100

**درصد فولیکول‌های طبیعی بافت تخمدان**

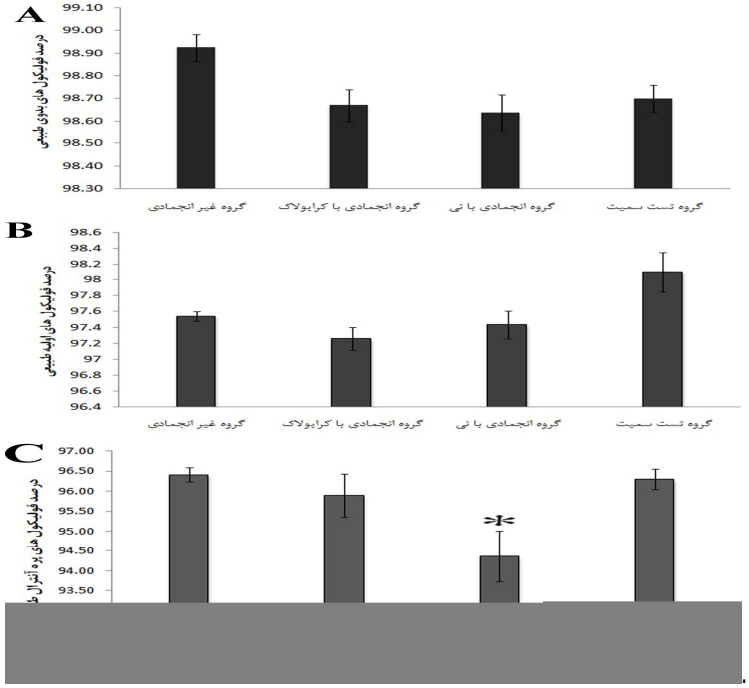
مقایسه آماری درصد فولیکول‌های طبیعی در مراحل مختلف تکوین فولیکولی در تخمدان غیر انجمادی و انجمادی موش با دو روش نی و کرایولاک و تست سمیت در شکل 3 آورده شده است. درصد فولیکول‌های بدوی، اولیه و پره آنترال با مورفولوژی طبیعی به ترتیب در گروه غیر انجمادی 98/92%، 97/54% و 96/41% و در گروه انجمادی با روش نی انجمادی به ترتیب 98/64%، 97/43% و 94/37 در گروه انجمادی با به کارگیری کرایولاک به ترتیب 98/67%، 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 گروه های انجمادی با روش نی به طور معنی دار پایین تر از گروه انجمادی با کرایولاک و غیر انجمادی بود (P<0/001). تفاوت معنی‌دار بین گروه های تست سمیت انجمادی با گروه کنترل وجود نداشت.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-04 ]

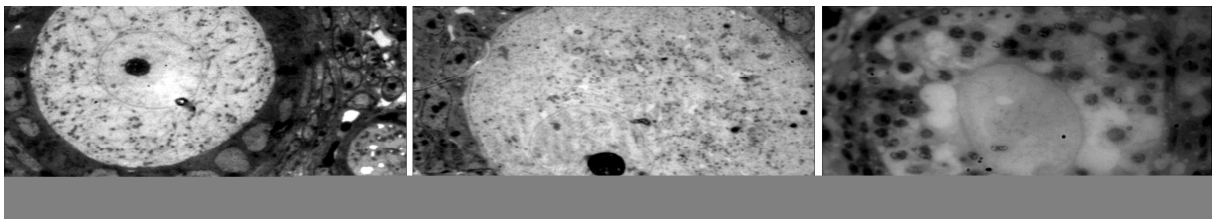
[ DOI: 10.22102/19.3.11 ]




شکل3: مقایسه درصد فولیکول های طبیعی در مراحل بدوی (A)، اولیه (B) و پره آنترال (C) تخمدان در گرو ههای 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 وهمچنین تست سمیت (P<0/001).

**مشاهدات میکروسکوپ الکترونی**

مطالعه فراساختار فولیکول ها در گروه انجماد شیشه ای با کرایولاک نشان داد که بسیاری از خصوصات اندامک ها و ساختار سلول های تخمک و فولیکولار مشابه گروه غیر انجمادی بود ونمای فراساختاری تخمک کاملاً حفظ شده بود. تخمک سیتوپلاسمی متحدالشکل با گرانول های طبیعی داشت. هسته تخمک ها مدورو یوکروماتین بود. یک تا سه هستک در هسته مشاهده شد. اطراف تخمک زوناپلوسیدایی با ظاهری نسبتا یکنواخت و ضخیم وجود داشت. از طرفی فضای دور زرده‌ای نیز در اکثر گروه‌ها تنگ بود و میکروویلی های سطح تخمک در این فضا دیده می شد. سلول های گرانولوزا چند وجهی در یک تا دولایه و هسته به اشکال مدور یا بیضی شکل ویوکروماتین 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).



شکل4: 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 بزرگنمایی2000 (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.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: 10.22102/19.3.11 ]

## 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 مشاهد شد. نتایج مورفولوژیکی گروه تست سمیت نشان داد که غلظت ضدیخ به‌کار گرفته شده برای انجماد شیشه‌ای اثرات سمی بر مورفولوژی فولیکول‌ها نداشت و مشابه گروه غیر انجمادی بود. عوامل متعددی وجود دارند که بر مورفولوژی و ساختار فولیکول‌ها در تخمدان‌های منجمد شده اثر می‌کنند که شامل روش‌های انجمادی، محلول‌های انجمادی و سرعت سردکردن محلول انجمادی است. محلول انجمادی به کار رفته در این مطالعه اتیلن گلیکول بود که به‌علت وزن مولکولی کم و نفوذپذیری زیاد به آسانی به بافت تخمدانی نفوذ می‌کند و در نتیجه بافت تخمدانی کمتر دچار شوک‌های اسمزی طی انجماد و ذوب می‌شود.

یکی از مهمترین عوامل دیگرکه می‌تواند منجر به تفاوت در روش‌های انجماد شیشه‌ای به‌کار گرفته شده شود، سرعت سرد کردن نمونه‌های انجمادی میباشد. 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 مطالعه‌ای که در سال 2007 انجام داده‌اند از وسیله نی پلاستیکی با قطر 0/5 میلی متر برای انجماد شیشه‌ای تخمدان موش بالغ استفاده کرده‌اند. 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 شیشه‌ای بافت تخمدان موش نابالغ 12 روزه با نی انجمادی می تواند ساختار و مورفولوژی فولیکول‌های پره‌آنترال را پس از انجماد وذوب به خوبی حفظ کند (15). این تفاوت ممکن است به خاطر تفاوت های سن موش باشد، که در مطالعه آنها از موش با سن بیشتراستفاده شده است.

کرایولاک استفاده شده در این مطالعه شامل یک نوار پلی پروپیلن با عرض 0/8 میلیمتر و طول 20 میلیمتر و ضخامت0/1 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 می‌گیرند و وارد نیتروژن مایع می‌شوند. در زیر نیتروژن مایع، پوشش پلاستیکی روی نوار قرار می‌گیرد که باعث حفاظت از نمونه در نیتروژن مایع می‌شود. اما این وسیله برای قطعات کوچک بافت تخمدان قابل استفاده است. کرایولاک برای قرار دادن بافت تخمدان در حجم کوچکی طراحی شده‌اند که موجب تماسی مطلوب با نیتروژن مایع می‌شوند و بالاترین سرعت سرد کردن را فراهم می‌کنند 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 می‌دهد، 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 بزرگترپستانداران مانند انسان امکانپذیر نمی باشد. در مطالعه ای مشابه، ایمانی و همکاران در سال 2007 میزان رشد و بقای فولیکول های پره



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: 10.22102/19.3.11 ]

آنترال موش را پس از انجماد شیشه‌ای با روش نی و کرایوتاپ را با یکدیگر مقایسه کردند. آنها گزارش کردند که میزان حیات فولیکول ها پس از 4 روز کشت در گروه انجمادی کرایو تاپ بالاتر بود ومورفولوژی فولیکول های پره آنترال به خوبی حفظ شده بودند (23).

همچنین کاگاوا و همکاران در سال 2007 با استفاده از محلول 15% DMSO و 15% اتیلن گلیکول کرایوتاپ 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). نکتهٔ حائز اهیمت دیگر در انجماد بافت تخمدانی و میزان زنده ماندن فولیکول‌ها درون بافت تخمدانی مربوط به قرارگیری فولیکول‌ها در تخمدان و نوع فولیکول است. فولیکول‌های بدوی و اولیه در نقاط سطحی‌تر تخمدان قرار گرفته‌اند ولی فولیکول‌های پره‌آنترال در مناطق عمیق تر می‌باشند. بنابراین میزان سرد شدن طی مراحل انجماد و ذوب در فولیکول‌های اولیه سرعت بیشتری داشته ولی در فولیکول‌هایی که در عمق تخمدان واقع شده‌اند سرعت نفوذ کمتری بوده که باعث صدمه در فولیکول های پره آنترال 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 می‌گردد.

## 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 Langendonckt 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 Haeften 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.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: 10.22102/19.3.11 ]

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, Modina 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, Mamzoji 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.

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: 10.22102/19.3.11 ]