مقاله پژوهشی

بررسی اثر انجماد شیشه‌ای بر مورفولوژی رده‌های مختلف فولیکولی بافت تخمدان رت

فروزان اسماعیل زاده[۱]، لاله حامدی[۲]، داود مهربانی[۳*]، عالم بیدشهری[۲]، نادر تنیده[۳]

۱- گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، مرودشت، ایران.
۲- گروه زیست تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران.
۳- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۳/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: امروزه محققین به دنبال روش‌های مناسبی برای نگهداری گامت و جنین هستند. در این مطالعه اثر انجماد شیشه‌ای بر مورفولوژی رده‌های مختلف فولیکولی تخمدان بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: ۸۰ تخمدان از ۴۰ سر رت به ۲۵ تخمدان در گروه شاهد، ۲۵ تخمدان در گروه انجماد و ۳۰ تخمدان در گروه آزمون سمیت تقسیم شدند. جهت انجماد از محیط تعادل، اتیلن گلیکول و دی متیل سولفوکسید استفاده شد. در ذوب از محلول‌های دارای شیب غلظتی مختلف ساکاروز و در ارزیابی مرفولوژی، از رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین استفاده گردید. درصد انواع فولیکول‌های سالم و تحلیل یافته پس از ۲۴ ساعت، یک هفته و یک ماه از گذشت انجماد مقایسه شدند.

نتایج: پس از انجماد، ناهنجاری مرفولوژیک فولیکولی مشاهده نشد. درصد فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه، آنترال و تکامل یافته به ترتیب ۳۴/۵، ۱۷/۷، ۱۷/۴، ۱۵/۲ و ۵۰/۳ درصد بوده است. درصد فولیکول‌های سالم و تحلیل یافته در گروه انجمادی و آزمون سمیت به ترتیب ۴۷/۵ و ۱۱/۹ درصد بود. این ارقام در گروه کنترل به ترتیب ۵۹/۶ و ۱۶/۹ درصد و در روش انجماد شیشه‌ای، ۹۱ درصد بوده و ۸۱ درصد دارای تقسیم سلولی و ۵۰ درصد دارای بلاستوسیست بودند.

نتیجه‌گیری: چون در انجماد تخمدان در مقایسه با تخمک، از تعداد زیادی فولیکول در مراحل مختلف تکوینی و در سیکل‌های متوالی می‌توان استفاده نمود و این که انجماد شیشه‌ای باعث ناهنجاری مرفولوژیک و ساختاری فولیکولی نشده، انجماد شیشه‌ای می‌تواند روش مطلوبی در نگهداری و انجماد رده‌های مختلف فولیکولی تخمدان باشد.

کلمات کلیدی: انجماد شیشه‌ای، مرفولوژی، فولیکول، تخمک، تخمدان، رت

مقدمه

امروزه محققین به دنبال روش‌های مناسبی برای نگهداری گامت و جنین جانوران هستند، که از جمله این روش‌ها انجماد بافت تخمدان است (۱). مهمترین دلایل به کارگیری انجماد تخمدان در مقایسه با انجماد تخمک، مربوط به وجود تعداد زیادی فولیکول در مراحل مختلف تکوینی است که می‌توان به دفعات در سیکل‌های متوالی ازآن استفاده نمود. به علت حساسیت کمتر تخمک نابالغ به تغییرات دما، استفاده از انجماد بافت تخمدانی که دارای تعداد فراوانی تخمک نابالغ است در مقایسه با انجماد تخمک بالغ مناسب تر به نظر می‌رسد (۲). از طرف دیگر انجماد تخمک و جنین هزینه بر و با موفقیت کمتر همراه بوده است (۲).

انجماد بافت تخمدان با دارا بودن تعداد زیادی فولیکول در مراحل تکوینی مختلف می‌تواند پتانسیل باروری بالایی داشته باشد؛ لذا این روش در درمان ناباروری یا در بیماران مبتلا به سرطان که تحت درمان با رادیوتراپی یا شیمی درمانی هستند و پس از درمان می‌خواهند به زندگی طبیعی خود برگردند، اهمیت به سزایی دارد (۳). انجماد تخمدان می‌تواند برای بیماران غیر سرطانی همچون بیماری‌های خود ایمنی، گیرنده‌های مغز استخوان یا پیوند سلول بنیادی یا افراد متحمل برداشت تخمدان

* نویسنده مسئول: داود مهربانی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. تلفن: ۰۷۱-۳۲۳۴۱۰۲۵
Email: mehrabad@sums.ac.ir

بر اساس شروع بیماری سودمند باشد. همچنین این عمل برای زنان در معرض یائسگی زودرس (ناشی از مشکلات ژنتیکی همچون سندروم ترنر) با ارزش گزارش شده است (۴).

بانک انجماد تخمک در برنامه‌های اهدای تخمک برای اهداف تحقیق مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). همچنین انجماد تخمک برای زنانی که به دلایلی مانند تحصیل یا اشتغال تمایل دارند حاملگی خود را به تأخیر بیاندازند کاربرد دارد (۶). در ارتباط با انجماد جنین، موارد اخلاقی و محدودیت‌های قانونی در بسیاری از کشورها موجود می‌باشد (۷). مهم ترین دلایل به کارگیری انجماد تخمدان در مقایسه با انجماد تخمک، مربوط به وجود تعداد زیادی فولیکول در مراحل مختلف تکوینی است که می‌توان به دفعات در سیکل‌های متوالی از آن استفاده نمود. همچنین تخمدان نابالغ دارای تعداد زیادی فولیکول بدوی و اولیه می‌باشد که از نظر ساختمانی و اندازه تقریباً شبیه به هم هستند و نسبت به تغییرات حرارتی مقاوم تر هستند (۸) و برای بقای نسل، حفظ و تکثیر گونه‌های کمیاب جانوری، انجماد تخمدان می‌تواند از اهمیت خاصی برخوردار باشد (۵).

با توجه به اهمیت انجماد در کوتاه ترین زمان ممکن، روش انجماد شیشه‌ای روشی مناسب به نظر می‌رسد. این روش در مقایسه با دیگر روش‌های انجمادی مزایای فراوانی دارد، به طوری که از سرعت و سهولت برخوردار بوده و صدمات سلولی ناشی از فرآیند انجماد به حداقل ممکن می‌رسد (۹). روش انجماد شیشه‌ای به صورت بالینی برای اولین بار در اوایل سال ۱۹۸۰ معرفی شد و در سال ۱۹۸۵ تاثیر روش انجماد شیشه‌ای در حفظ سرمایی جنین مشخص گردید (۱۰). در سال ۲۰۰۵ روش انجماد شیشه‌ای با موفقیت در اووسیت‌های انسان استفاده شده است (۲). گزارشات نشان داده است که پیوند ارتوتوپیک قطعات قشری تخمدان منجر به آبستنی و تولد نوزاد زنده شده است (۱۱). موفقیت در تخمدان‌های پیوند زده شده انسان و سایر گونه‌ها پس از انجماد آهسته نیز نشان داده شده است (۱۲).

در انجماد شیشه‌ای و سرد کردن آهسته در حفظ سرمای اووسیت‌ها و جنین‌ها از دی متیل سولفوکسید (DMSO) و اتیلن گلیکول (EG) (۱۳)، پلی اتیلن گلیکول (PEG)، پروپیلن گلیکول (PROH) و استامید با موفقیت استفاده شده است (۱۴). با توجه به این که در انجماد تخمدان در مقایسه با انجماد تخمک، از تعداد زیادی فولیکول در مراحل مختلف تکوینی و به دفعات در سیکل‌های متوالی می‌توان استفاده نمود در این مطالعه اثر انجماد شیشه‌ای بر مورفولوژی رده‌های مختلف فولیکولی در بافت تخمدان رت با استفاده از اتیلن گلیکول بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک و آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز، انجام گرفته است. تعداد ۴۰ سر رت ماده بالغ از سویه اسپراگ داولی در سنین ۸ تا ۱۰ هفته وارد مطالعه شدند. کلیه شرایط و قوانین حمایت از حیوانات در طول آزمایش رعایت شد. حیوانات مورد بررسی در سالن‌هایی با دمای ۲۲-۲۴°C و درون قفس‌هایی از جنس پلی کربنات با ابعاد ۲۵×۴۰×۵۰ سانتی متر نگه داری می‌شدند. سقف این قفسه‌ها فلزی مشبک بوده و کف آن‌ها با تراشه چوب پوشیده شده بود. این فضاها با رطوبت کنترل شده ۵۰ تا ۶۰ درجه بوده، همچنین نوردهی با ۱۲ ساعت روشنایی و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم می‌شد. تغذیه این گونه موش‌ها نیز با کنسانتره انجام می‌شد و آب مورد نیاز نیز با لوله کشی شهر به صورت اختیاری مورد استفاده قرار می‌گرفت.

برای بیرون آوردن تخمدان‌ها، حیوانات با دو محلول کتامین ۱۰٪ و زیلازین ۲٪ به نسبت ۳ به ۱ به صورت تزریق درون ماهیچه‌ای بیهوش شدند. پس از بیرون کشیدن بافت تخمدان از ۸۰ تخمدان موجود، ۲۵ تخمدان برای گروه شاهد، ۲۵ تخمدان برای گروه انجماد و ۳۰ تخمدان برای آزمون سمیت در نظر گرفته شد. جهت انجام فرایند انجماد شیشه‌ای، تخمدان‌ها در دو مرحله آبدهی و آبگیری شدند.

مرحله اول در محیط تعادل (ES: اتیلن گلیکول به میزان 7.5 ml + دی متیل سولفوکسید به میزان 7.5 ml + FBS به میزان DMEM + 20 ml به میزان 65 ml) و مرحله دوم در محیط انجماد (VS: اتیلن گلیکول به میزان 15 ml + دی متیل سولفوکسید به میزان 15 ml + FBS به میزان DMEM + 20 ml به میزان 17.1 g + ساکارز به میزان 20 ml) قرار داده شدند. محیط پایه‌ای که برای انحلال ترکیبات ضد یخ مصرفی اتیلن گلیکول و دی متیل سولفوکسید استفاده شد، محیط DMEM به میزان ۸۰ درصد و

سرم FBS به میزان ۲۰ درصد بود. در ابتدا یکی از این دو محلول (اتیلن گلیکول یا دی متیل سولفوکسید) را به محیط پایه FBS اضافه کرده و پس از حل شدن و خنک سازی نسبی، ماده دوم اضافه شد. پس از تهیه محلول‌های تعادل و انجماد، محلول حاصل زیر هود لامینار با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر و سرنگ ۱۰ میلی لیتر فاقد پیستون فیلتر شدند زیرا خود پیستون می‌توانست برای اووسیت‌ها آسیب زا باشد.

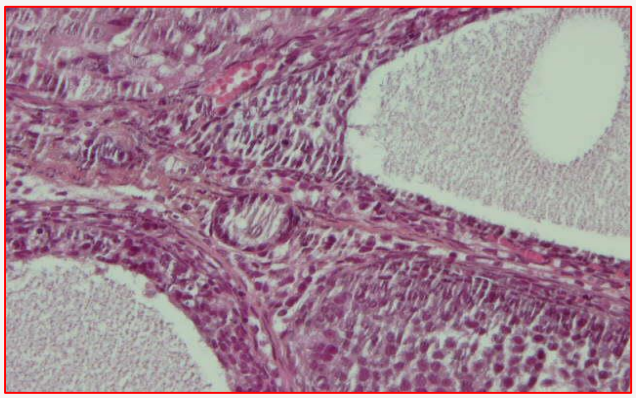
به منظور انجماد، تخمدان‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول تعادل و به مدت ۲ دقیقه در محلول انجماد قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در کرایوویال قرار گرفته و به تانک ازت منتقل و ذخیره شدند. پس از ۱، ۷ و ۳۰ روز، تخمدان‌ها از حالت انجماد خارج و در دمای آزمایشگاه (۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد) در محلول ذوب منتقل شدند. برای عمل ذوب از شیب غلظتی ساکاروز ۰، ۰/۵ و ۱ مولار استفاده شد (حل کردن یک مول ساکارز در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب). در ذوب، تخمدان‌ها ابتدا در محلول سوکروز ۱ مولار به مدت ۱ دقیقه و سپس در سوکروز ۰/۵ مولار به مدت ۳ دقیقه و بعد در آب به مدت ۳ دقیقه قرار گرفتند. شستشو نمونه‌ها در محیط پایه سرم جنینی گوساله (FBS) و محیط کشت سلولی DMEM به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

برای بررسی اثر سمیت محیط انجماد بر مرفولوژی تخمدان‌ها، تعدادی از تخمدان‌های اولیه (۳۰ عدد) به طور تصادفی انتخاب و تمامی مراحل آبگیری و آبدهی مطابق روش انجماد شیشه‌ای انجام شد و فقط مرحله انجماد حذف گردید. برای بررسی مرفولوژی، در محلول فرمالین ٪۱۰ قرار گرفته تا با کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزی برای بررسی‌های بافتی آماده گردند. کلیه تخمدان‌های منجمد شده و نشده (شاهد و آزمون سمیت) به روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری برای مرفولوژی فولیکول‌ها، شمارش فولیکولی، درصد فولیکول‌های بدوی، ترانزیشنال، اولیه، ثانویه، پرآنترال، آنترال و تکامل یافته سالم و تحلیل یافته در پنج گروه شاهد، انجماد ۲۴ ساعته، انجماد یک هفته، انجماد یک ماهه و آزمون سمیت با یکدیگر مقایسه شدند. در روش انجماد شیشه‌ای تعداد اووسیت‌های زنده مانده، تقسیم سلولی و تعداد بلاستوسیست ارزشیابی شد. همچنین میزان حاملگی برای هر جنین و تولد زنده بررسی گردید.

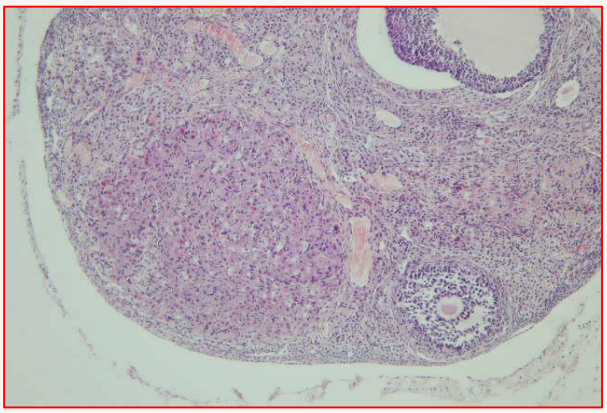
داده‌های مورد برر سی با نرم افزار آماری SPSS (18 version, IL, USA) بر اســـاس روش تجزیـه واریـانس یـک طرف (ANOVA) مقایسه شدند و کلیه گروه‌ها به وسیله آزمون توکی و آزمون‌های ناپارامتری مورد مقایسه قرار گرفتند. مقدار کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

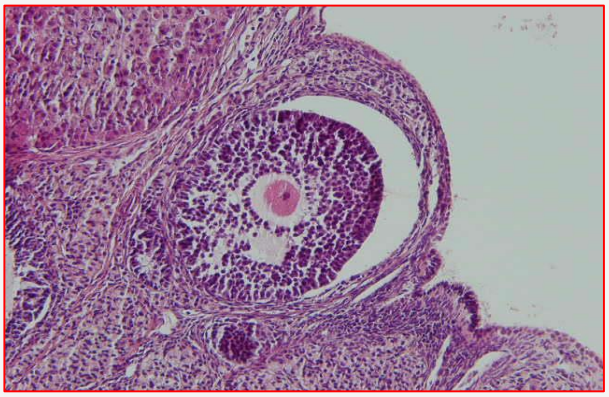
در گروه انجماد، مرفولوژی فولیکول‌های اولیه تخمدان‌های منجمد شده پس از ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل طبیعی



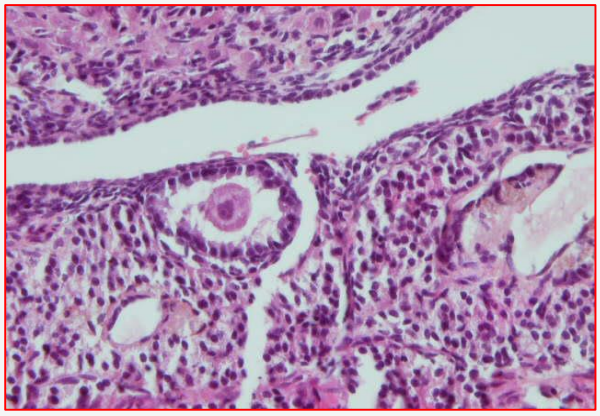
شکل ۱: فولیکول‌های گروه شاهد پس از یک ماه (400x-H&E)



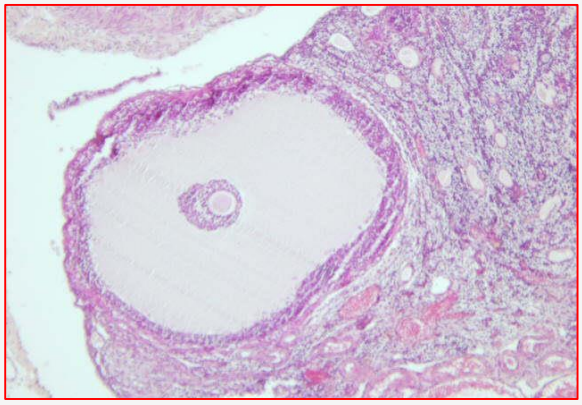
شکل ۲: فولیکول‌های گروه انجماد پس از گذشـت ۲۴ سـاعت (100x-H&E)



شکل ۳: فولیکول‌های گروه انجماد پس از گذشت ۱ هفته (400x-H&E)



شکل ۴: فولیکول‌های گروه انجماد پس از گذشت ۱ ماه (400x-H&E)



شکل ۵: فولیکول‌های گروه سمیت پس از گذشت ۱ ماه (250x-H&E)

بوده است (شکل ۱ و شکل ۲). تخمک‌ها کروی شکل و دارای غشا سلولی واضح، هسته کروی و یک هستک با رنگ پذیری بالا بودند. سلول‌های گرانولوزا مکعبی شکل با سیتوپلاسم بازوفیلیک، هسته کروی و یک یا چند هستک مشخص در یک یا دو لایه و دارای پتانسیل تقسیمی بالا بودند. سلول‌های تکا دوکی شکل با هسته‌های بیضی شکل در یک یا دو لایه قابل مشاهده بودند. پس از گذشت یک هفته (شکل ۳) و یک ماه (شکل ۴) هیچ اختلاف مورفولوژیکی بین گروه انجماد و کنترل دیده نشد. مشاهدات نشان داد که طول مدت زمان انجماد اثر چندانی بر مرفولوژی فولیکول‌ها نداشته است.

مرفولوژی فولیکول‌های اولیه در تخمدان‌هایی که برای بررسی تأثیر سمیت در مجاورت اتیلن گلیکول و دی متیل سولفوکسید قرار گرفته بودند و فقط مراحل آبگیری و آبدهی را بدون مرحله انجماد طی کرده بودند، هیچ اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشته است و از نظر رنگ پذیری و ساختمان ظاهری تخمک، سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های تکا مشابه گروه کنترل بودند (شکل ۵).

درصد فولیکول‌های سالم و آترتیک در مجموع کل فولیکول‌ها در گروه انجمادی و سمیت به ترتیب ۴۷/۵ و ۱۱/۹ بوده است. در بعضی نمونه‌ها جسم زرد واضحی دیده شد که نشانگر تکوین و بلوغ فولیکول‌ها تا مراحل پیشرفته بود. درصد فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه، آنترال و تکامل یافته به ترتیب ۳۴/۵، ۱۷/۷، ۱۷/۴، ۱۵/۲ و ۵۰/۳ بوده است. درصد فولیکول‌های سالم و آترتیک در گروه شاهد به ترتیب ۵۹/۶ و ۱۶/۸ بوده که در مقایسه با گروه انجماد و سمیت اختلاف معنی داری نداشت (جدول ۱ و ۲). در روش انجماد شیشه‌ای، ۹۱ درصد اووسیت‌ها زنده مانده، ۸۱ درصد دارای تقسیم سلولی و ۵۰ درصد دارای بلاستوسیت بوده‌اند. نتایج به دست آمده از بررسی نشان داده که بهترین روش انجماد بافت، آبگیری آن به مدت ۳۰ دقیقه با محلول ۱/۵ مول اتیلن گلیکول با ۱/۵ مول دی متیل سولفوکسید بوده است. همچنین نشان داده شد که افزودن ساکارز به محیط انجماد تأثیرسوء بر حفظ بافت تخمدان طی انجماد نداشته است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان با استفاده از اتیلن گلیکول و دی متیل سولفوکسید تغییرات مرفولوژیک

جدول ۱: اثر انجماد شیشه‌ای بر رده‌های مختلف فولیکولی بافت تخمدان رت

گروه	فولیکول تحلیل یافته	فولیکول تکامل یافته	فولیکول آنترال	فولیکول ثانویه	فولیکول اولیه	فولیکول بدوی	کل
شاهد ۱	۱۸	۴۷	۷	۱۶	۲۴	۲۳	۸۸
شاهد ۲	۸	۴۴	۱۰	۲۳	۱۱	۱۰	۶۲
شاهد ۳	۲۸	۹۹	۳۱	۳۷	۳۱	۳۹	۱۶۶
انجماد ۲۴ ساعته ۱	۴۴	۹۹	۲۰	۳۲	۴۷	۶۹	۲۱۲
انجماد ۲۴ ساعته ۲	۵	۲۹	۷	۱۵	۷	۹	۴۳
انجماد ۲۴ ساعته ۳	۱۲	۱۶	۳	۴	۹	۱۹	۴۷
انجماد یک هفته ۱	۱۳	۳۴	۵	۲۰	۹	۱۷	۶۴
انجماد یک هفته ۲	۳۶	۸۹	۲۵	۳۵	۲۹	۶۱	۱۸۶
انجماد یک هفته ۳	۵۰	۱۶۵	۵۰	۵۷	۵۸	۱۱۳	۳۲۸
انجماد یک ماهه ۱	۲۳	۷۶	۱۹	۳۳	۲۴	۳۶	۱۳۵
انجماد یک ماهه ۲	۱۵	۶۴	۱۵	۲۷	۲۲	۲۴	۱۰۳
انجماد یک ماهه ۳	۷	۲۸	۱۵	۲	۱۱	۲۴	۵۹
سمیت ۱	۱۵	۴۴	۱۳	۱۳	۱۸	۳۸	۹۷
سمیت ۲	۲۹	۷۳	۲۲	۲۹	۲۲	۵۵	۱۵۷
سمیت ۳	۲۲	۴۸	۹	۲۲	۱۷	۳۵	۱۰۵

خاصی را در فولیکول‌های اولیه ایجاد نکرده است و مدت زمان انجماد هیچ تأثیری بر کاهش کیفیت فولیکول‌ها نداشته است. قبلا نشان داده شده است که فرایند انجماد شیشه‌ای باعث حفظ انواع فولیکول‌های تخمدان می‌شود (۱۵)؛ لذا انجماد شیشه‌ای توانسته برای حفظ بافت تخمدان مناسب باشد.

صالح نیا (۲۰۰۲) با استفاده از روش انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان موش با بکارگیری اتیلن گلیکول و DMSO نشان داده است که تفاوت آماری معنی داری بین فولیکول‌های گروه‌های مختلف وجود نداشته است (۱۶) که مشابه نتایج مطالعه حاضر است (۱۶). Sugimoto و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان داده‌اند که انجماد شیشه‌ای تخمدان در رت‌های نابالغ با استفاده از محلول VS1 و پیوند آن‌ها به زیر کپسول کلیه همان رت‌ها پس از گذشت ۴۸ روز باعث شده که تعداد فولیکول‌های آنترال در تخمدان‌های منجمد و پیوند شده در مقایسه با تخمدان‌های تازه پیوند شده کمتر باشد ولی فعالیت اندوکرین تخمدان‌های منجمد شده و پیوند شده مشابه با گروه کنترل بوده است (۱۷). Kagabu و همکاران در سال ۲۰۰۰ با به کارگیری اتیلن گلیکول و DMSO مقایسه‌ای را بین گونه‌های موش، هامستر، خرگوش، میمون و رت انجام دادند. نتایج نشان داده است که روش انجماد شیشه‌ای می‌تواند روش خوبی برای حفظ مرفولوژی فولیکول‌های تخمدان باشد بدون این که اثر سمی بر آن‌ها داشته باشد (۱۸).

تاکنون مطالعات انجام شده درباره انجماد بافت تخمدان گونه‌های مختلف مثل موش (۱۹)، رت (۱۸)، گوسفند (۲۰)، خرگوش (۱۸)، انسان (۶ و۲۱)، گوساله، گاو (۱۲) و فیل (۲۰) صورت گرفته است. انجماد تأثیر منفی بر مرفولوژی فولیکول‌ها در مراحل تکوینی مثل فولیکول بدوی و فولیکول اولیه نداشته و هیچ اختلاف معنی داری از نظر تعداد فولیکول‌ها در گروه‌های منجمد شده و کنترل مشاهده نشده است.

اتیلن گلیکول با ویژگی نفوذ پذیری خود در انجماد تخمک و جنین کاربرد وسیعی دارد و تأثیر منفی بر پتانسیل تکاملی سلول

جدول ۲: درصد انواع رده‌های فولیکولی در گروه‌های مختلف.

گروه	شماره تکرار	درصد انواع رده‌های فولیکولی زنده					درصد فولیکول‌های تحلیل یافته%
		بدوی %	اولیه %	ثانویه %	آنترال %	تکامل یافته %	
شاهد	۱	۲۶/۱۴	۲۷/۲۷	۱۸/۱۹	۷/۹۵	۵۳/۴۱	۲۰/۴۵
	۲	۱۶/۱۳	۱۷/۷۴	۳۷/۱	۱۶/۱۳	۷۰/۹۷	۱۲/۹
	۳	۲۳/۴۹	۱۸/۶۷	۲۲/۲۹	۱۸/۶۷	۵۹/۶۳	۱۶/۸۸
انجماد ۲۴ ساعته	۱	۳۲/۵۵	۲۲/۱۷	۱۵/۱	۹/۴۳	۴۶/۷	۲۰/۷۵
	۲	۲۰/۹۳	۱۶/۲۸	۳۴/۸۸	۱۶/۲۸	۶۷/۴۴	۱۱/۶۳
	۳	۴۰/۴۳	۱۹/۱۵	۸/۵۱	۶/۳۸	۳۴/۰۴	۲۵/۵۳
انجماد یک هفته	۱	۲۶/۵۶	۱۴/۰۶	۳۱/۲۶	۷/۸۱	۵۳/۱۳	۲۰/۳۱
	۲	۳۲/۸	۱۵/۵۹	۱۸/۸۲	۱۳/۴۴	۴۷/۸۵	۱۹/۳۵
	۳	۳۴/۴۵	۱۷/۶۸	۱۷/۳۹	۱۵/۲۴	۵۰/۳۱	۱۵/۲۴
انجماد یک ماهه	۱	۲۶/۶۷	۱۷/۷۸	۲۴/۴۴	۱۴/۰۷	۵۶/۲۹	۱۷/۰۴
	۲	۲۳/۳	۲۱/۳۶	۲۶/۲۲	۱۴/۵۶	۶۲/۱۴	۱۴/۵۶
	۳	۴۰/۶۸	۱۸/۶۴	۳/۴	۲۵/۴۲	۴۷/۴۶	۱۱/۸۶
سمیت	۱	۳۹/۱۸	۱۸/۵۶	۱۳/۴	۱۳/۴	۴۵/۳۶	۱۵/۴۶
	۲	۳۵/۰۳	۱۴/۰۱	۱۸/۴۸	۱۴/۰۱	۴۶/۵	۱۸/۴۷
	۳	۳۳/۳۳	۱۶/۲	۲۰/۹۵	۸/۵۷	۴۵/۷۱	۲۰/۹۵

نداشته؛ لذا می‌تواند در انجماد شیشه‌ای مورد استفاده قرار گیرد. به همین دلیل در تحقیق حاضر از اتیلن گلیکول استفاده شده است (۲۲). نتایج به دست آمده از بررسی نشان داده که بهترین روش انجماد بافت، آب‌گیری آن به مدت ۳۰ دقیقه با محلول ۱/۵ مول اتیلن گلیکول با ۱/۵ مول دی متیل سولفوکسید بوده است. نیز افزودن ساکارز به محیط انجماد تأثیری بر حفظ بافت تخمدان طی انجماد نداشته است. نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه دیگری روی انجماد تخمک بالغ مجزا شده و جنین انجام شده مشخص کرده است که اتیلن گلیکول نفوذ پذیری بیشتری به سلول و بافت داشته و به راحتی آب بافتی را جذب کرده است. بنابراین صدمات وارد به سلول و بافت در طی انجماد و ذوب کمتر بوده است.

نتایج به دست آمده از بررسی نشان داده که بیشترین میزان زنده ماندن فولیکول‌های بدوی در تخمدان منجمد شده موش به روش کند با استفاده اتیلن گلیکول هنگامی است که زمان آبگیری و تعادل ۵ دقیقه باشد (۲۲) در این زمان نفوذ اتیلن گلیکول به درون غشاهای سلولی، غلظت اتیلن گلیکول و میزان نفوذ آن به داخل و خارج از سلول مورد توجه قرار می‌گیرد (۲۲). در بررسی‌های به عمل آمده از بافت تخمدان منجمد شده پس از ۴ ساعت کشت، تعداد زیادی فولیکول بدوی و اولیه مشابه با نمونه

کنترل یافت شد که نشان می‌دهد فرآیند دوباره گرم کردن بافت منجمد شده در محیط سرشار از مواد غذایی به سلول‌های فولیکولی اجازه می‌دهد که فعالیت متابولیکی را دوباره از سر گیرند و اندازه طبیعی خود را به دست آورده و مجدداً ارتباطات سلولی خود را حفظ کنند (۲۰). در انجماد بافت تخمدان و میزان زنده ماندن فولیکول‌ها درون بافت تخمدان محل قرار گرفتن فولیکول‌ها در تخمدان حائز اهمیت است (۲۰). فولیکول‌های اولیه و بدوی در نقاط سطحی تر تخمدان و فولیکول‌های ثانویه و آنترال در مناطق عمقی تر قرار گرفته‌اند، بنابراین میزان نفوذ و خروج ماده ضد انجماد در فولیکول‌هایی که در عمق تخمدان واقع شده‌اند سرعت بیشتری دارد . عواملی از جمله ناتوانی نفوذ ماده ضد انجماد به مرکز بافت و تشکیل کریستال یخ، بروز مشکلات اسمزی در طی مراحل برودت با گرم شدن و تعداد لایه‌های سلول‌های فولیکولر می‌تواند در بروز تغییرات مرفولوژی فولیکول‌های آنترال و پری آنترال موثر باشد. هر چه تعداد سلول‌های فولیکولر بیشتر باشند می‌تواند در برابر نفوذ یا خروج اتیلن گلیکول ممانعت بیشتری ایجاد کند.

Zhejiang و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده‌اند که ۸۰ درصد از فولیکول‌های بدوی و ۷۸ درصد از فولیکول‌های اولیه پس از انجماد و ذوب سالم ماندند (۲۳) که تاییدکننده نتایج مطالعه حاضر است اگر چه گزارش‌هایی مبنی بر آترزی و مرگ سلولی تعدادی از فولیکول‌های ثانویه و آنترال پس از گذشت چندین روز بعد از انجماد و ذوب بافت تخمدان نیز وجود دارد (۲۴). Salehnia و همکاران در سال ۲۰۰۲ با مطالعات فرا ساختمانی نشان دادند که سلول‌های فولیکولر و تخمک در فولیکول‌های اولیه پس از انجماد، مرفولوژی خود را حفظ کرده و اکثر اندامک‌های سلول شکل طبیعی خود را پس از انجماد حفظ کرده‌اند (۱۶) که مشابه نتایج مطالعه ما می‌باشد. Salehnia و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که پس از انجماد تخمدان، تغییرات فرا ساختمانی قابل ملاحظه‌ای در فولیکول‌های اولیه دیده نشد (۲۵) که شبیه یافته‌های مطالعه حاضر است. Nisolle و همکاران در سال ۲۰۰۰ نتیجه مشابه‌ای را اعلام نمودند (۲۶).

گزارش مشابه در رابطه با مورفولوژی گروه‌های انجمادی و غیر انجمادی پس از انجماد بافت تخمدان منتشر شده است (۲۷). همچنین نشان داده است که پس از پیوند تخمدان‌های انجماد شیشه‌ای، فولیکول‌های بدوی و اولیه دارای مرفولوژی طبیعی بودند (۱۹). نشان داده شده است که اووسیت‌های انسان نسبت به جنین‌های او حساسیت بیشتری نسبت به تغییر درجه حرارت و تغییرات اسمزی داشته‌اند و باعث کاهش قابل توجهی در سرعت ماندگاری شده است (به ترتیب ۶۷ و ۵۴ درصد) و سرعت حاملگی به نصف رسیده است (به ترتیب ۱۴/۲ و ۲۸/۲ درصد). در نهایت با استفاده از روش سرمایی درصد اووسیت‌ها به ترتیب ۳۳/۳۶ و ۴۲/۴۳ بوده است (۲۸).

اخیراً نشان داده شده است که تقسیم میوز می‌تواند با افزایش درجه حرارت بین ۶-۴ ساعت به حالت اولیه برگردد (۲۹). در روش انجماد شیشه‌ای، غلظت بالای مواد محافظ و سرعت سرد شدن سریع از تشکیل بلورهای یخی درون سلولی جلوگیری می‌کند که تایید کننده مطالعه حاضر است. در روش انجماد شیشه‌ای، ۹۱ درصد اووسیت‌ها زنده مانده، ۸۱ درصد دارای تقسیم سلولی و ۵۰ درصد دارای بلاستوسیست بوده‌اند. همچنین در این روش میزان حاملگی ۴۱ درصد برای هر جنین و ۱۱ درصد تولد زنده بوده است. در یک بررسی دیگر، میزان ماندگاری ۹۶/۷ درصد (میزان باروری ۷۶/۳ و ۸۲/۲ درصد). تقسیم سلولی در روز ۹۷/۸ درصد و ۹۴ درصد و سرعت تشکیل بلاستوسیست (۴۸/۷ درصد و ۴۷/۵ درصد) بوده است (۲۳). نیز، سرعت حاملگی برای هر انتقال جنین برای گروه انجماد شیشه‌ای ۶۵/۲ درصد بوده است. در گزارش دیگری با استفاده از روش انجماد شیشه‌ای، میزان ماندگاری اووسیت‌ها ۹۹/۳ درصد و میزان باروری ۹۳ درصد ، تقسیم سلولی ۹۶/۷ درصد، حاملگی ۳۲/۵ درصد و سرعت پیوند ۱۳/۲ درصد بوده است (۳۰).

نشان داده شده است که حفظ سرما در اووسیت‌های نابالغ می‌تواند در چرخه IVM موثر باشد. در بیماران با مشکلات تخمدانی قبل از بلوغ، تولد پس از حفظ سرمایی اووسیت‌های نابالغ گزارش شده است. در بیماران مبتلا به سندرم تخمدانی پلی سیستیک سرعت تقسیم سلولی ۹۰ درصد گزارش شده است (۲۵). روش‌های حفظ سرمایی قدیمی منجر به کاهش ۴۰-۳۰ درصدی پیوندهای جنینی شده است (۲۶). آزمایشات مربوط به انجماد جنین و حاملگی و تولد زنده جنین‌های منجمد و ذوب شده گزارش شده است (۳۱). در روش انجماد جنین تشکیل بلور یخ در داخل و خارج از سلول در زمان انجماد و ذوب کردن،

تأثیرات مضری را به غشاء سلول وارد کرده و منجر به شکسته شدن سیتوپلاسم و کاهش میزان ماندگاری سلول می‌شود (۲۶).

تأثیرات سمی مواد محافظ سرمایی نفوذ پذیر می‌تواند باعث شوک اسمزی برای سلول‌ها شود. این حالت بواسطه جایگزینی مولکول‌های آبی با پروتئین‌های اطراف صورت می‌گیرد (۲۶). پیوند بلاستومرهای آسیب دیده که اغلب با بلاستومرهای سالم وجود دارند نسبت به بلاستومرهای سالم بسیار کم هستند (۲۶). از آنجایی که بلاستوسیست‌ها شامل سلول‌های زیادی هستند، کمبود بعضی از سلول‌ها در طول مرحله انجماد باعث بوجود آمدن تاثیرات مضر کمتری برای پیشرفت جنینی می‌شود و رشد جنین‌ها همراه با کاهش زیستی آن‌ها پس از پیشرفت مرحله رشد، متوقف می‌شود و دستخوش روش حفظ سرمایی نمی‌شوند. در روش حفظ سرمایی جنین، جلوگیری از تشکیل بلورهای یخی و تأثیرات خطرناک آن همراه با روش انجماد آهسته، کاری دشوار به نظر می‌رسد. به طور کلی، قبل از ذخیره جنین‌ها در نیتروژن مایع، یک دوره طولانی مدت زمانی برای سنجش تجهیزات منجمد کننده با سرعت کنترل شده برای موفقیت روش حفظ سرمایی ضروری است. عواملی که برای پیشرفت موفقیت‌های روش حفظ سرمایی با روش انجماد آهسته مهم هستند شامل انتخاب مناسب ترین مواد محافظ سرمایی و دوره زمانی دقیق و درجه حرارت مناسب می‌باشد (۲۳).

بر پایه روش حفظ سرمایی که بر روی بیش از ۱۶۰۰۰ جنین انجام شده است، مشخص شده که روش انجماد شیشه‌ای منجر به سرعت ماندگاری بالاتر در مراحل رشد جنینی شده (۸۴ درصد) و در مقایسه با روش انجماد با سرعت آهسته، میزان حاملگی نیز در آن افزایش یافته است (۲۳). در انجماد شیشه‌ای جنین در مراحل اولیه نشان داده شده است که میزان ماندگاری جنین در حد بالایی می‌باشد (۸۰ درصد). بیشتر بررسی‌ها میزان حاملگی را بین ۳۰–۲۲ درصد گزارش کرده‌اند که یک درصد قابل قبول است (۲۳).

گزارش شده است که در روش انجماد شیشه‌ای جنین‌ها و تخم‌های بارور شده، میزان حاملگی ۳۵ درصد بوده است (۶). در کشورهایی که روش انجماد جنین‌های انسان در مراحل اولیه از نظر قانونی و یا دلایل مذهبی مجاز نیست، استفاده از روش انجماد شیشه‌ای می‌تواند روشی سودمند باشد (۳۲). نشان داده شده است که روش انجماد آهسته برای حفظ سرمای تخم‌های بارور شده انسان، میزان حاملگی در هر انتقال جنینی حدود ۱۰/۲ درصد می‌باشد، در حالی که با استفاده از روش انجماد شیشه‌ای میزان حاملگی ۳ برابر بیشتر شده است (۲). در روش انجماد شیشه‌ای در مرحله بلاستوسیست میزان ماندگاری ۱۰۰–۹۷/۵ درصد و میزان حاملگی ۵۳–۴۴ درصد بوده است (۱۴و ۱۸).

در لایه‌های تخمدانی منجمد شده به روش انجماد شیشه‌ای نسبت به دیگر روش‌های حفظ سرمایی فولیکول‌های در حال رشد بیشتر بوده است که موفقیت آمیز بودن انجماد شیشه‌ای در بافت‌های تخمدان گاو و انسان را نشان داده است. روش انجماد شیشه‌ای با کاهش درجه حرارت و افزایش میزان چسبندگی یک نمونه شامل غلظت بالایی از مواد محافظت سرمایی و کاملاً آب زدا را فراهم کرده است (۱۴). آگاهی از حداکثر غلظت درون سلولی مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر که یک نمونه می‌تواند بدون به مخاطره انداختن میزان ماندگاری داشته باشد، از اهمیت به سزایی برخوردار است (۱۴). این میزان همچنین به مقدار نمونه برای منجمد شدن بستگی دارد (۱۴). سرعت سرد شدن در بسیاری از نمونه‌های انجماد شیشه‌ای معمولا بیش از $-300^{o}C/min$ است (۲۰).

با توجه به این که در انجماد تخمدان در مقایسه با انجماد تخمک، از تعداد زیادی فولیکول در مراحل مختلف تکوینی و به دفعات در سیکل‌های متوالی می‌توان استفاده نمود و یافته‌های این بررسی که روش انجماد شیشه‌ای در مدت زمان‌های مختلف باعث هیچ‌گونه ناهنجاری مرفولوژیک و ساختاری در رده‌های مختلف فولیکولی بافت تخمدان نشده است، انجماد شیشه‌ای می‌تواند به عنوان روش مطلوبی در نگهداری رده‌های مختلف فولیکولی بافت تخمدان معرفی گردد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه آزاد اسلامی جهرم به لحاظ حمایت مالی طرح قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Klocke S, Bündgen N, Köster F, Eichenlaub-Ritter U, Griesinger G. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. Arch Gynecol Obstet. 2015;291(2):419-26
2. Herrero L, Pareja S, Aragonés M, Cobo A, Bronet F, Garcia-Velasco JA. Oocyte versus embryo vitrification for delayed embryo transfer: an observational study. Reprod Biomed Online. 2014;29(5):567-72.
3. Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, Mowla SJ. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. Fertil Steril. 2008;90(4 Suppl):1480-6.
4. Kavoussi SK, Fisseha S, Smith YR, Smith GM, Gago LA. Oocyte cryopreservation in a woman with mosaic Turner syndroe: a case report. Reprod Biomed. 2008;53(3):223-6.
5. Paynter SJ. A rational approach to oocyte cryopreservation. Reprod BioMed Online. 2005;10(5):578-86.
6. Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Yemini Z, et al. Monitoring the ovaries after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue: endocrine studies, in vitro fertilization cycles, and live birth. Fertil Steril. 2007;87(2): 418.e7-418.e15.
7. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. Fertil Steril. 2006;85(1):108-11.
8. Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. Reprod Biomed Online. 2004;9(2):152-63.
9. Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. Biol Reprod. 1994;50(1):103-10.
10. Amorim CA, Goncalves PB, Figueiredo JR. Cryopreservation of oocytes from pre-antral follicles. Hum Reprod Update. 2003;9(2):119-29.
11. Ambrosini G, Andrisani A, Porcu E, Rebellato E, Revelli A, Caserta D, et al. Oocytes cryopreservation: state of ART. Reprod Toxicol. 2006;22(2):250-62.
12. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature. 1985;313:573-5.
13. Donnez J, Jadoul P. What are the implications of myomas on fertility? A need for a debate?. Hum Reprod. 2002;17(6):1424-30.
14. Isachenko E, Isachenko V, Nawroth F, Rahimi G, Kreienberg R, Reinsberg J, et al. Human ovarian tissue preservation: is vitrification acceptable method for assisted reproduction? Cryo Letters. 2008;29(4):301-14.
15. Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. Fertil Steril. 2002;78(3):449-54.
16. Salehnia, M. Autograft of vitrified mouse ovaries using ethylene glycol as cryoprotectant. Exp Amin. 2002;51(5):509-12.
17. Sugimoto M, Maeda S, Manabe N, Miyamoto H. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. Theriogenology. 2000;53(5):1093-103.
18. Kagabu S, Umezu M. Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. Exp Anim. 2000;49(1):17-21.
19. 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(6):693-9.
20. Santana LN, Van den Hurk R, Oskam IC, Brito AB, Brito DC, Domingues SF, et al. Vitrification of ovarian tissue from primates and domestic ruminants: an overview. Biopreserv Biobank. 2012;10(3):288-94.
21. Kagawa N, Kuwayama M, Silber S. Successful vitrification method for bovine and human ovarian tissue: the cryotissue method. Hum Reprod. 2008;23:S145-51.
22. Desai N, Blackmon H, Szeptycki J, Goldfarb J. Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: post-vitrification development, pregnancy outcomes and live births. Reprod Biomed Online. 2007;14(2):208-13.
23. Pan Y, Xu X, Qian Y, Zhou C, Xu J. Morphology and cell proliferation evaluation of follicles from cryopreserved human ovarian tissue by vitrification. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2013;42(1):75-80.
24. Chen H, Wang Z, Li Z, Pan X. Research progress of ovarian tissue cryopreservation. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2011;28(4):847-50.
25. Salehnia M, Sheikhi M, Pourbeiranvand S, Lundqvist M. Apoptosis of human ovarian tissue is not increased by either vitrification or rapid cooling. Reprod Biomed Online. 2012;25(5):492-9.
26. Nisolle M, Roux F, Qu J, Motta P, Donnez J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenograft in nudes mine. Fert Steril. 2000;74(1):122-9.
27. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology. 2004;48(2):146-56.
28. Gosden RG. Prospects for oocyte banking and in vitro maturation. Natl Cancer Inst Monogr. 2005;34:60-3.
29. Dominguez F, Castello D, Remohí J, Simón C, Cobo A. Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. Fertil Steril. 2013;99(2):565-72.

30. Picton HM, Gasden RG. In vitro growth of human primordial follicles from frozen-Banked ovarian tissue. Mol Cell Endocrinol. 2000;166(1):27-35.
31. Sathananthan AH, Ng SC, Trounson AO, Bongso A, Ratnam SS, Ho J, et al. The effects of ultra-speed freezing on meiotic and mitotic spindles of oocytes and embryos. Gam Res. 1998;21(4):385-401.
32. Bastings L, Beerendonk CC, Westphal JR, Massuger LF, Kaal SE, van Leeuwen FE, et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in cancer survivors and the risk of reintroducing malignancy: a systematic review. Hum Reprod Update. 2013;19(5):483-506.

Original Article

The Effect of Vitrification on Follicular Morphology of Ovarian Rat

Esmaeilzadeh F[1], Hamedi L[2], Mehrabani D[3]*, Bidshahri A[2], Tanideh N[3]

1. Department of Chemistry, Islamic Azad University, Marvdasht Branch, Marvdasht, Iran
2. Department of Biology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran
3. Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 16 Jan 2015 Accepted: 22 May 2015

Abstract

Background & Objective: Some efforts have been made for keeping cryopreservation of gametes and embryos safe, including new vitrification methods of the ovary. This study evaluates the effect of ethylene glycole vitrification on follicular morphology of ovarian rat.

Materials & Methods: Eighty ovaries belonging to 40 rats are divided into 2 groups. Twenty five ovaries are control group, 25 the vitrification, and30 toxicologic effects. For freezing, equilibrium solution, ethylene glycole and methyl sulfoxide are used. For defreezeing, different concentrations of saccharose and for morphological evaluation, H&E staining are undertaken. The number of healthy and atretic follicles are determined after 24 hours, 1 week and one month after vitrification.

Results: No morphological changes are observed in all follicular cells. The percent of primordial, primary, secondary, anthral and developed follicles in the vitrification group are 34.5%, 17.7%, 17.4%, 15.2% and 50.3%. In vitrification and toxicological groups, the percent of both normal and atretic follicles is 47.5% and 11.9%. These figures for the control group were 59.7% and 16.9%. In vitrification method, 91% of oocytes are viable, 81% have mitosis, and 50% enters blastocyst stage.

Conclusion: Because in vitrification of ovary in comparison with the follicles, many types of follicles in different cycles can be recovered with no morphological and structural changes, vitrification of ovary can be a safe method for cryopreservation of the oocytes

***Keywords*:** **Vitrification, Follicle, Oocyte, Ovary, Morphology, Rat**

*** Corresponding author: Davood Mehrabani**, Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Tel: +987132341025
Email: mehrabad@sums.ac.ir