

## 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.\*\*\*، پوپک افتخاری یزدی Ph.D.\*، عبدالحسین شاهرودی Ph.D.\*

\* پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

\*\* گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...

\*\*\* گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک

\*\*\*\* گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: بهمن‌ماه ۸۷، تاریخ پذیرش: فروردین‌ماه ۸۷

### چکیده

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

**مواد و روشها:** تخمدان موشهای ۴ روزه 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 در گروه 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 در دو 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 در 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 (۹۷/۴٪) 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 قطر فولیکولها پس از گذشت چهار روز در گروه انجمادی نسبت به دو گروه سمی شده و کنترل، کاهش معنی داری داشت ( $P<0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** علیرغم معنی دار بودن تفاوت در بقا و قطر فولیکولهای پراآنترال در گروه انجمادی نسبت به کنترل، فولیکولهای پراآنترال 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 پراآنترال، کرایوتاپ

## مقدمه

پیشرفت‌ها در تشخیص و درمان سرطانها در دوران کودکی، نوجوانی و بلوغ تا حد زیادی منجر به افزایش جمعیت بازمانده‌های نوجوان و بالغ، از بدخیمی‌های دوران کودکی می‌شود. چنانچه بر اساس آمار موجود یک نفر از هر ۲۵۰ نفر جمعیت 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 تخمکها هستند انجماد بافت تخمدان قبل از شروع درمان برای خانمهای جوانی که تحت شیمی درمانی و پرتودرمانی قرار گرفته یا مبتلا به بیماریهای ژنتیکی و خاصی هستند مفید خواهد بود، به خصوص در دختران 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 پیچیده‌ای دارد و متشکل از چندین نوع مختلف سلولی از جمله سلولهای استرومایی و فولیکولها است که خود فولیکولها نیز حاوی تخمک، سلولهای گرانولوزا و سلولهای تکا است. از آن جا که انواع مختلف سلولها نیازهای متفاوتی برای بقای بهینه (Optimum) دارند

انجماد بافت تخمدان سخت تر است [۲ و ۴]. 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 شیشه‌ای. انجماد تخمدان اغلب با استفاده از انجماد آهسته انجام می‌شود. این روش به دلیل استفاده از ماشینهای کنترل کننده انجماد، یک روش گران قیمت است و همچنین می‌تواند 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 از غلظتهای بالای ضد یخ به صورت جامد شیشه‌ای و شفاف، بدون تشکیل کریستال یخ قابل انجام است [۶ و ۷]. در برخی مطالعات، انجماد شیشه‌ای موفق در تخمدان موش و انسان گزارش شده است [۸ و ۹]. همچنین تولد نوزاد پس از کشت آزمایشگاهی کمپلکس اووسیت- سلولهای گرانولوزا (OGC: Oocyte Cumulus Complex) حاصل از فولیکولهای پراآنترال 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

## مواد و روشها

تهیه تخمدانها: در این مطالعه از موشهای ۱۴ روزه نژاد NMRI 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 TCM199 buffering HEPES 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 TCM199 buffering HEPES به همراه DMSO ۱۵ درصد، EG ۱۵ درصد، ساکارز ۰/۵ مولار و HSA ۲۰ درصد منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ 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 (شکل ۱). این صفحات به سرعت در نیتروژن مایع فرو برده شده و پوشش سرانها 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 TCM199 buffering HEPES حاوی ساکارز ۱ مولار و HSA ۲۰ درصد شده و تخمدانها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در این محلول باقی ماندند. سپس تخمدانها به محیط کشت MEM حاوی FBS ۱۰ درصد و ترکیب آنتی بیوتیکی (۱۰۰ IU/ml

محلولهای انجمادی استفاده شده، تا کنون استراتژیهای مختلفی از جمله استفاده از گریدهای میکروسکوپ الکترونی [۱۰]، میکروقطره‌ها (micro droplet) [۱۱ و ۱۲]، نی‌های پلاستیکی کشیده شده باز (OPS) [۱۳]، شیشه‌های کم قطر و موی سان (Glass capillaries) [۱۴]، استفاده از سطح سرد شده برای انجماد شیشه‌ای (SSV) [۱۵] و کرایولوپ [۱۶] پیشنهاد شده است.

در هر یک از این 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 از منطقه دمایی حیاتی در حضور عوامل ضدیخ عبور کند [۱۷ و ۱۸]. 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 [۶]. 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 [۶].

در این مطالعه، هدف انجماد شیشه‌ای تخمدانهای موش نابالغ توسط کرایوتاپ و بررسی اثر این روش انجمادی بر مورفولوژی و بقای فولیکولهای پرائنترال است. به این منظور تخمدانها با کمک کرایوتاپ و با استفاده از ساکارز و ترکیبی از ضدیخهای EG و DMSO منجمد شده و پس از ذوب کردن، فولیکولهای پرائنترال جدا شده از تخمدان به مدت ۴ روز کشت داده شدند. همچنین در این مطالعه سمیت ضدیخهای استفاده شده نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

FBS ۱۰ درصد و ترکیب آنتی بیوتیکی (۱۰۰ IU پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (۱۰۰ μg/ml) استرپتومایسین و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر (۰/۲۵ μg/ml) آمفوتریسین B) انتقال یافتند. فولیکولهای پراآنترال به وسیله تشریح مکانیکی از تخمدانها رها و برای کشت انتخاب شدند. فولیکولهایی برای کشت انتخاب شدند که پس از جداسازی ساختار فولیکولی سالم و کروی خود را حفظ کرده و دارای دو تا سه لایه سلولهای گرانولوزا و قطر ۱۰۰-۱۳۰ میکرومتر باشند در این فولیکولها، اووسیتها گرد و قابل مشاهده بود و در مرکز فولیکول قرار گرفته داشت.

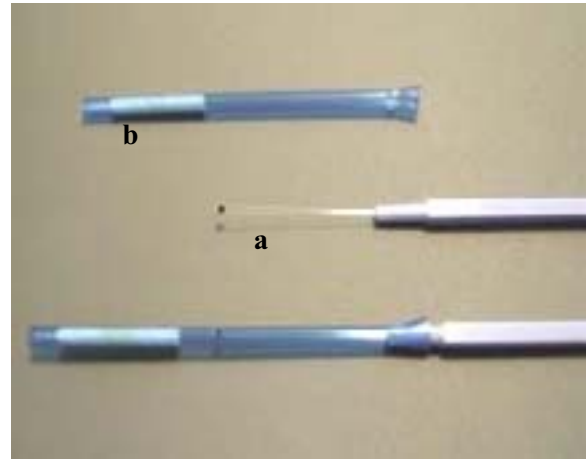
### کشت آزمایشگاهی فولیکولهای پراآنترال

فولیکولهای پراآنترال جدا شده به طور منفرد در محیط کشت MEM-α حاوی ۱۰۰ mIU/ml hFSH، ITS (۱۰ μg/ml انسولین، ۵/۵ μg/ml ترنسفرین ۶۷ ng/ml سلنیوم) و ۵ درصد کشت داده شدند. ۲۰ فولیکول به طور منفرد در یک پتری دیش کشت حاوی ۲۰ قطره ۱۰ میکرولیتری پوشیده شده با ۵ میلی لیتر روغن مینرال، در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> قرار گرفتند. در دومین روز کشت، ۱۰ میکرولیتر محیط کشت تازه به هر قطره اضافه شد. در اولین چهارمین روز کشت، قطر فولیکولها بدون در نظر گرفتن سلولهای تکا اندازه گیری شدند. این سنجش قطر با یک میکرومتر چشمی در میکروسکوپ معکوس و با اندازه گیری دو قطر عمود بر هم انجام شد.

### آنالیز آماری

درصد فولیکولهای پراآنترال بقای یافته پس از چهار روز به وسیله Z-test محاسبه و از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد (p<0.05). مقایسه قطر فولیکولهای پراآنترال بقا یافته بین

پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (۱۰۰ μg/ml) استرپتومایسین و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر (۰/۲۵ μg/ml) آمفوتریسین B) منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند.



شکل ۱. کرایوتاپ استفاده شده در انجماد تخمدان موش

(a) صفحه پلی استری که نمونه روی آن قرار می گیرد.

(b) پوشش پوشاننده صفحه پلی استری

### تست سمیت (توکسی سیتی)

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

### مطالعات بافت شناسی

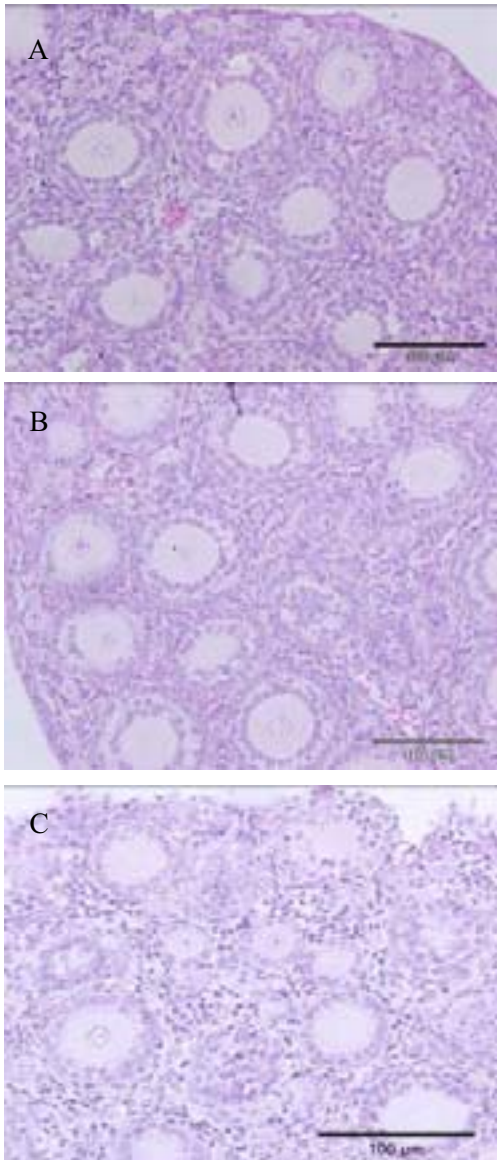
تخمدانها، از هر سه گروه به مدت ۲۴ ساعت در تثبیت کننده بوئن تثبیت و پس از آماده سازی در قالبهای پارافین قرار داده شده و به ضخامت ۵ میکرومتر برش زده شدند. برشها پس از قرار گیری روی لام با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند.

### جداسازی مکانیکی و انتخاب فولیکولهای

#### پراآنترال به منظور کشت آزمایشگاهی

تخمدانها به قطره‌های ۲۰۰ میکرولیتری محیط αMEM حاوی

تفاوت نداشت. هرچند میزان بقای در گروه انجمادی نسبت به گروه توکسی سیتی و کنترل کاهش معنی داری داشت اما از میزان بالایی (۹۲٪) برخوردار بود (p<0.05).



شکل ۲. بررسی اثر سمیت ضدیخها و انجماد و ذوب، بر تخمدان‌های موش، بار:

۱۰۰ میکرومتر، رنگ آمیزی: H&E.

(A) برش از تخمدان در گروه کنترل

(B) برش از تخمدان در گروه تست سمیت

(C) برش از تخمدان در گروه انجمادی

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

هر سه گروه با استفاده از Duncan test Multiple range 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 انجمادی و سمی شده، شباهت مورفولوژیکی با برشهای گروه کنترل داشتند و هیچ تفاوت چشمگیری در این برشها مشاهده نشد (شکل ۲: A, B, C).

قسمت اعظم فولیکولهای پرآنترال در برشهای گروه انجمادی، دارای تخمکی با سیتوپلاسم یکنواخت و ژرمینال و زیگول مرکزی بود که این وضعیت در گروه سمی شده و کنترل 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 (شکل ۳: A, B, C).

### 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 طور که دیده می شود میزان بقا در گروه سمی شده (۹۷/۴٪) نسبت به گروه کنترل

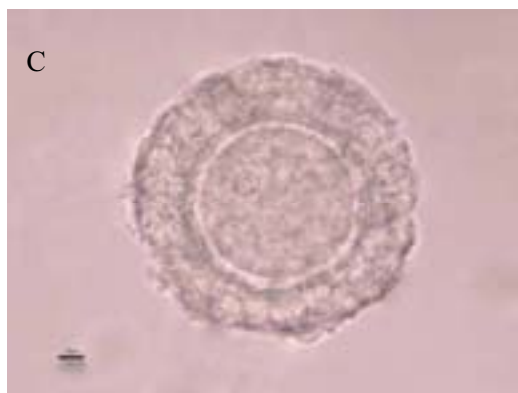
جدول ۱. مقایسه میزان بقای فولیکولهای پرآنترال حاصل از تخمدانها در گروههای مورد مطالعه پس از چهار روز کشت

| تعداد فولیکولها |              |           |
|-----------------|--------------|-----------|
| بقای یافته      | کشت داده شده | فولیکولها |
| ۴۶۰ (۹۸/۷%) a   | ۴۶۶          | کنترل     |
| ۳۴۴ (۹۷/۴ %) b  | ۳۵۰          | سمی شده   |
| ۳۲۹ (۹۲/۷%) c   | ۳۵۵          | انجمادی   |

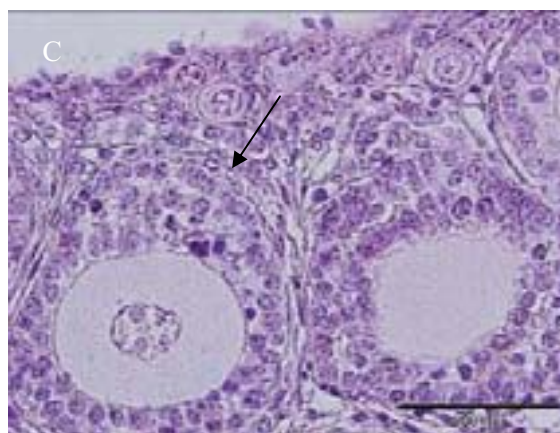
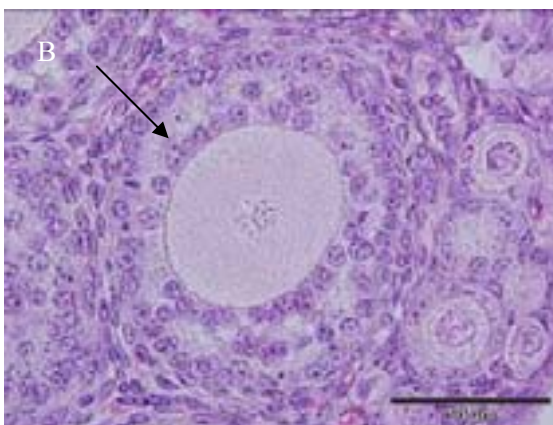
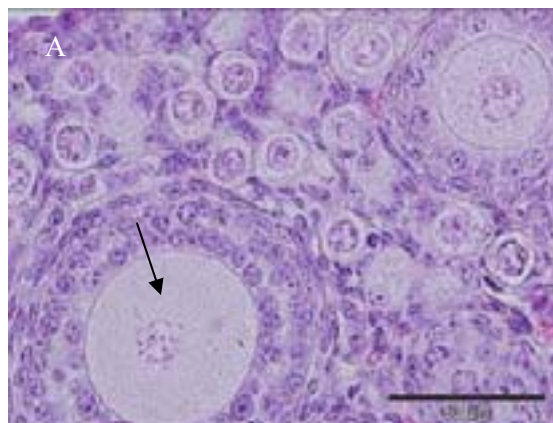
عدم وجود اختلاف معنی دار بین a و b ( $p>0.05$ )

اختلاف معنی دار بین b و c ( $p<0.05$ )

اختلاف معنی دار بین a و c ( $p<0.0001$ )



شکل ۴. فولیکولهای پرآنترال جدا شده از (A) تخمدان در گروه کنترل، (B) تخمدان در گروه سمی شده، (C) تخمدان در گروه انجمادی.



شکل ۳. مقایسه فولیکولهای پریموردیال و پرآنترال در برشهای تخمدانی موش در سه گروه آزمایشی، بار: ۵۰ میکرومتر رنگ آمیزی: H&E

(A) برش از تخمدان در گروه کنترل  
 (B) برش از تخمدان در گروه تست سمیت  
 (C) برش از تخمدان در گروه انجمادی  
 هیچ تفاوت چشمگیری در فولیکولهای پریموردیال و پرآنترال بین سه برش فوق دیده نشد.  
 (فلشها نشان دهنده فولیکولهای پرآنترال هستند.)

## میزان رشد فولیکولی

میانگین قطر فولیکولها در گروههای انجمادی، سمی شده و کنترل در روز صفر به ترتیب  $111/1 \pm 9/1$ ،  $112 \pm 113$  و  $120/2 \pm 9/6$  و در روز چهارم  $127/8 \pm 19/6$ ،  $145/9 \pm 26/5$  و  $156/3 \pm 30$  میکرومتر بود. جدول ۲ 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 انجمادی  $16/63$  میکرومتر بود که نسبت به گروه کنترل و سمی شده اختلاف معنی داری داشت ( $p < 0.05$ ).

جدول ۲. مقایسه رشد فولیکولی پس از چهار روز، بین گروههای مورد مطالعه

| گروهها  | میانگین افزایش قطر | گروههای Duncan |
|---------|--------------------|----------------|
| 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 نسبتاً جدید است که نیاز به استفاده از تجهیزات گران قیمت ندارد و بافت به همراه سلولها برای مدت کوتاهی در معرض غلظت بالای ضد یخ قرار می‌گیرد. با این روش تشکیل ساختارهای شبه کریستالی آمورف نسبت به کریستالهای واقعی [۲] شاید به دلیل اسمولاریته بالای محلولهای ضد یخ القا می‌شود. بنابراین طی انجماد شیشه‌ای،

سرد کردن آنددر سریع است که آسیبهای ساختاری در نتیجه تشکیل کریستال یخ اتفاق نیفتاده و ساختار جامد شبه شیشه‌ای به جای کریستال تشکیل می‌شود [۱۹]. در روشهای انجماد آهسته غلظت ضد یخها به ۱ یا ۱/۵ مولار محدود شده است و بنابراین سمیت ضد یخها نیز پایین است. در حالی که همان طور که گفته شد، غلظتهای استفاده شده برای انجماد شیشه‌ای بسیار بالاتر است و گاهی اوقات می‌تواند به بالاتر از ۸ مولار برسد [۲۰]. بنابراین ضرورت استفاده از غلظتهای بالای ضد یخها به دلیل ارتباط قوی بین غلظت ضد یخها و سرعت انجماد و ذوب طی پروسه انجماد شیشه‌ای است [۲۰] که می‌تواند به دلیل آثار سمی و اسموتیک این ضد یخها، موجب آسیب سلولی شود [۲۱].

بنابراین انتخاب ضد یخها با سمیت کم، برای انجماد شیشه‌ای ضروری است. در حال حاضر DMSO و EG معمولترین ضد یخهای نفوذ پذیر هستند. DMSO نفوذ پذیری بالاتری نسبت به EG داشته و سمیت آن نیز بیشتر است [۲۲].

Rodrigues پس از بررسی آثار گلیسرول، EG، DMSO و پروپیلن گلیکول بر مورفولوژی فولیکولهای پراکتال نتیجه گرفت که EG و DMSO بهترین ضد یخها هستند [۲۳ و ۲۴]. به دنبال نتایج به دست آمده توسط Hasegawa [۳] که از ترکیب DMSO ۱۵ درصد، EG ۱۵ درصد و ساکارز ۵/۰ مولار به 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 ضد یخی در انجماد شیشه‌ای تخمدان، اثرهای منفی بر مورفولوژی، بقا و رشد فولیکولهای پراکتال موش ندارد.

ساتوس (Santos) نشان داد که وضعیت بقای فولیکولهای پراکتال منجمد شده پس از کشت آزمایشگاهی نسبت به زمان ذوب دقیق تر تعیین می‌شود. بنا بر این کشت

بررسی قرار داد و پیشنهاد کرد که میزان رشد پایین فولیکولهای منجمد و ذوب 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 در انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان موش می باشد. این روش برای اولین بار برای انجماد شیشه‌ای اووسیت و جنین استفاده شد و اخیراً با اندکی تغییرات برای انجماد بافت تخمدان استفاده شده است [۳ و ۲۸].

در مطالعه حاضر از روش هاسگاوا (Hasegawa) برای انجماد بافت تخمدان استفاده شد؛ به این ترتیب که پس از قرار گرفتن دو مرحله‌ای نمونه در محلولهای 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  $23/000^{\circ}\text{C}/\text{min}$  و  $42/000^{\circ}\text{C}/\text{min}$  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 پراآنترال می شود و شاید بتوان در آینده از این روش برای انجماد نمونه‌های انسانی نیز استفاده کرد.

آزمایشگاهی فولیکولهای پراآنترال یک ابزار مهم برای ارزیابی موفقیت انجماد بافت تخمدان به نظر می رسد [۲۵]. در فولیکولهای پراآنترال که در معرض پروسه انجماد و ذوب قرار گرفته اند، آبیگری، 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 و ذوب شده قادر به بقا و ادامه رشد خواهند بود یا خیر، این فولیکولها به محیط کشت منتقل شدند. فولیکولهای پراآنترال حاصل از بافت تخمدان منجمد شده به وسیله کرایوتاپ در هنگام تشریح، مورفولوژی خوب و کاملاً شبیه به فولیکولهای بافت تخمدانی کنترل داشتند و توانستند مورفولوژی خوب خود را پس از چهار روز نیز حفظ 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 پراآنترال موشی جدا شده از بافت تخمدانی منجمد و ذوب شده را مورد

## References

1. **Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck 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, Iucci 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, Iucci 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 Haefen 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: structural 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.