مقایسه بقا و تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان انجماد شیشه‌ای شده موش سوری با تخمدان تازه در محیط کشت

طاهره مازوچی [۱]، مژده صالح‌نیا [۲*]، مجتبی رضازاده [۳]، سیدجواد مولی [٤]، ابراهیم حاجی‌زاده [٥]

خلاصه

سابقه و هدف: یکی از روش‌های نگهداری بافت تخمدانی به منظور حفظ قدرت باروری، انجماد شیشه‌ای است که روشی ساده و فوق سریع است. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی رشد و بقای فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان انجماد شیشه‌ای شده موش سوری در محیط کشت و مقایسه آن با تخمدان تازه بود.

مواد و روش‌ها: این تحقیق به روش تجربی بر روی ۲۰ موش ماده‌ی سوری ۱٤روزه، نژاد NMRI انجام شد. یک تخمدان به روش انجماد شیشه‌ای با استفاده از ضد یخ اتیلن گلیکول، فایکول و ساکارز (EGFS40)، منجمد و پس از یک هفته نگهداری در نیتروژن مایع، با روش سریع و با به کارگیری غلظت‌های نزولی ساکارز ذوب و شستشو شد. تخمدان دیگر به عنوان گروه شاهد تازه در نظر گرفته شد. فولیکول‌های پره‌آنترال با قطر ۱۳۰-۱۰۰ میکرون به روش مکانیکی از گروه تخمدان انجمادی و همچنین گروه شاهد تازه جدا و سپس به مدت ۱۰ روز کشت داده شدند. محیط مورد استفاده α-MEM حاوی ۵٪ FBS، ۱۰۰ mIU/ml rFSH، ITS یک درصد، ۲۰ ng/ml mrEGF و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۱۰۰ IU/ml و استرپتومایسین ۱۰۰µg/ml بود. قطر فولیکول‌ها با آزمون t و میزان بقا و تشکیل حفره‌ی آنتروم با آزمون χ^2 مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج: فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان منجمد ـ ذوب شده مشابه گروه تازه در محیط کشت زنده مانده و رشد کردند. میزان بقای فولیکول‌ها در روز ششم کشت در گروه انجمادی ۷۲/۱٪ و در گروه تازه ۷۸/٦٪ بود. در روز دهم کشت این اعداد به ترتیب ٦٦/۹٪ و ۷۲/٦٪ بود. تشکیل حفره‌ی آنتروم در فولیکول‌های زنده‌ی گروه انجمادی و گروه تازه ۳۷/٦٪ و ٤۳/۵٪ در روز دهم کشت مشاهده شد. میانگین قطر فولیکول‌ها در گروه تازه و گروه انجمادی در روز دوم کشت به ترتیب ۱۱/۲۳±۱۵۸/۱۱ و۸/۳۵±۱۵۵/٤۸ و در روز چهارم کشت ۹/۸۷±۲۰۱/۵٦ و ۸/٤٦±۱۹۳/٤۲ بود. بین دو گروه در هیچ‌کدام از متغیرهای مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق نشان داد که فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان انجماد شیشه‌ای شده می‌توانند مشابه تخمدان تازه در محیط کشت زنده باقی مانده، رشد کرده و تشکیل حفره آنتروم دهند.

واژگان کلیدی: انجماد شیشه‌ای، تخمدان، محیط کشت، فولیکول، موش سوری

۱- دانشجوی دکتری علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

۲- دانشیار گروه علوم تشریح دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران

۳- استاد گروه علوم تشریح دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران

٤- دانشیار گروه ژنتیک دانشکده‌ی علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس تهران

۵- دانشیار گروه آمار حیاتی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران

* **نویسنده مسوول:** مژده صالح نیا

آدرس: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس

پست الکترونیک: mogdeh@dr.com

تلفن: ۸۸۰۱۱۰۰۱ ۰۲۱

دورنویس: ۸۸۰۱۳۰۳۰ ۰۲۱

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۵

تاریخ پذیرش نهایی: ۸٦/۱/۲٦

مقدمه

انجماد بافت تخمدان روش مناسبی است برای حفظ باروری در خانم‌های در معرض خطر نارسایی زودرس تخمدان و همچنین خانم‌های جوان مبتلا به سرطان که احتیاج به شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی دارند. برای برگرداندن قدرت باروری بعد از انجماد و ذوب تخمدان دو روش وجود دارد: یکی پیوند و دیگری کشت

و بلوغ فولیکول‌های تخمدانی در شرایط آزمایشگاهی (In vitro culture and maturation; IVC-IVM) [۵-۱]. کاربرد روش پیوند بعد از انجماد دو مشکل اساسی دارد: یکی انتقال سلول‌های سرطانی در خانم‌های جوان مبتلا به سرطان که به منظور حفظ باروری قبل از شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی، تخمدان‌های آن‌ها منجمد شده‌اند و دیگری ایسکمی پس از پیوند [٦، ۷]. روش IVC-IVM فولیکول‌های تخمدانی روش دیگری برای به دست آوردن تخمک‌های بالغ از تخمدان‌های منجمد ـ ذوب شده است [۷، ۸]. در IVM صدمات وارد شده به فرد جهت تحریک تخمک‌گذاری و استفاده از رژیم‌های مختلف هورمونی کاهش می‌یابد و فرد از این خطرات مصون می‌ماند. همچنین امکان به دست آوردن تعداد بیشتری تخمک با شرایط نسبتا یکسان فراهم می‌آید [۱]. در تخمدان افراد جوان تعداد قابل ملاحظه‌ای فولیکول‌های پره‌آنترال وجود دارد که به دلیل موقعیت قشری این فولیکول‌ها در تخمدان و همچنین ساختمان آن‌ها که به نظر می‌رسد نسبت به انجماد مقاوم باشند، منبع خوبی برای تولید تخمک‌های بالغ پس از انجماد خواهند بود. میزان بقا و رشد فولیکول‌های تخمدانی در محیط کشت در تحقیقات مختلف بر حسب روش انجماد، محلول انجمادی و محیط کشت به کار رفته متفاوت بوده است. انجماد بافت تخمدان معمولا به روش آهسته انجام می‌گیرد. Cecconi و همکاران به مقایسه‌ی بلوغ فولیکول‌های پره‌آنترال گوسفند جدا شده از کورتکس تخمدان انجمادی و تازه پرداختند. روش انجمادی آن‌ها آهسته بود و میانگین قطر فولیکول‌ها و تشکیل حفره‌ی آنتروم پس از ۱۰ روز در گروه انجمادی نسبت به تازه اختلاف معنی‌داری نداشت [۹]. Newton و همکاران تشکیل حفره‌ی آنتروم و ترشح استرادیول را در مجموعه‌ی سلول‌های گرانولوزا ـ اووسیت جدا شده از تخمدان گوسفند انجمادی به روش آهسته و با استفاده از محلول دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) را گزارش کردند [۱۰]. در مطالعه‌ی liu و همکاران در سال ۲۰۰۳ میزان بقای فولیکول‌های جدا شده از تخمدان موش سوری انجمادی با روش آهسته پس از ۱۲ روز کشت با گروه تازه اختلاف معنی‌داری نداشت [۱]. در تحقیق دیگری در سال ۲۰۰۱ Newton و Illingworth رشد و بلوغ فولیکول‌ها پس از انجماد شیشه‌ای و آهسته‌ی تخمدان موش سوری را با فولیکول‌های جدا شده از تخمدان‌های تازه مقایسه کردند. نتایج نشان داد که فولیکول‌های جدا شده از بافت منجمد ـ ذوب شده تا مرحله‌ی آنترال رشد نموده و اووسیت بالغ تولید کردند. میزان بقای فولیکول‌ها در محیط کشت در دو گروه، یعنی انجماد آهسته و شیشه‌ای در مقایسه با گروه تازه کمتر بود و اختلاف معنی‌داری نشان داد. محلول انجماد شیشه‌ای در تحقیق آن‌ها دی‌متیل‌سولفوکساید و پروپیلن گلیکول هر کدام ۲۰٪ بود [۱۱]. با توجه به این که انجماد شیشه‌ای روشی ساده، سریع و کم‌هزینه است و تغییرات مورفولوژیکی درست بعد از ذوب و همچنین پس از پیوند اتوگرافت بر روی فولیکول‌های تخمدانی نشان داده نشده است [۱۵-۱۲] در این تحقیق بر آن شدیم که به بررسی میزان بقا و رشد فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان‌های انجماد شیشه‌ای با استفاده از اتیلن‌گلیکول، فایکول و ساکارز در محیط کشت بپردازیم. امید است با انجام این تحقیق بتوان گامی در جهت بهبود روش‌های مناسب حفظ باروری به ویژه در خانم‌هایی که در معرض خطر نارسایی زودرس تخمدان هستند برداشت.

مواد و روش‌ها

تهیه بافت تخمدان: این مطالعه به روش تجربی (Randomized control trial) بر روی ۲۰ سر موش سوری ماده، نژاد NMRI با سن دو هفته انجام گرفت. موش‌ها به روش جا به جایی مهره‌های گردنی کشته شدند. تخمدان‌های آنها جدا و داخل محیط α-MEM (α-minimal essential medium; Gibco, U.K) محتوی ۵٪ FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco, U.K) قرار داده شدند. پس از برداشتن بافت‌های اطراف، تخمدان‌ها به طور تصادفی در دو گروه انجمادی و تازه قرار گرفتند. جهت بررسی تاثیر منفی و اثرات مخرب ضد یخ به کار رفته بر میزان زنده ماندن فولیکول‌ها، تمام مراحل آب‌گیری و ذوب بر روی ۳ عدد از تخمدان‌ها انجام شد بدون این که وارد نیتروژن مایع شوند. این گروه به عنوان گروه آزمون سمیت نام‌گذاری شد.

انجماد شیشه‌ای و گرم کردن تخمدان: محلول انجمادی به کار رفته در این تحقیق حاوی ٤۰٪ اتیلن‌گلیکول، ۳۰٪ فایکول ۷۰ و نیم مول ساکارز (EGFS40) بود [۱٤، ۱٦]. به طور مختصر روش کار بدین ترتیب بود که تخمدان‌ها برای ۵ دقیقه در این محلول در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس به داخل نی انجمادی با حداقل محلول انجمادی کشیده شده و برای یک هفته در نیتروژن مایع ذخیره شدند. به منظور ذوب سریع، نی‌های انجمادی در دمای اتاق گرم شدند و به مدت ۲۰ ثانیه در آب ۲۵°c قرار داده شدند. محتویات نی به داخل غلظت‌های نزولی ساکارز (۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ مولار) به مدت ۵ دقیقه (در دمای اتاق) تخلیه شدند. پس از ذوب تخمدان‌ها به مدت نیم‌ساعت در α-MEM محتوی ۵٪ FBS به تعادل رسیدند تا فولیکول‌های پره‌آنترال آن‌ها جدا شوند.

جدا کردن فولیکول‌های پره‌آنترال: فولیکول‌های پره‌آنترال با قطر ۱۳۰- ۱۰۰ میکرون از تخمدان‌های تازه و منجمد ـ ذوب شده به روش مکانیکی و با استفاده از سوزن ۲۹g سرنگ‌های انسولین زیر استریومیکروسکوپ جدا شدند.

آزمون سمیت (Toxicity Test)**:** فولیکول‌های جدا شده از گروه آزمون سمیت، همچنین تعدادی از فولیکول‌های جدا شده از تخمدان‌های منجمد، ذوب شده و گروه تازه بلافاصله پس از جداسازی با تریپان‌بلو ۰/٤٪ (۳۰ ثانیه) رنگ شدند. با این روش رنگ‌آمیزی زیر میکروسکوپ معکوس، فولیکول‌های دژنره آبی‌رنگ و فولیکول‌های زنده بدون رنگ دیده می‌شوند. درصد فولیکول‌های زنده در این سه گروه با هم مقایسه شد.

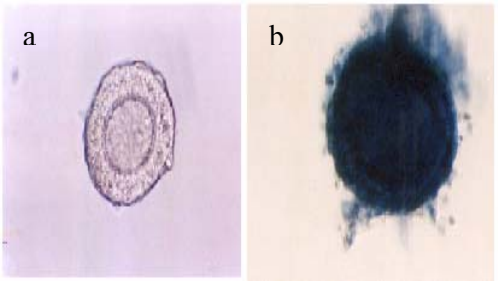
کشت فولیکول‌ها: فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان تازه (تعداد= ۱۱۷) و تخمدان انجماد شیشه‌ای شده (تعداد= ۱۱۵) در دو قطره مجزا از محیط کشت شستشو شدند و سپس به کمک پیپت دهانی به قطره محیط کشت جدید منتقل و به مدت ۱۰ روز در قطرات µl ۲۰ از محیط کشت به طور جداگانه زیر روغن در co_2 ۵٪ و دمای 37^oc کشت داده شدند. محیط مورد استفاده α-MEM حاوی ۵٪ FBS، ۱۰۰ mIU/ml recombinant follicle stimulating hormone (rFSH; serono,Switzerland)، یک درصد insulin, transferrin, selenium (ITS; Gibco, U.K)، ۲۰ ng/ml mrEGF (Sigma, Germany) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۱۰۰ IU/ml و استرپتومایسین ۱۰۰µg/ml بود. نیمی از محیط کشت یک روز در میان با محیط کشت تازه تعویض شد.

ارزیابی رشد و بقای فولیکول‌ها در طول کشت: میزان بقای فولیکول‌ها در روزهای ٦ و ۱۰ کشت در هر دو گروه بررسی شد. از دست دادن زودرس اووسیت، تیره رنگ شدن فولیکول و توقف رشد به عنوان فولیکول دژنره در نظر گرفته شد. در پایان روز ۱۰ کشت، تشکیل حفره‌ی آنتروم زیر میکروسکوپ ارزیابی شد. درصد فولیکول‌های دارای آنتروم نسبت به فولیکول‌های زنده در دو گروه مقایسه گردید. همچنین قطر فولیکول‌ها در روزهای ۲ و ٤ کشت، زیر میکروسکوپ معکوس با میکرومتر مدرج با تعیین میانگین دو قطر عمودی محاسبه شد. قطر فولیکول‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار ارایه گردید و در دو گروه مقایسه شد.

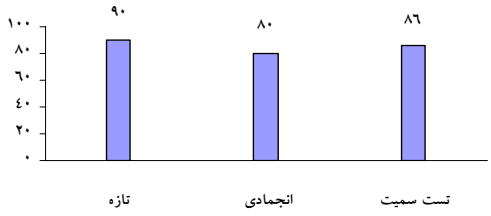
آنالیز آماری: آنالیز نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار spss انجام گرفت. میزان بقای فولیکولی و تشکیل حفره‌ی آنتروم با آزمون chi-square و قطر فولیکولی با آزمون t آنالیز شد. $p<0/05$ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

مشاهده‌ی تخمدان پس از انجماد ـ ذوب، زیر میکروسکوپ معکوس نشان داد که بافت تخمدان ساختار آناتومیک خود را پس از ذوب حفظ کرده و مشابه تخمدان تازه به طور برجسته حاوی فولیکول‌های پره‌آنترال با ظاهری زنده بود. به طور معمول ۲۰-۱۵ فولیکول پره‌آنترال از هر تخمدان تازه و یا منجمد ـ ذوب شده جدا شد. نتایج رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو (شکل شماره‌ی ۱) نشان داد که میانگین فولیکول‌های زنده در گروه تازه ۹۰±۷/۰۷ درصد، در گروه انجمادی ۸۰±۸/۱٦ درصد و در گروه آزمون سمیت ۸٦±۵/٤۷ درصد بود. تفاوت این سه گروه از لحاظ آماری معنی‌دار نبود که نشان‌دهنده‌ی عدم سمیت محلول ضد انجمادی به کار گرفته در این تحقیق است (نمودار شماره‌ی ۱).

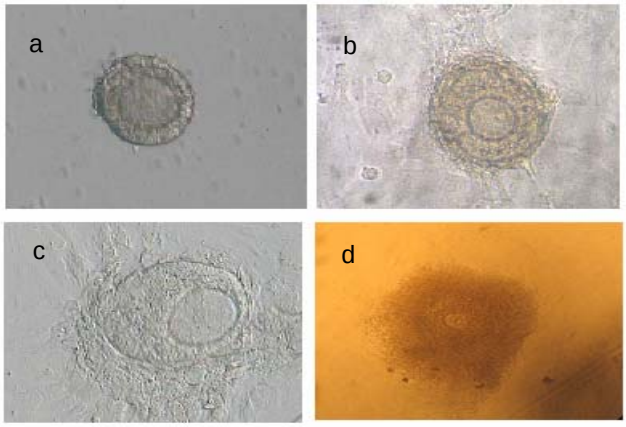


شکل ۱- نتایج رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، a: فولیکول زنده، b: فولیکول دژنره



نمودار۱- میزان بقای فولیکول‌های جدا شده از تخمدان تازه، انجمادی و گروه آزمون سمیت. بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان‌ها، حاوی اووسیت در مرحله‌ی GV بودند که به وسیله‌ی ۳-۲ لایه سلول‌های گرانولوزا درون غشای پایه احاطه شده بودند. اطراف فولیکول به وسیله‌ی تعدادی سلول‌های تکای پهن پوشیده شده بود. فولیکول‌های جدا شده از دو گروه تخمدان تازه و ذوب شده، تغییرات مورفولوژیکی مشابهی را در طول کشت نشان دادند. در روز دوم کشت، سلول‌های تکا در قاعده‌ی فولیکول‌ها رشد کرده و تک‌لایه‌ای را تشکیل دادند که سبب ثابت شدن فولیکول‌ها شد (شکل شماره‌ی ۲).



شکل۲- کشت فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان انجماد شیشه‌ای و ذوب شده: a: فولیکول پره‌آنترال جدا شده به روش مکانیکی، از تخمدان انجماد شیشه‌ای شده (بزرگ‌نمایی۱۰۰×). b: روز دوم کشت: سلول‌های تکا لایه‌ای را در زیر فولیکول ایجاد می‌کنند و فولیکول را به کف می‌چسبانند (بزرگ‌نمایی۱۰۰×) c: از روز چهارم کشت سلول‌های گرانولوزا به تدریج از غشای پایه بیرون می‌زنند. (بزرگ‌نمایی ۱۰۰×) d: یک فولیکول مرده در محیط کشت (بزرگ‌نمایی ۱۰۰×)

جدول۱- تکوین و بلوغ فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان‌های منجمد شده و شاهد در طول کشت

گروه‌ها	قطر فولیکول*			تعداد فولیکول زنده**		تعداد فولیکول با حفره آنتروم***
	روز صفر	روز ۲	روز٤	روز ٦	روز۱۰	
انجمادی	۱۲۷/۰۹±۳/٦۹	۱۵۵/٤۸±۸/۳۵	۱۹۳/٤۲±۸/٤٦	۸۳ (۷۲/۱)	۷۷ (٦٦/۹)	۳۰ (۳۷/٦)
تازه	۱۲٤/۸۵±۵/۰۷	۱۵۸/۱۱±۱۱/۲۳	۲۰۱/۵٦±۹/۸۷	۹۲ (۷۸/٦)	۸۵ (۷۲/٦)	۳۷ (٤۳/۵)

* میانگین و انحراف معیار؛ میکرومتر.

** تعداد (درصد).

*** تعداد (درصد نسبت به فولیکول‌های زنده).

سلول‌های گرانولوزا تکثیر پیدا کردند به صورتی که در روز چهارم کشت، از غشای پایه و سلول‌های تکا بیرون زدند. از روز هشتم به بعد در تعدادی از فولیکول‌ها، حفراتی در بین سلول‌های گرانولوزا دیده شد که در پایان، حفره‌ای شبیه آنتروم را ایجاد کردند. در طول کشت، قطر فولیکول‌ها در دو گروه انجمادی و تازه افزایش پیدا کرد که نتایج آن در جدول ۱ خلاصه شده است. چنانچه نتایج نشان می‌دهد میانگین قطر فولیکول‌ها در دو گروه در روزهای ۲ و٤ اختلاف معنی‌داری نداشت. میزان بقای فولیکول‌ها در گروه تازه و انجمادی در روز ششم کشت به ترتیب ۷۸/٦ و۷۲/۱ درصد و در روز دهم کشت ۷۲/٦ و٦٦/۹ درصد بود که اختلاف بین دو گروه معنی‌دار نبود. در طول دوره‌ی کشت توقف در تکثیر سلول‌های گرانولوزا و رشد فولیکول، آزاد شدن زودرس تخمک و تیره‌رنگ شدن فولیکول به عنوان فولیکول دژنره محسوب شد. تشکیل حفره‌ی آنتروم در ٤۳/۵٪ فولیکول‌های زنده در روز دهم کشت در گروه تازه و ۳۷/٦٪ در گروه انجمادی مشاهده شد (جدول شماره ۱) که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه نبود.

بحث

در این مطالعه نشان داده شد که فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان‌های انجماد شیشه‌ای با استفاده از ضد یخ اتیلن‌گلیکول می‌توانند در محیط کشت مشابه فولیکول‌های جدا شده از تخمدان تازه، زنده باقی‌مانده و رشد کنند. انجماد شیشه‌ای نوعی روش انجمادی است که سلول‌ها در غلظت بالای ضد یخ و سرعت زیاد منجمد می‌شوند و در نتیجه مرحله‌ی تشکیل کریستال یخ رخ نمی‌دهد و صدمات وارد شده به بافت به حداقل می‌رسد [۱۷، ۱۸]. این شیوه ابتدا برای اووسیت و جنین به کار گرفته شد و نتایج خوبی داشته است [۱۷، ۱۹]. به منظور کاهش اثرات سمی ضد یخ که در انجماد شیشه‌ای با غلظت بالا به کار می‌رود لازم است که زمان تعادل تا حد امکان کاهش یابد. این موضوع برای بافت‌ها که مجموعه‌ای از سلول‌ها هستند و احتیاج به نفوذ کامل

ضد یخ به داخل آنها است به ظاهر مشکل‌ساز خواهد بود. در این تحقیق از موش‌های ١٤ روزه استفاده شد که حجم تخمدان آن‌ها mm^3 ٢ می‌باشد که به نظر می‌رسد نفوذ ضد یخ در آن به راحتی صورت گیرد. در مورد بافت‌های بزرگ‌تر توصیه می‌شود که به قطعات کوچک تقسیم شوند. از بین ضد یخ‌های استفاده شده در انجماد شیشه‌ای، اتیلن‌گلیکول در ترکیب با چندین ضد یخ دیگر موثرتر به نظر می‌رسد [٢٠، ٢١]. پیوند بافت تخمدانی بعد از انجماد شیشه‌ای با این ترکیب، مورفولوژی بافتی رضایت‌بخشی را نشان داده‌اند [١٤، ٢٢، ٢٣]. در این مطالعه از اتیلن‌گلیکول به همراه فایکول و ساکارز (EGFS40) به عنوان ضد یخ استفاده شد. میزان بقای فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان تازه، انجماد شیشه‌ای و گروه آزمون سمیت تفاوت معنی‌داری نداشت که نشان‌دهنده عدم سمیت ضد یخ استفاده شده در این تحقیق بر میزان زنده ماندن فولیکول‌ها و میزان نفوذ خوب آن به بافت تخمدان است. تحقیقات قبلی نشان داده بود که در انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان با به کارگیری (EGFS40)، ساختار بافتی به خوبی حفظ می‌شود و آسیب‌های فراساختمانی در بافت تخمدان پس از انجماد شیشه‌ای در مقایسه با تخمدان تازه مشاهده نشد [١٣، ١٤]. Santos و همکاران در سال ٢٠٠٦ طی تحقیق خود اثرات انجماد شیشه‌ای با به کارگیری چندین ضد یخ را بر روی فولیکول‌های پره‌آنترال داخل بافت تخمدانی بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد هنگامی که از مخلوط اتیلن‌گلیکول و ساکاروز استفاده می‌شود حدود ٧٠٪ فولیکول‌ها زنده می‌مانند [٢٤]. در این مطالعه، به منظور بررسی اثرات درازمدت انجماد شیشه‌ای بر روی تخمدان، فولیکول‌های تخمدانی از تخمدان منجمد ذوب شده جدا شد و به مدت ١٠ روز کشت داده شدند. فولیکول‌های تخمدانی می‌توانند به دو روش مکانیکی و یا آنزیمی جدا شوند. روش مکانیکی اگر چه وقت‌گیرتر است و برای پستانداران بزرگ و انسان که کورتکس تخمدانی متراکم دارند دشوار است، ولی از آنجا که غشای پایه باقی می‌ماند بنابراین تمامیت ساختمانی فولیکول‌ها و ارتباط متقابل تخمک ـ گرانولوزا ـ تکا حفظ می‌شود [٢٣]. در این تحقیق برای جداسازی از روش مکانیکی استفاده شد. بعد از جداسازی فولیکول‌ها به روش مکانیکی، فولیکول‌ها می‌توانند به دو طریق کشت شوند. سیستم کشت مدور (spherical) که فولیکول‌ها به کف پتری دیش نمی‌چسبد و در نتیجه ساختمان سه بعدی خود را حفظ می‌کند و سیستم کشت (nonspherical) که فولیکول‌ها به کف پتری دیش چسبیده و در نتیجه شکل سه بعدی خود را از دست می‌دهند [٢]. در این تحقیق از سیستم کشت غیرمدور استفاده شد. در این سیستم کشت، لایه سلول‌های تکا اطراف غشای پایه که ممکن است سدی برای رسیدن اکسیژن و مواد غذایی موجود در محیط کشت به سلول‌های گرانولوزا باشد فولیکول را به کف پتری دیش می‌چسباند و سلول‌های گرانولوزا غشای پایه را پاره کرده از سلول‌های تکا بیرون می‌زنند. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بقای فولیکول‌های جدا شده از تخمدان با انجماد شیشه‌ای در محیط کشت با گروه شاهد تازه، تفاوت معنی‌داری ندارد. در تحقیق Demeestere در سال٢٠٠٢ میزان بقای فولیکول‌های جدا شده از تخمدان تازه به دو روش مکانیکی و آنزیمی پس از ١٢ روز کشت مقایسه شدند که به ترتیب ٩٥ و ٧٦/٤ درصد بود. در این تحقیق اثر انجماد بررسی نشده است [٢٣]. Liu و همکارانش پس از انجماد آهسته تخمدان موش ١٤ روزه، فولیکول‌های پره‌آنترال را به مدت ١٢ روز کشت دادند. میزان بقای فولیکول‌ها در گروه تازه ٨٩/١ درصد و در گروه انجماد آهسته ٨١/٧٪ بود که تفاوت معنی‌داری با هم نداشت [١]. میزان بقای فولیکول‌ها در این تحقیق در دو گروه، از تحقیق حاضر قدری بیشتر است که می‌تواند به علت روش انجماد و شرایط کشت فولیکول‌ها باشد. Cecconi و همکاران او در سال ٢٠٠٤ به مقایسه‌ی بلوغ فولیکول‌های پره‌آنترال گوسفند جدا شده از کورتکس تخمدان انجمادی و تازه پرداختند. روش انجمادی آنها آهسته بود و از دو ضد یخ اتیلن‌گلیکول و DMSO استفاده کردند. اگرچه مورفولوژی و بقای فولیکول‌ها در گروهی که از اتیلن‌گلیکول به عنوان ضد یخ استفاده شده بود بهتر از گروه انجمادی دیگر بود ولی در هر دو گروه درصد مجموعه اووسیت ـ کومولوس سالم به دست آمده از فولیکول‌ها پس از ١٠ روز کشت به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه تازه کمتر بود. قطر فولیکول‌ها در طول کشت و تشکیل حفره‌ی آنتروم پس از ١٠ روز در دو گروه انجمادی با تازه اختلاف معنی‌داری نداشت [٩]. Newton و Illingworth در سال ٢٠٠١ به ارزیابی بقا و رشد فولیکول‌های موش در طول کشت بعد از جداسازی از تخمدان‌های منجمد ـ ذوب شده در ضد یخ‌های متفاوت پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که اگرچه (DMSO) Dimethyl Sulphoxide نسبت به پروپیلن گلیکول وگلیسرول اثرات منفی کمتری بر روی فولیکول‌های تخمدانی دارد ولی درصد فولیکول‌هایی که پس از ٨ روز کشت، زنده باقی‌مانده بودند در همه‌ی گروه‌های انجمادی به طور معنی‌داری کمتر از گروه تازه بود. آن‌ها همچنین تعدادی از تخمدان‌ها را به روش Vajta که برای انجماد شیشه‌ای جنین به کار برده بود منجمد کردند. اگرچه فولیکول‌های جدا شده از این تخمدان‌ها بعد از ذوب ظاهر مورفولوژی طبیعی داشت اما فقط ٦ فولیکول از ٧٦ فولیکول در

طول کشت زنده باقی‌مانده و تا مرحله‌ی آنترال رشد کردند. آن‌ها در هشتمین روز کشت به وسیله‌ی اضافه کردن EGF و HCG به محیط کشت، فولیکول‌ها را تحریک به تخمک‌گذاری کردند. تنها یکی از فولیکول‌ها، تخمک بالغ تولید کرد. آن‌ها اعلام کردند شیوه انجماد شیشه‌ای عملی است اما احتیاج به اصلاح دارد [۱۱]. در تحقیق ما رشد و بقای فولیکول‌ها در محیط کشت ارزیابی شد و مرحله‌ی تحریک تخمک‌گذاری انجام نشد. مطالعات بعدی در زمینه‌ی بلوغ تخمک از تخمدان با انجماد شیشه‌ای و همچنین بهبود شرایط کشت، لازم به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

در مجموع از گزارشات مختلف در مورد انجماد بافت تخمدان، میزان بقای بالایی در هر دو روش انجماد آهسته و شیشه‌ای مشاهده می‌شود که با توجه به ساده و سریع بودن روش انجماد شیشه‌ای و مقرون به صرفه بودن آن، این روش برای انجماد بافت تخمدان توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری آقای شهرام پوربیرانوند و خانم سعیده ابراهیمی کارشناسان گروه علوم تشریحی دانشگاه تربیت مدرس تشکر می‌شود.

References:

[1] Liu HC. He Z. Rosenwaks Z. Mouse ovarian tissue cryopreservation has only a minor effect on in vitro follicular maturation and gene expression. ***J Assist Reprod Genet*** 2003; 20: 421-431.
[2] Smitz J. Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. ***Reproducation*** 2002; 123: 185-202.
[3] Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. ***Anim Reprod Sci*** 2003; 78: 135-163.
[4] Deanesly R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. ***J Endocrinol*** 1954; 11: 197-200.
[5] Kagabu S. Umezu M. Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. ***Exp Anim*** 2000; 49: 17-21.
[6] Kim S. Yang HW. kang HG. Lee HH. Lee HC. Ko DS. et al. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. ***Fertil Steril*** 2004; 82: 679-685.
[7] Shaw JM. Cox SL. Traunson AO. Jenkin G. Evaluation of the long- term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. ***Mol cell Endocrinol*** 2000; 161: 103-110.
[8] Smitz j. Cortvrindt R. Follicle culture after ovarian cryostorage. ***Maturitas*** 1998; 30: 171-179.
[9] Cecconi S. Capacchietti G. Russo V. Berardienelli P. Mattioli M. Barboni B. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. ***Biol Reprod*** 2004; 70: 12-17.
[10] Newton H. Picton H. Gosden RG. In vitro growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. ***J Reprod Fertil*** 1999; 115: 141-150.
[11] Newton H. Illingworth P. In-vitro growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. ***Hum Reprod*** 2001; 16: 423-429.
[12] Courbiere B. Odagescu V. Baudot A. Massaraier J. Mazoyer C. Salle B. et al. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. ***Fertil Steril*** 2006; 4: 1243-1251.
[13] Salehnia M. Moazzeni SM. Histological study of the effect of vitrification using ethylene glycol as cryoprotectant on the mouse ovarian tissue. ***Midde East Fertil Soc J*** 2001; 6: 233-238.
[14] Salehnia M. Abbasian Moghadam E. Rezazadeh Velojerdi M. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. ***Fertil Steril*** 2002, 78: 1-2.
[15] Ishijima T. Kobayashi Y. Lee DS. Ueta YY. Matsui M. Lee JY. et al. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. ***J Reprod Dev*** 2006; 52: 293-299.
[16] Haidari K. Salehnia M. Rezazadeh Valoujerdi M. The effects of different concentrationsn of leukemia inhibitory factor on the development of isolated preantral follicle from fresh and vitrified mouse ovaries. ***I Biomed J*** 2006; 10: 158- 190.
[17] Fahy GM. MacFarlane DR. Angell CA. Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. ***Cryobioogyl*** 1984; 21: 407-426.
[18] Ozkavukcu S. Eredemli E. Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects. ***J Ankara Med School*** 2002; 24: 187-196.
[19] Pomp D. Eisen EJ. Genetic control of survival of frozen mouse embryos. ***Biol Reprod*** 1990; 42: 775-786.
[20] Chi HJ. Koo JJ. Kim MY. Joo JY. Chang SS. Chung KS. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. ***Hum Reprod*** 2002; 17: 2146-2151.

[21] Kasai M. Komi JH. Takakamo A. Tsudera H. Sakurai T. Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. ***J Reprod Fertil*** 1990; 89: 91-97.
[22] Sugimoto M. Maeda S. Manabe N. Miyamoto H. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. ***Theriogenology*** 2000; 53: 1093-10103.
[23] Demeestere I. Delbaere A. Gervy C. Bergh M. Devreker F. Englert Y. Effect of preantral follicle isolation technique on in-vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. ***Hum Reprod*** 2002; 17: 2152-2159.
[24] 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: 167-176.