تاثیر انجماد شیشه‌ای تک فاکتوری در چند مرحله با به کارگیری غلظت‌های مختلف اتیلن گلیکول بر مورفولوژی بافت تخمدان موش

الهه میرراسخیان [۱]، مژده صالح‌نیا [۲*]

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت نوع ضد یخ و مراحل آب‌گیری در روش انجماد شیشه‌ای هدف از این تحقیق بررسی انجماد شیشه‌ای تک-فاکتوری با استفاده از غلظت‌های مختلف اتیلن گلیکول در مراحل مختلف آب‌گیری در خصوص بافت تخمدان موش بود.

مواد و روش‌ها: به منظور مطالعه‌ی کیفی بافت تخمدان پس از انجماد شیشه‌ای، ۳۵ موش ماده‌ی بالغ نژاد NMRI با سن ۱۰-٦ هفته انتخاب شدند و پس از خارج ساختن بافت تخمدان آنها به شکل تصادفی در سه گروه کنترل، آزمون سمیت و انجماد شیشه‌ای قرار گرفتند. در گروه-های انجمادی پس از آب‌گیری یکسان نمونه‌ها در غلظت‌های ۲ و ٤ مول (هر مرحله به مدت یک دقیقه) با توجه به غلظت نهایی ٦ و یا ۸ مول زمان‌های متفاوت آب‌گیری ٤، ٦ و ۸ دقیقه برای هر کدام از غلظت‌ها در نظر گرفته شد و سپس در ازت مایع غوطه‌ور و به مدت یک هفته نگهداری شدند. بعد از گرم کردن نمونه‌ها، در ساکاروز ۱ مول شستشو و به تعادل رسیدند. همچنین آزمون سمیت در خصوص تمام غلظت‌ها انجام شد. بافت‌های تخمدان تازه، منجمد شده و آزمون سمیت در محلول فرمالدهید ۱۰ درصد تثبیت شده و پس از قالب‌گیری در پارافین و برش‌گیری‌های پی‌درپی با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و سپس مطالعه کیفی شدند.

نتایج: بافت تخمدان در گروه‌های انجمادی با غلظت‌های متفاوت اتیلن‌گلیکول و نیز زمان‌های مختلف آب‌گیری مورفولوژی طبیعی و مشابه داشتند. ساختار فولیکول‌های پره‌انترال و انترال به خوبی حفظ شده بود به ویژه فولیکول‌های بدوی و پره‌انترال با اندازه‌ی کوچک در نواحی قشری تخمدان کاملا طبیعی بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اولا غلظت‌های بالای اتیلن‌گلیکول برای تخمدان سمی نبوده، دوما زمان آب‌گیری ٤ تا ۸ دقیقه باعث پیدایش برهم ریختگی بافت تخمدان طی مراحل انجماد و ذوب نشده است. گرچه اثرات دقیق این ضدیخ نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

واژگان کلیدی: انجماد شیشه‌ای چندمرحله‌ای، اتیلن‌گلیکول، بافت تخمدان

۱- کارشناسی علوم آزمایشگاهی، گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۲- دانشیار گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

* **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: ۸۵/۹/۹

تاریخ پذیرش نهایی: ۸٦/۳/۲۵

مقدمه

انجماد بافت تخمدان از اهمیت خاصی در درمان ناباروری و نیز حفظ گونه‌های کمیاب دارد و طی چند ساله‌ی اخیر کاربرد انجماد شیشه‌ای در خصوص بافت تخمدان در مقایسه با دیگر روش‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار بوده است [۱] به ویژه که در این روش صدمات کمتری به بافت در حین روند انجماد و ذوب وارد می‌آید و از نظر اجرایی روش ساده، کوتاه مدت و کم هزینه است [۲]. نتایجی که در خصوص استفاده از آن در نگهداری جنین، تخمک و بافت تخمدان گونه‌های مختلف پستانداران به دست آمده رضایت‌بخش بوده [۳-٦] و به همین دلیل تحقیقات زیادی برای بهبود شرایط انجماد با کاهش شدت صدمات به بافت در حال اجراست [۷-۹]. طی روند انجماد شیشه‌ای سرعت سرد کردن و انجماد بافت بسیار بالاست و محیط انجمادی به یک‌باره تبدیل به حالت جامد شبه شیشه می‌شود و مرحله‌ی تشکیل

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]

کریستال یخ رخ نخواهد داد، بنابراین صدمات وارد شده به بافت به حداقل می‌رسد [۱۰]. به منظور مقایسه‌ی انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان انسانی با به کارگیری دو ترکیب ضدیخ و در دو سرعت انجمادی (۱۲۰°c- و ۱۹۶°c-) Rahimi G و همکارانش تحقیقی را انجام دادند و نشان دادند که نوع ترکیب ضدیخ خیلی دارای اهمیت نیست بلکه سرعت انجماد عامل تعیین‌کننده موفقیت انجماد در حفظ قدرت زنده ماندن سلول‌هاست [۹]. یکی از دلایل دیگری که در انجماد شیشه‌ای، آب بافتی به سرعت خارج شده و مانع از تشکیل کریستال یخ می‌شود مربوط به غلظت بالای ضدیخ‌های به کار گرفته شده، به ویژه ضدیخ نفوذپذیر آن است. از تحقیقات انجام شده در این زمینه مشخص شده که اتیلن‌گلیکول ضدیخی است که نفوذپذیری زیادی در درجه‌ی حرارت آزمایشگاه داشته و میزان سمیت آن برای سلول‌ها و بافت‌های مختلف با مقایسه دیگر ضدیخ‌ها مثل گلیسرول و یا DMSO کمتر است [۱۱-۱۵]. تحقیقات انجام شده به وسیله Walker DJ و همکارانش (۲۰۰۶) نشان داد که غلظت‌های بالای اتیلن‌گلیکول (بین ٦ تا ٨ مدل) اثر سمی بر بلاستوسیست گاو نداشت و حتی پس از ٢٤ ساعت که از ذوب نمونه‌ها می‌گذشت درصد زنده ماندن بلاستوسیست‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد اما آنچه موفقیت روش را بهتر نشان می‌دهد زمان به تعادل رسیدن و یا آب‌گیری جنین است. این محققین در بخش دیگری از مطالعه‌ی خود که به مقایسه زمان‌های متفاوت آب‌گیری پرداخته بودند نشان دادند که هر چه زمان آب‌گیری از یک دقیقه کمتر می‌شود درصد زنده ماندن بلاستوسیست‌ها کاهش می‌یابد اما در فاصله‌ی زمانی تا ۲ دقیقه تفاوتی بین گروه‌ها نبود [١٦]. پروتکل‌های مختلفی برای ساخت محیط و انجام مراحل انجماد شیشه‌ای به کار گرفته شده است. از جمله استفاده از محیط انجمادی تک‌فاکتوری و یا محیطی که از چند فاکتور و ترکیب استفاده شده است [٦، ٩، ١١]. معمولا در محیط‌های انجمادی تک‌فاکتور، فقط از یک ماده‌ی نفوذپذیر استفاده می‌شود اما در محیط‌های انجمادی ترکیبی، مخلوطی از ضدیخ‌های نفوذپذیر و ماکروملکول‌های نفوذناپذیر مثل فایکول، پرکول استفاده می‌شود. نتایج تحقیقات استفاده از هر یک از پروتکل‌های فوق‌الذکر متفاوت بوده است [١١، ١٤، ١٧، ١٨]. اغلب روش‌های به کار گرفته شده در انجماد تخمک و یا جنین از نوع چند فاکتوری بوده که رضایت‌بخش بوده‌اند [١٩، ٢٠، ٢١] ولی نتایج تحقیقات JS Chenko متفاوت بود، آنها به طور مقایسه از هر دو پروتکل برای بافت تخمدان انسانی استفاده کردند و در یک گروه از مطالعات خود از مخلوطی از ضدیخ‌های نفوذپذیر مثل دی‌متیل سولفاکسید (DMSO)، پروپیلن گلیکول، گلیسرول به همراه با زرده‌ی تخم‌مرغ و ساکاروز با تری‌هالوز استفاده کردند و در گروه دیگر از ضدیخ‌های نفوذپذیر به تنهایی مثل گلیسرول و اتیلن‌گلیکول و پس از انجماد و ذوب نمونه‌ها به ارزیابی رشد فولیکولی و فعالیت هورمونی بافت تخمدان پرداختند و نشان دادند که انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان فقط با به کارگیری فاکتور نفوذپذیر به تنهایی نتیجه‌ی بهتری دارد تا زمانی که از فاکتور نفوذپذیر به همراه دیگر ترکیبات مثل ساکاروز استفاده می‌شود [١١]. البته در همین ارتباط Walker DJ نشان داد که تفاوتی بین استفاده از محیط انجمادی تک‌فاکتوری با روش انجماد چندفاکتوری نیست [١٦]. مراحل انجام انجماد شیشه‌ای نیز می‌تواند به شکل چندمرحله‌ای (Step wise manner) و یا تک-مرحله‌ای باشد. معمولا در نوع اول از محیط انجمادی با غلظت‌های افزایشی استفاده می‌شود ولی در نوع دوم از یک غلظت محیط انجمادی هم برای آب‌گیری و هم برای انجماد استفاده می‌شود. به هر حال با توجه به این که گزارشی تاکنون در خصوص استفاده از روش انجمادی تک‌فاکتوری به ویژه با به کارگیری اتیلن‌گلیکول برای حفظ بافت تخمدان وجود نداشته است و به علت ساده بودن روش انجماد شیشه‌ای تک‌فاکتوری و نیز اهمیت زمان آب‌گیری و غلظت‌های به کار گرفته شده ضدیخ در انجماد شیشه‌ای در این تحقیق سعی شد برای اولین بار به بررسی اثربخشی روش انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان موش با غلظت‌های افزایش اتیلن‌گلیکول در زمان‌های مختلف آب‌گیری پرداخته شود تا از نظر مورفولوژی بافت، مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه بافت تخمدان: ۳۵ رأس موش سوری نژاد NMRI بالغ ۱۰-٦ هفته پس از تهیه از انستیتو رازی کرج جهت تطابق با شرایط حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس به مدت حداقل یک هفته در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی نگهداری شدند سپس به روش جا به جایی مهره‌های گردنی نخاعی شده و تخمدان آنها بلافاصله از بدن خارج شد و به شکل تصادفی در سه گروه اصلی شاهد (۵ راس موش)، آزمون سمیت (حداقل ۱۵ راس موش) و گروه انجماد شیشه‌ای (حداقل ۱۵ راس) مورد بررسی و مطالعه کیفی قرار گرفتند.

تهیه محلول‌های انجمادی و آزمون شیشه‌ای محیط‌ها: قبل از انجام روش انجماد شیشه غلظت‌های مختلف اتیلن‌گلیکول در محیط RPMI حاوی نیم‌مول ساکاروز (۲، ٤، ٦، ۸ مول) تهیه شد. ابتدا غلظت‌های مختلف اتیلن‌گلیکول از نظر شیشه‌ای شدن مورد ارزیابی قرار گرفت و نمونه‌هایی که حالت

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]

کدر داشت، حذف شد ولی غلظت‌هایی که کاملا شفاف و شیشه‌ای شده بودند برای ادامه‌ی مطالعه به عنوان غلظت نهایی در نظر گرفته شد. بنابراین غلظت‌های ٦ و ٨ مول به عنوان غلظت نهایی مطرح شدند. طراحی تحقیق حاضر بر سه پایه گذاشته شد: الف) ضدیخ تک‌فاکتوری اتیلن‌گلیکول با غلظت‌های مختلف ۲، ٤، ٦ و ٨ مول، ب) زمان‌های متفاوت آب‌گیری ٤، ٦ و ٨ دقیقه، ج) روند آب‌گیری با غلظت‌های افزایشی اتیلن‌گلیکول. بنابراین طبق جدول ۱ طراحی زمان‌های آب‌گیری با به کارگیری غلظت‌های مختلف EG تنظیم شد. همان‌گونه که در جدول بیان شده دو غلظت اصلی ٦ و ٨ مول به عنوان غلظت‌هایی بودند که برای عمل انجماد در نظر گرفته شدند و بقیه‌ی غلظت‌ها صرفا طی روند آب‌گیری در نظر گرفته شد. مراحل آب‌گیری ابتدایی در تمام موارد، یک دقیقه در نظر گرفته شد اما برای غلظت انتهایی از زمان‌های متفاوت (٤ و ٦ و ٨ دقیقه) استفاده شد، بنابراین برای هر غلظت نهایی و هر زمان آب‌گیری حداقل ۵ تخمدان مورد بررسی قرار گرفت (حداقل ۱۵ راس موش و ۳۰ تخمدان). نمونه‌ها در تمام گروه‌های انجمادی به مدت یک هفته در ازت نگهداری شدند. جهت گرم کردن نمونه‌ها پس از خروج کرایوتیوپ از تانک ازت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق ۳۰ ثانیه در آب ۲۰°c و سپس محتویات آنها به درون محلول ساکاروز ۱ مول در RPMI به مدت ۵ دقیقه منتقل شد و زمان به کار گرفته شده برای تمام نمونه‌ها یکسان بود.

آزمون سمیت محلول انجماد: جهت بررسی اثرات مخرب محلول ضدیخ بر مورفولوژی تخمدان، به تعداد گروه‌های موجود در جدول ۱ تمام مراحل آب‌گیری و سپس آب‌دهی انجام شد فقط مرحله‌ی انجماد در ازت مایع حذف شد. لازم به ذکر است برای هر کدام از مراحل فوق و نیز گروه شاهد دست نخورده، حداقل برای هر غلظت و برای هر زمان ۵ تخمدان در نظر گرفته شد.

مطالعه بافتی نمونه‌ها: تخمدان‌های گروه کنترل، آزمون سمیت و انجمادی در محلول فیکساتیو فرمالدهید ۱۰ درصد به مدت ٤۸ ساعت قرار داده شد و مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشتگی با پارافین و سپس قالب‌گیری انجام شد. از نمونه‌ها برش‌های سریال به ضخامت ۵ میکرون تهیه و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد و حداقل تعداد ۵ برش از هر نمونه در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه و مقایسه کیفی قرار گرفتند.

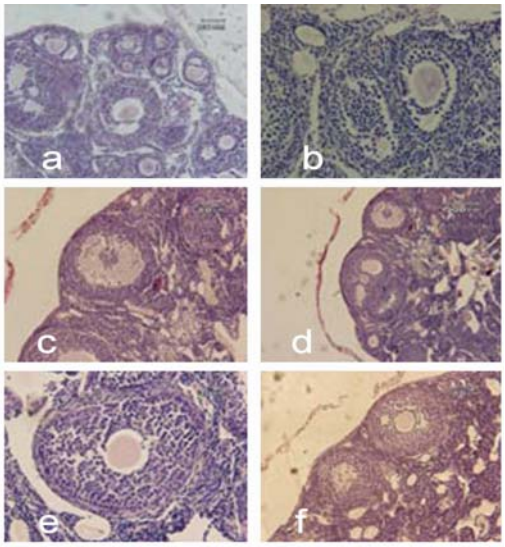
نتایج

همانگونه که در بخش مواد و روش‌ها اشاره شده، مطالعه گروه‌های انجمادی شامل دو غلظت نهایی ٦ و ٨ مول در زمان‌های آب‌گیری مختلف ٤، ٦ و ٨ دقیقه بوده، که به تناسب این گروه‌ها گروه‌های آزمون سمیت نیز در نظر گرفته شد. در نمای میکروسکوپی، تصاویر گروه‌های مذکور مشخص است (شکل شماره‌ی ۱ و۲) که تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین گروه‌ها مشاهده نشد و عموم بافت‌ها از نظر ساختار بافتی تغییر مشخصی نکردند و بافت تخمدانی در تمامی گروه‌ها نمای طبیعی خود را داشت.

جدول ۱- طراحی مراحل آب‌گیری چندمرحله‌ای با توجه به غلظت نهایی ٦ و ٨ مول جهت انجماد شیشه‌ای

غلظت‌های EG برای آب‌گیری	زمان نهایی آب‌گیری					
	غلظت نهایی ٦ مول			غلظت نهایی ٨ مول		
	٤ دقیقه	٦ دقیقه	٨ دقیقه	٤ دقیقه	٦ دقیقه	٨ دقیقه
۲ مول	یک دقیقه	یک دقیقه	یک دقیقه	یک دقیقه	یک دقیقه	یک دقیقه
٤ مول	یک دقیقه	یک دقیقه	یک دقیقه	یک دقیقه	یک دقیقه	یک دقیقه
٦ مول	۲ دقیقه	٤ دقیقه	٦ دقیقه	یک دقیقه	یک دقیقه	یک دقیقه
٨ مول	-	-	-	یک دقیقه	۳ دقیقه	۵ دقیقه

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]



شکل ۱- نمایی از بافت تخمدان منجمد شده و آزمون سمیت شده موش در غلظت ٦ مول

a: گروه انجمادی اتیلن‌گلیکول ٦ مول با زمان آب‌گیری ٤ دقیقه

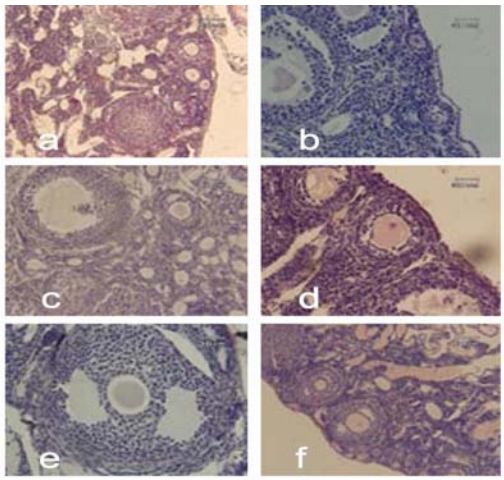
b: گروه انجمادی اتیلن‌گلیکول ٦ مول با زمان آب‌گیری ٦ دقیقه

c: گروه انجمادی اتیلن‌گلیکول ٦ مول با زمان آب‌گیری ٨ دقیقه

d: گروه آزمون سمیت ٦ مول با زمان آب‌گیری ٤ دقیقه

e: گروه آزمون سمیت ٦ مول با زمان آب‌گیری ٦ دقیقه

f: گروه آزمون سمیت ٦ مول با زمان آب‌گیری ٨ دقیقه



شکل ۲- نمایی از بافت تخمدان منجمد شده و آزمون سمیت شده موش در غلظت ۸ مول

a: گروه انجمادی اتیلن‌گلیکول ۸ مول با زمان آب‌گیری ٤ دقیقه

b: گروه انجمادی اتیلن‌گلیکول ۸ مول با زمان آب‌گیری ٦ دقیقه

c: گروه انجمادی اتیلن‌گلیکول ۸ مول با زمان آب‌گیری ۸ دقیقه

d: گروه آزمون سمیت ۸ مول با زمان آب‌گیری ٤ دقیقه

e: گروه آزمون سمیت ۸ مول با زمان آب‌گیری ٦ دقیقه

f: گروه آزمون سمیت ۸ مول با زمان آب‌گیری ۸ دقیقه

فولیکول‌ها با اندازه‌ها و ابعاد مختلف، بیشتر در نواحی قشری تخمدان متمرکز شده بودند، به ویژه فولیکول‌های بدوی (Primordial) که در خارجی‌ترین لایه قرار گرفته بود (شکل ۲a) از یک ردیف سلول‌های مکعبی و یا کشیده، سلول‌های فولیکولی و تخمک مرکزی تشکیل شده بود. فولیکول‌های پره-آنترال با ابعاد متفاوت با داشتن حفرات متعدد آنتروم، قابل تشخیص بودند (شکل ۱f و ۲c,d,e). به ویژه تخمک در مرحله‌ی GV با سیتوپلاسم یک دست و هستک مرکزی در اکثر گروه‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۱d و ۲b). نکته‌ی قابل توجه در خصوص فولیکول‌های با سایز بزرگتر (آنترال Antral) وجود نشانه‌هایی از مرگ سلولی آپوپتوز که مربوط به آترزی فولیکول بود دیده شد (شکل ۱e و ۲e). لازم به ذکر است که این ویژگی در تمام گروه‌ها قابل مشاهده بود و به ویژه گروه خاصی نبود. دوباره تاکید می‌شود که در گروه‌های آزمون سمیت نیز مورفولوژی بافت مشابه با گروه-های دست نخورده و انجمادی بود (شکل ۱a,d,f و شکل a,d,f ۲) که این امر از دو جهت دارای اهمیت است. الف) تاکید بیشتری است بر عدم سمیت EG و ب) تایید بهتری است برای روش انجماد شیشه‌ای.

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که به کارگیری غلظت‌های افزایشی اتیلن‌گلیکول تا ۸ مول تاثیر منفی بر مورفولوژی بافت تخمدان طی روند انجماد و ذوب ندارد و آزمون سمیت نیز موید عدم تاثیر منفی اتیلن‌گلیکول بر بافت تخمدان بود. البته در این زمینه تحقیقات مشابه قبلی نیز نشان داده بود که استفاده از اتیلن-گلیکول چه به شکل انفرادی و چه در مخلوطی از عوامل ضدیخ دیگر اثرات زیان‌باری به ساختار بافت تخمدان نداشته است همچنین بر جنین و تخمک گونه‌های مختلف پستانداران نیز نداشته [۱۵-۱۱] به ویژه تحقیقات اخیر Santes و همکارانش که به مطالعه‌ی اثرات انجماد شیشه‌ای فولیکول‌های پره‌آنترال داخل بافت تخمدان با به کارگیری چند ضدیخ پرداخته بودند از جمله ساکاروز DMSO، اتیلن‌گلیکول و یا مخلوطی از آنها نشان دادند هنگامی که از مخلوط اتیلن‌گلیکول و ساکاروز استفاده می‌شود حدود ۷۰ درصد فولیکول‌ها زنده می‌مانند و به کارگیری غلظت‌های بالای اتیلن‌گلیکول برای انجماد جنین نیز موثر بوده و در غلظت بالای ۸ مول نیز حدود ٦۰ درصد از جنین‌ها زنده بودند [۱۷]. گرچه در تحقیقات قبلی محققین نشان دادند که یکی از عوامل موثر در موفقیت انجماد، زمان آب‌گیری است [۱٦]. اما نتایج تحقیق حاضر نشان داد در صورتی که از روش آب‌گیری

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]

چند مرحله‌ای استفاده شود به گونه‌ای که در غلظت‌های پایین، زمان کمتر و در غلظت‌های بالا، زمان بیشتری سپری شود در مجموع در زمان‌های ٤ تا ٨ دقیقه تاثیری بر مورفولوژی بافت تخمدان نداشته است. البته امکان تغییرات بیوشیمیایی در بافت وجود دارد، اما این امر نیاز به تحقیقات بیشتری با مطالعات بعدی دارد به ویژه بلوغ فولیکول‌ها باید ارزیابی شود چه به شکل in vivo و یا به شکل in vitro تا بتوان ارزیابی مناسب‌تری از این تحقیق به دست آورد. گرچه در تحقیقات مشابه قبلی نیز نشان داده شده بود که انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان با به کارگیری محلول اتیلن‌گلیکول، فایکول ـ ساکاروز ٤٠ درصد (EGFS 40) اگر زمان آب‌گیری تا ٨ دقیقه نیز برسد ساختار بافت به خوبی حفظ می‌شود [۲۲] و یا پس از IVM نمونه‌ها و مطالعه‌ی بلوغ فولیکولی نیز تفاوتی را با گروه شاهد نداشته است [۲۳].

نتیجه‌گیری

بنابراین شاید بتوان از نتایج کیفی به دست آمده چنین نتیجه گرفت که اتیلن‌گلیکول می‌تواند ضدیخ نفوذپذیری باشد که علاوه بر سرعت وارد به بافت مانع از تشکیل کریستال یخ نیز می‌شود و میزان سمیت آن نیز پایین بوده و بر مورفولوژی تخمدان کمتر اثر گذاشته است. به علت سهولت استفاده از محلول تک عاملی، این روش می‌تواند جایگزین خوبی برای انجماد بافت تخمدان و حفظ ساختار آن برای مدت طولانی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان، مراتب تقدیر و تشکر را از سرکار خانم سعیده ابراهیمی جهت تهیه تصاویر میکروسکوپی و جناب آقای شهرام پوربیرانوند جهت تهیه مراحل بافت اعلام می‌دارند.

References:

[۱] صالح‌نیا مژده. انجماد تخمدان. ***مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد*** ۱۳۸۲، سال یازدهم، پیوست شماره چهارم، صفحات ۱۷-۳.

[2] Courbiere B. Odagescu V. Baudot A. Massardier J. Mazoyer C. salle B. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. ***Fertil Steril*** 2006; 86 Suppl; 4: 1243-1251.

[3] Nawroth F. Rahimi G. Isachenko E. Isachenko V. Liebermann M. Tucker MJ. Cryopreservation in assisted reproductive technology: new trends. ***Semin Reprod Med*** 2005; 23: 325-335.

[4] Lucena E. Bernal DP. Lucena C. Rojas A. Moran A. Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. ***Fertil Steril*** 2006; 85: 108-111.

[5] 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.

[6] Dela Pena EC. Takahashi Y. Katagiri S. Atabay EC. Nagano M. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. ***Reproduction*** 2002; 123: 593-600.

[7] Chen SU. Chien CL. Wu MY. Chen TH. Lai SM. Lin CW. et al. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. ***Hum Reprod*** 2006; 21: 2794-2800.

[8] Gandolfi F. Paffoni A. Papasso Brambilla E. Bonetti S. Brevini TA. Ragni G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. ***Fertil Steril*** 2006; 85 Suppl 1: 1150-1156.

[9] Rahimi G. Isachenko E. Sauer H. Isachenko V. Wartenberg M. Hescheler J. et al. Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. ***Reprod Fertil Dev*** 2003; 15: 343-349.

[10] Ozkavakcu S. Evdemli E. cryopreservation Basic knowledge and biophysicol effects. ***J Ankara Med School*** 2002; 24: 187-196.

[11] Isachenko V. Isachenko E. Rahimi G. Krivokharchenko A. Alabart JL. Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen: negative effect of disaccharides in vitrification solution. ***Cryol Letters*** 2002; 23: 333-344.

[12] Salehnia M. Abbasian Moghadam E. Rezazadeh Velojerdi M. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. ***Fertil Steril*** 2002; 78: 644-645.

[13] Yamada C. Caetano HV. Simoes R. Nicacio AC. Feitosa WB. Assumpcao ME. et al. Immature bovine oocyte cryopreservation: comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. ***Anim Reprod Sci*** 2007; 99: 384-388.

[14] Kuleshova LL. MacFarlane DR. Trounson AO. Shaw JM. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. ***Cryobiology*** 1999; 38: 119-130.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]

[15] Santos RR. Rodrigues APR. Costa S. Hf S. Iva JRV. Mates MHT. et al. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. ***Anim Reprod Sci*** 2006; 91: 249-263.
[16] Walker DJ. Campos-Chillon LF. Seidel GE. Vitrification of in vitro-produced bovine embryos by addition of ethylene glycol in one-step. ***Reprod Domest Anim*** 2006; 41: 467-471.
[17] 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.
[18] Rahimi G. Isachenko E. Isachenko V. Sauer H. Wartenberg M. Tawadros S. et al. Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. ***Reprod Biomed Online*** 2004; 9: 187-193.
[19] Rezazadeh Valojerdi M. Salehnia M. Developmental potential and ultrastructural injuries of metaphage II (MII) mouse oocytes after slow freezing or vitrification. ***J Assist Reprod Genet*** 2005; 22: 129-137.
[20] Kuwavama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos. The cryotopmethod. ***Theriogonl*** 2007; 67: 73-80.
[21] Cheu ZJ. Li Y. Hu JM. Li M. Successful clinical pregnancy of cryopreserved human oocytes after vitrification. ***Zhonghua Yi Xue Za Zhi*** 2006; 86: 2037-2040.
[22] Haidari K. Salehnia M. Rezazadeh Valoujerdi M. The effects of different concentrations of leukemia inhibitory factor on the development of isolated preantral follicels from fresh and vitrified mouse ovaries. ***I Biomed J*** 2006; 10: 158-190.
[23] Salehnia M. Moazzeni SM. Histological study of the effect of vitrificatoin using ethylene glycol cryoprotectent on the mouse ovarian tissue. ***Middle East Fertil Soc J*** 2006; 6: 233-238.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-03]