Original Article

Comparison of Two Different Immature Mouse Ovarian Vitrification Methods using Trypan Blue Staining

Farideh Eivazkhani[1], Bita Ebrahimi[2*], Behpour Yousefi[3], Rouhollah Fathi[2], Hamidreza Sameni[4]**

1- M.Sc. Student, Research Center of Nervous System Stem Cells and Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Embryology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
3- Professor, Research Center of Nervous System Stem Cells and Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
4- Associated Professor, Research Center of Nervous System Stem Cells and Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1665659911, Department of Embryology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran*
Email: b.ebrahimi@royaninstitute.org

***Corresponding Address: P.O.Code: 3513138111, Research Center of Nervous System Stem Cells and Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran*
Email: behpour.y9@gmail.com

Received: 27/Oct/2014, Accepted: 03/Feb/2015

Abstract

Objective: Different cryoprotectants are used for cryopreservation of ovarian tissue in patients at risk of infertility. Ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO) and propanediol (PROH) have been chosen as the basic permeable cryoprotectants due to their decreased glass-formation characteristics compared to other cryoprotectants. In the present study, the effects of two different vitrification methods on whole mouse ovarian tissue by the use of a novel staining method (trypan blue) has been evaluated.

Methods: Ovaries of 8 day-old NMRI mice were isolated and divided among the control, vitrification 1 (Vit1) and vitrification 2 (Vit2) groups. The Vit1 solution was composed of α-MEM+ 20% FBS + 15% EG + 15% DMSO. The Vit 2 solution was composed of α-MEM+ 15% FBS +20% EG + 20% PROH. Vit1 and Vit2 procedures were performed at 4˚C and room temperature, respectively. Warming was performed in α-MEM+ 20% FBS supplemented with 1M sucrose in the Vit1 group and α-MEM+ 15% FBS with descending concentrations of sucrose (1, 0.5, 0.25 M) in the Vit2 group. Control and vitrified warmed ovaries were put in α-MEM supplemented by 0.4% trypan blue for 20 min, and then stained ovaries were fixed in Bouin's fixative, serially sectioned in paraffin wax and finally quantitatively evaluated under a light microscope.

Results: The highest percentage of primordial follicles was observed in the control group. There was a significant difference between the control and Vit1 groups, and between the Vit1 and Vit2 groups ($p<0.05$). No significant difference was observed in primary and preantral follicles between the control and vitrification groups.

Conclusion: Vitrification with EG and PROH are more suitable for preservation of follicle reserves in ovaries. Trypan blue staining is a faster and easier method for evaluation of ovarian tissue.

Keywords: Ovarian tissue, Vitrification, Trypan blue

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 1, Pages: 83-93

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-18]

مقاله اصیل

مقایسه دو روش متفاوت انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان موش نابالغ با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو

فریده عیوض خانی[1]، بی تا ابراهیمی[2*]، بهپور یوسفی[3]، روح الله فتحی[2]، حمیدرضا ثامنی[4]**

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دستگاه عصبی و گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
۲- استادیار، گروه جنین شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
۳- استاد، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دستگاه عصبی و گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
۴- دانشیار، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دستگاه عصبی و گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۶۶۵۶۵۹۹۱۱، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین شناسی
Email: b.ebrahimi@royaninstitute.org

**آدرس نویسنده مسئول: ایران، سمنان، کدپستی: ۳۵۱۳۱۳۸۱۱۱، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده علوم پزشکی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دستگاه عصبی و گروه علوم تشریح
Email: behpour.y9@Gmail.com

دریافت مقاله: ۹۳/۰۸/۰۵ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۱/۱۴

چکیده

هدف: روش‌های انجمادی متفاوتی برای انجماد بافت تخمدان بیماران در معرض خطر ناباروری استفاده می‌شود. اتیلن گلیکول، دی متیل سولفوکساید و پروپاندیول، با خاصیت تشکیل کریستال‌های یخ کمتر به‌عنوان محلول‌های انجمادی نفوذپذیر پایه‌ای در مقایسه با انواع دیگر توصیه شده‌است. در مطالعه حاضر آثار دو روش انجماد شیشه‌ای متفاوت روی بافت کامل تخمدان موش نابالغ با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو بررسی شد.

مواد و روش‌ها: تخمدان موش‌های ۸ روزه نژاد NMRI، پس از جداسازی در گروه‌های کنترل غیر انجمادی، انجمادی ۱ و انجمادی ۲ دسته‌بندی شدند. محلول انجمادی ۱ از محیط پایه α-MEM، اتیلن گلیکول ۱۵ درصد، دی متیل سولفوکساید ۱۵ درصد، سرم جنین گاوی ۲۰ درصد و محلول انجمادی ۲ از محیط پایه، اتیلن گلیکول ۲۰ درصد، پروپاندیول ۲۰ درصد و سرم جنین گاوی ۱۵ درصد تشکیل شد. روش‌های انجمادی ۱ و انجمادی ۲ به‌ترتیب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و دمای اتاق انجام شدند. مراحل ذوب در روش انجمادی ۱ با استفاده از محیط پایه، سرم جنین گاوی ۲۰ درصد و سوکروز ۱ مولار و در روش انجمادی ۲ با بهره‌برداری از محیط پایه، سرم جنین گاوی ۱۵ درصد و غلظت‌های کاهشی سوکروز (۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ مولار) انجام شد. تخمدان‌ها در محیط پایه و رنگ تریپان بلو ۰/٤ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه انکوبه، به‌وسیله بوئن تثبیت و در نهایت برش‌های بافتی سریالی بعد از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین به‌وسیله میکروسکوپ نوری شمارش شد.

نتایج: درصد زیادی از فولیکول‌های بدوی در گروه کنترل غیر انجمادی مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) بین گروه کنترل غیر انجمادی و انجمادی ۱ و همچنین بین انجمادی ۱ و انجمادی ۲ مشاهده شد. افزایش معنی‌داری هم در شاخص زنده‌مانی هر سه دسته فولیکولی در گروه انجمادی ۲ ($P<0/05$) نسبت به انجمادی ۱ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: انجماد شیشه‌ای با استفاده از ترکیب اتیلن گلیکول و پروپاندیول گزینه مناسب‌تری برای حفظ و نگهداری بافت تخمدان است و همچنین روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو، به‌عنوان یک شیوه سریع و آسان برای ارزیابی بافت تخمدانی پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژگان: بافت تخمدان، انجمادشیشه‌ای، تریپان بلو

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴، صفحات: ۸۳-۹۳

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-18]

مقدمه

انجماد بافت تخمدان، به‌دلیل دارا بودن تعداد زیادی فولیکول در مراحل مختلف تکوینی روشی مناسب و کاربردی در نابالغین و بیماران مبتلا به سرطان به‌شمار می‌رود [۱]. مطالعات حیوانی انجماد بافت تخمدان نشان داده‌است که امکان باروری و تولد زنده بعد از انجماد و پیوند در موش صحرایی [۲]، موش سوری [۳] و گوسفند [٤] وجود دارد. در انسان نیز به دنبال انجماد و پیوند قطعات قشری بافت تخمدان، تولد زنده گزارش شده است [۵]. از طرفی؛ با برگرداندن بافت تخمدان منجمد شده به فرد، علاوه بر بلوغ و تکوین فولیکول‌ها و گامت، هورمون‌های استرویدی ساخته می‌شود [٦] و از آن‌جایی که بافت تخمدان حاوی تعداد زیادی تخمک نابالغ است و این تخمک‌ها به‌دلیل تعداد سلول‌ها و فعالیت متابولیک کمتر، نسبت به تغییرات دمایی مقاوم‌ترند، انجماد آسیب کمتری به آن‌ها وارد می‌سازد [۵]. از طرفی برای حفظ تنوع ژنتیکی حیوانات، حفاظت گونه‌های در حال انقراض یا برای اجتناب از خطر تولید و تناسل در میان هم نژادها در حیوانات خانگی، انجماد بافت تخمدان می‌تواند وسیله‌ای برای توسعه و حفظ منبع ژنوم مهیا سازد [۷]. انجماد فرآیندی است که به‌دنبال آن، صدماتی به بافت وارد می‌شود. ۲ مکانیزم در آسیب بافت یا سلول نقش دارد: ۱- آسیب‌های مکانیکی ناشی از کاهش دما که منجر به ایجاد کریستال‌های یخ می‌شود و اثر خود را بر شکل سلول و بافت و نیز مسیرهای مولکولی دخیل در رشد می‌گذارد ۲- آسیب‌های ناشی از آثار شیمیایی و اسمزی مواد که در بین بلورهای آب باقی مانده‌است. فاهی (Fahy) و همکارانش در سال ۱۹۸٦، روش‌های کاهش آسیب‌های ناشی از انجماد را در دو گروه دسته بندی کردند: الف) روش‌های اولیه (مستقیم) شامل: ۱- حداکثر کاهش دما ۲- انتخاب حامل‌های (Carrier) مناسب ۳- حداکثر کاهش زمان تماس با محلول‌های ضد یخ ٤- به‌کارگیری محلول‌های ضد یخ غیر سمی و تا حد امکان خنثی و ب) روش‌های ثانویه (غیر مستقیم) شامل ۱- اجتناب از آسیب اسمزی، ۲- به‌کارگیری رقت مناسب محلول‌ها ۳- استفاده از ضد یخ‌های خارج سلولی به جای داخل سلولی [۸]. نکته دارای اهمیت در انجماد بافت تخمدان، اندازه بافت و محل قرارگیری فولیکول‌ها در تخمدان است. جایگاه فولیکول‌های کوچک بدوی و اولیه در مناطق سطحی و فولیکول‌های بزرگ ثانویه و آنترال (Antral follicles) در مناطق عمقی است و زمانی که فولیکول‌ها بالغ و برای تخمک‌گذاری آماده می‌شوند به طرف سطح حرکت می‌کنند و همچنین هر چه بافت کوچک‌تر باشد، نفوذ ضد یخ‌ها به مناطق عمقی سرعت بیشتری می‌یابد و از تشکیل کریستال‌های یخ جلوگیری خواهد شد. بنابراین بافت‌های بزرگ، باید به قطعات کوچک‌تر تقسیم و سپس منجمد شود تا کمترین آسیب به بافت وارد شود. از طرفی تخمک‌های نابالغ به‌واسطه حجم سلولی کمتر و فقدان رشته‌های دوک متافازی، نسبت به صدمات ناشی از انجماد مقاوم‌تر هستند و فولیکول‌های در مراحل ابتدایی رشد، کمتر در معرض خطر آسیب‌های ناشی از انجماد قرار می‌گیرند [۹]. با این وجود، هنوز هم انجماد بافت و اندامک‌های بزرگ مانند بافت تخمدان، در مقایسه با سلول‌های جداسازی شده با مشکلات بسیاری روبرو است. نقشه هندسی تثبیت شده، تراکم سلولی بالا، تنوع سلولی و حضور سیستم عروقی همگی پارامترهایی است که می‌تواند روی نفوذپذیری مواد ضد یخ به بافت اثر بگذارد [۱۰، ۱۱]. انجماد بافت تخمدان در انسان و حیوان به هر دو روش آهسته و شیشه‌ای انجام می‌گیرد [۱۲-۱٤]. اولین انجماد بافت تخمدان موش توسط پاروت (Parrot) در سال ۱۹٦۰ گزارش شد [۱۵]. هوواتا (Hovatta) نیز در سال ۱۹۹٦ اولین بافت تخمدان انسانی را منجمد نمود [۱٦]. با وجود بهره‌برداری از روش انجماد آهسته برای حفظ جمعیت فولیکول‌های بدوی بافت تخمدان [۱۷]، اما به‌دلیل زمان‌بر بودن، هزینه بالا، احتمال تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی و تخریب اندامک‌های سلول در این نوع انجماد، بهره‌برداری از انجماد شیشه‌ای توصیه شده است. مطالعات انجام شده نشان دهنده این مطلب است که روش انجماد شیشه‌ای به‌دلیل استفاده از حجم پایین

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-18]

محلول‌های انجمادی و سرعت بالای انجماد، آسیب کمتری را به بافت تحمیل کرده و از نظر اقتصادی هم مقرون به‌صرفه است [۱۸-۲۱]؛ از طرفی با استفاده از حامل کرایوتاپ (Cryotop)، نمونه در معرض محلول انجمادی و سمیت کمتری است و تماس بسیار نزدیکی با مایع نیتروژن برقرار می‌کند و باعث افزایش سرعت انجماد و کاهش تخریب می‌شود و برای نمونه‌های کوچک تخمدان، گزینه مناسبی به‌نظر می‌رسد. دکتر ایمانی و همکارانش در سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۰۹ با استفاده از این حامل توانستند با موفقیت نمونه‌های تخمدانی موش سوری را منجمد و بعد از طی مراحل ذوب استفاده کنند [۲۲]. ترکیب مواد ضد یخ مورد استفاده و زمان به تعادل رساندن بافت در محلول انجمادی از عوامل کلیدی و تأثیرگذار در انجماد شیشه‌ای محسوب می‌شود [۲۳]. مطالعات کمی در مورد استفاده از ترکیب اتیلن گلیکول (Ethylene Glycol) به همراه پروپاندیول (Propanediol) به‌عنوان محلول‌های انجمادی گزارش شده است. برای بررسی تمامیت بافت و زنده‌مانی فولیکول‌های بافت تخمدانی منجمد شده، روش‌های متفاوت بافت‌شناسی با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی و همچنین استفاده از رنگ‌های حیاتی وجود دارد [۲۴-۲۶] اما از آن‌جایی که روش‌های بررسی ریخت‌شناسی بافت‌ها از نظر کمی و کیفی، بسیار زمان‌بر است، به‌کارگیری روش‌هایی که مسیر رسیدن به نتیجه را هموار سازد، ضروری به‌نظر می‌رسد.

تریپان بلو (Trypan blue) به‌عنوان یک رنگ حیاتی، برای بررسی نسبت سلول‌های زنده به مرده در کشت‌های سلولی استفاده می‌شود. غشای سلول‌های مرده می‌تواند توسط این ماده شیمیایی به رنگ آبی تیره درآید، اما سلول‌های زنده در برابر نفوذ این ماده به داخل غشای سلولی از خود مقاومت نشان می‌دهند. در این بین به ۲ نکته مهم در استفاده از آن باید توجه نمود: زمان استفاده از این رنگ اهمیت ویژه‌ای دارد و تماس بیشتر از ۳۰ دقیقه بافت با تریپان بلو احتمال ایجاد تخریب در بافت را افزایش می‌دهد و نفوذ آن به سلول‌های سالم، جمعیت سلول‌های تخریب شده را دستخوش تغییر خواهد کرد و از طرفی؛ افتراق بین سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک (Apoptotic and Necrotic cells) با استفاده از این رنگ‌آمیزی امکان‌پذیر نیست [۲۷]. از آن‌جایی که تریپان بلو به‌طور گسترده برای رنگ‌آمیزی سلول‌ها استفاده می‌شود [۲۸] و مطالعات محدودی برای رنگ‌آمیزی بافت، گزارش شده است، بنابراین استفاده از این شیوه رنگ‌آمیزی برای مقایسه دو روش متفاوت انجماد شیشه‌ای در بافت‌های تخمدانی موش نابالغ پیشنهاد شده است.

مواد و روش‌ها

در این طرح از ۱۵ سر موش نژادNMRI به‌دلیل شباهت‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی و تولیدمثلی با انسان استفاده شد. موش‌های نر و ماده ۶-۸ هفته‌ای، پس از وارد شدن به بخش حیوانات آزمایشگاهی پژوهشگاه رویان، به‌مدت یک هفته در اتاق مخصوص حیوانات با دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و تحت چرخه زمانی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، نگهداری شدند. این پایان‌نامه دارای مجوز کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی سمنان به شماره نامه ۹۲/۲۹۹۷۷۴ مورخ ۱۰/۲/۱۳۹۲ می‌باشد. امکان جفت‌گیری موش‌ها فراهم و موش‌های باردار از سایرین جدا شدند و ۸ روز پس از زایمان، نوزادان ماده ابتدا به روش قطع نخاع گردنی کشته شدند و سپس تخمدان‌های آن‌ها با ایجاد یک شکاف عرضی در ناحیه شکم خارج شد. از هر موش یک تخمدان برای گروه کنترل و دیگری تحت فرآیند انجماد قرار گرفت و به سه گروه تقسیم‌بندی شدند و در نهایت از نظر کمیت فولیکولی و تمامیت بافتی ارزیابی شدند. گروه‌های مورد مطالعه شامل: گروه کنترل غیر انجمادی، گروه انجمادی ۱ و ۲ بود. روش انجمادی اول با استفاده از محیط کشت α-MEM (Alpha- Minimum Essential Medium) به‌عنوان محیط کشت پایه، ۷/۵ درصد اتیلن گلیکول (Sigma، آلمان)، ۷/۵ درصد دی متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) (Sigma، آلمان) و ۲۰ درصد سرم جنین

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-18]

گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco، آمریکا) برای محلول تعادلی (Equilibrium Solution) و ۱۵ درصد اتیلن گلیکول، ۱۵ درصد DMSO، ۰/۵ مول سوکروز (Sigma، آلمان)، ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) برای محلول انجمادی (Vitrification Solution) انجام شد. تخمدان‌ها پس از جدا شدن از موش به‌ترتیب ۱۵ دقیقه در محلول تعادل و ۳۰ دقیقه در محلول انجمادی قرار داده شدند. مراحل ذکر شده، با قرار دادن نمونه‌ها در ظرف یخ، در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و روی لرزاننده الکتریکی (Shaker) انجام شد. تخمدان‌های گروه انجمادی ۱ به‌وسیله حامل کرایوتاپ [۲۲] مستقیماً به درون نیتروژن مایع انتقال داده شدند. ذوب پس از ۲ ساعت در دو مرحله انجام شد. محلول ذوب اول شامل محیط کشت α-MEM، سوکروز ۱ مولار و FBS ۲۰ درصد و محلول دوم شامل محیط کشت α-MEM، FBS ۱۰ درصد بود. پس از خارج کردن نمونه‌های انجمادی از نیتروژن مایع، تخمدان‌ها بلافاصله به محلول ذوب منتقل شدند و به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول اول در دمای اتاق روی لرزاننده الکتریکی و ۳۰ دقیقه در محلول دوم درون انکوباتور با دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار گرفتند [۲۹]. روش انجمادی دوم هم با استفاده از محیط کشت α-MEM، ۱۰ درصد اتیلن گلیکول، ۱۰ درصد پروپاندیول و ۱۵ درصد FBS غیر فعال شده برای محلول تعادلی و محیط کشت α-MEM، ۲۰ درصد اتیلن گلیکول، ۲۰ درصد پروپاندیول (Sigma، آلمان)، ۰/۵ مول سوکروز و ۱۵ درصد FBS غیر فعال شده برای محلول انجمادی انجام شد. به این ترتیب که ابتدا تخمدان‌های موش‌های نابالغ ۸ روزه، در دمای اتاق به‌ترتیب به‌مدت ۸ دقیقه در محلول تعادل و ٤ دقیقه در محلول انجمادی قرار داده شدند و سپس نمونه‌ها توسط حامل کرایوتاپ، به داخل نیتروژن مایع منتقل و منجمد شد. حداکثر ۲ ساعت پس از انجماد، نمونه‌ها وارد مرحله ذوب شد. نمونه‌ها در دمای اتاق و در مجموع به‌مدت ٦ دقیقه در هر یک از محلول‌های ذوب اول، دوم و سوم قرار داده شد. سپس در محیطی حاوی αMEM و FBS ۱۵درصد شستشو و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2 انکوبه شد [۳۰]. بافت‌های تخمدانی در هر دو گروه انجمادی بعد ذوب، به‌مدت ۲۰ دقیقه در قطراتی حاوی رنگ تریپان بلو ۰/٤ درصد [۳۱] و محیط کشت به نسبت مساوی قرار داده شد و سپس به‌منظور بررسی‌های بافتی در بوئن (Bouin's fixative) و به دنبال آن در فرمالین تثبیت شد. پس از تهیه لام از برش‌های ۵ میکرومتری، از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (Hematoxylin and Eosin) استفاده شد. به دلیل رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با تریپان بلو، مدت زمان کوتاه‌تری نسبت به حالت معمول، در هماتوکسیلین و ائوزین قرار گرفتند تا مقایسه بهتری از بافت به‌دست آید. برای بررسی ریخت‌شناسی بافت‌ها و کمیت فولیکولی، تمام برش‌هایی که به‌صورت سریالی (۱ به ۵) روی لام قرار گرفته بود، با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش شد. در این بررسی فولیکول‌ها در۳ گروه بدوی، اولیه و پره آنترال (Preantral follicles) ارزیابی شد. فولیکول‌های دارای یک لایه سنگفرشی به‌عنوان فولیکول بدوی، فولیکول‌های دارای حتی یک سلول مکعبی به‌دلیل ورود به مرحله رشد به‌عنوان فولیکول اولیه و فولیکول‌های دارای بیش از یک لایه سلول مکعبی به‌عنوان فولیکول‌های پره آنترال در نظر گرفته شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

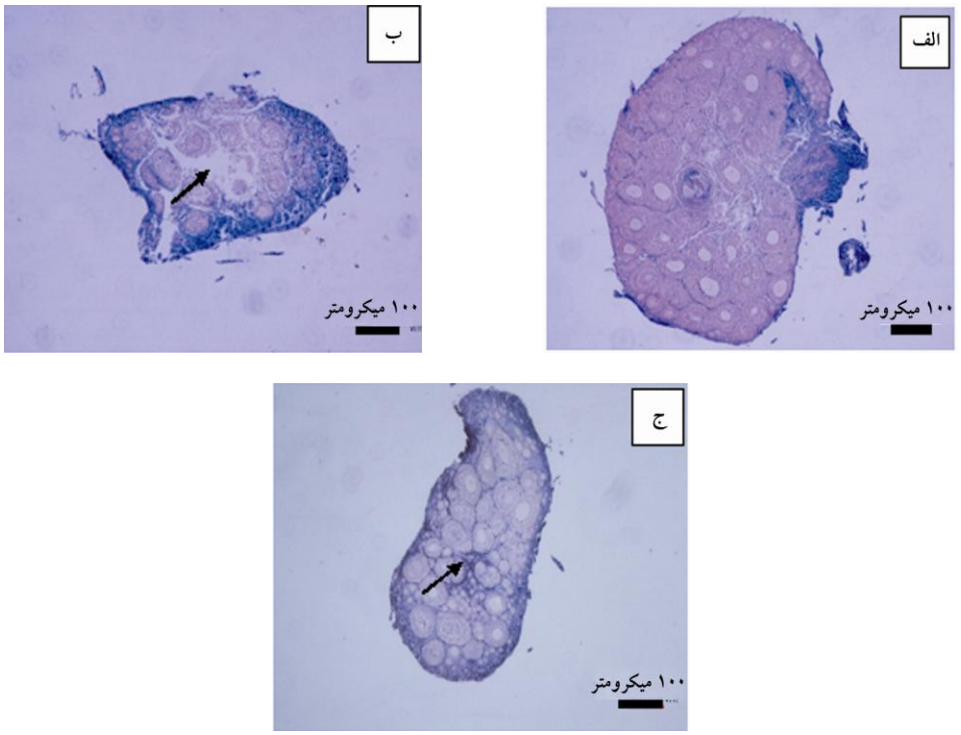
بررسی آماری نتایج حاصل از شمارش فولیکول‌ها، پس از طبیعی کردن توزیع داده‌ها با آزمون کلموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov)، توسط آزمون‌های آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way Analysis of Variance) با پس آزمون T-test و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد و داده‌ها طی ۵ بار تکرار در گروه‌های مورد مطالعه، به‌صورت میانگین درصد و با احتساب انحراف از معیار با یکدیگر مقایسه شدند. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد ($P<0/05$).

نتایج

در هر گروه مورد مطالعه، ۵ نمونه بافت تخمدانی ارزیابی

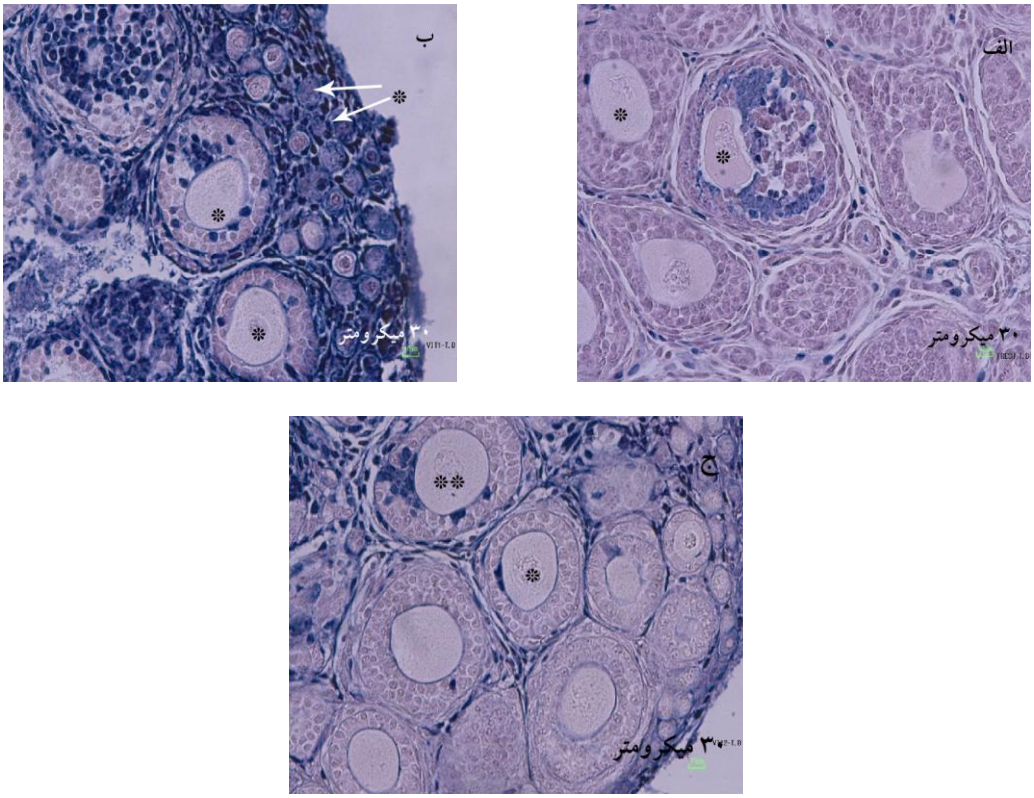
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-18]

شد. بافت‌های تخمدان در تمامی گروه‌های مورد مطالعه، ابتدا با تریپان بلو و سپس هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و بررسی بافت‌شناسی شد. در تصاویر تهیه شده از برش‌های بافت تخمدان‌های موش‌های ۸ روزه در گروه کنترل غیر انجمادی، جمعیت پراکنده‌ای از فولیکول‌ها، در تمام نواحی بافتی مشاهده شد. با توجه به یکپارچگی یکنواخت فولیکول‌ها، تمایزی میان قسمت‌های قشری و مرکزی بافت، دیده نشد. در تخمدان‌های این گروه، فولیکول‌های بدوی بیشتر در نواحی محیطی و فولیکول‌های پرآنترال بیشتر در نواحی مرکزی قرار داشت. این در حالی بود که در گروه‌های انجمادی، به‌ویژه در گروه انجمادی ۱، با وجود یکپارچگی بافت، تخریب واقع در قسمت‌های مرکزی بافت قابل مشاهده بود (شکل ۱ و ۲). تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه و پره آنترال سالم و مرده در گروه‌های مختلف مورد مطالعه، شمارش بررسی کمی شد. به‌صورت قراردادی فولیکول‌های دارای یک لایه از سلول‌های سنگفرشی به‌عنوان فولیکول‌های بدوی و فولیکول‌های دارای حتی یک سلول گرانولوزای (Granulosa cell) مکعبی (به‌دلیل ورود به مرحله رشد)، به‌عنوان فولیکول اولیه و در نهایت فولیکول‌های دارای چند لایه سلول گرانولوزا به‌عنوان فولیکول‌های پره آنترال [۳۲] در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که تعداد فولیکول‌های بدوی سالم گروه انجمادی ۱ (۳/۰٤ ± ۲٦/۲۷)، نسبت به گروه کنترل غیر انجمادی (۵/۸۷ ± ۵۹/۷۳) و همین‌طور گروه انجمادی ۲ (٦/۳۸ ± ٤٥/۹۸)، به‌صورت معنی داری کاهش یافته است (P<۰/۰۵) (شکل ۳). شاخص زنده‌مانی (فولیکول‌های زنده/ مرده) در هر دو گروه انجمادی به‌صورت معنی داری، نسبت به گروه کنترل غیرانجمادی کاهش نشان داد (P<۰/۰۵) اما افزایش معنی‌دار این شاخص در هر سه دسته فولیکولی در گروه انجمادی ۲، نسبت به گروه انجمادی ۱ قابل توجه بود (جدول ۱).

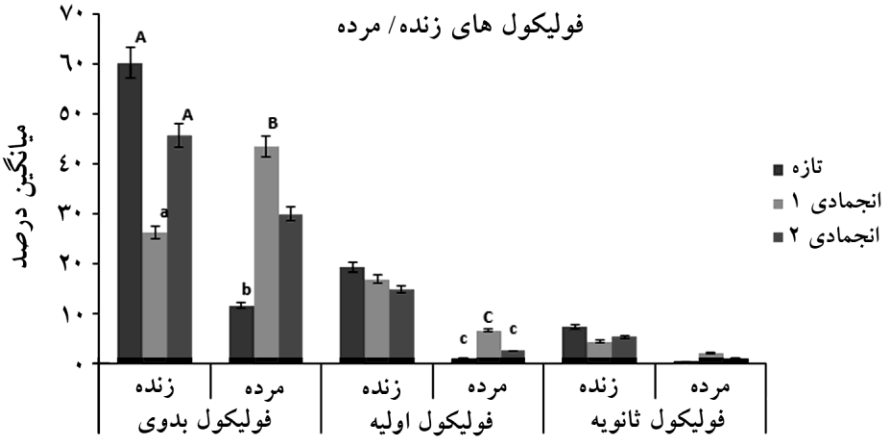


شکل ۱ تصاویر برش‌های تخمدانی، رنگ‌آمیزی شده با تریپان بلو به همراه هماتوکسیلین و ائوزین، (الف) گروه کنترل غیر انجمادی، (ب) گروه انجمادی ۱، (ج) گروه انجمادی ۲

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-18]



شکل ۲ تصاویر برش‌های تخمدانی، رنگ‌آمیزی شده با تریپان بلو به همراه هماتوکسیلین و ائوزین؛ (الف) گروه کنترل غیر انجمادی، (ب) گروه انجمادی ۱، (ج) گروه انجمادی ۲، * فولیکول مرده (دارای تخمک مرده یا بیش از ۵۰ درصد سلول گرانولوزای مرده)، ** فولیکول سالم (دارای تخمک سالم به همراه حداقل ۵۰ درصد سلول گرانولوزای سالم)



شکل ۳ تعداد فولیکول‌های سالم (V) و مرده (D) در گروه‌های مورد مطالعه، در هر ستون اختلافات معنی‌دار (P<۰/۰۵) با حروف همسان بزرگ و کوچک نشان داه شده است (برای مثال: A در مقابل a)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-18]

جدول ۱ شاخص زنده‌مانی (تعداد فولیکول‌های سالم/ مرده) در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	مجموع	فولیکول‌های بدوی		فولیکول‌های اولیه		فولیکول‌های پره‌آنترال	
		تعداد کل (سالم + مرده)	شاخص زنده‌مانی	تعداد کل (سالم + مرده)	شاخص زنده‌مانی	تعداد کل (سالم + مرده)	شاخص زنده‌مانی
کنترل غیر انجمادی	٦٧٦٤	٧١/٢٩ ± ٥/١٢	٥/١٦ ^{A}	٢١/١٣ ± ٢/٩٠	٢١/٠٦ ^{A}	٧/٥٦ ± ٠/٧٣	٢٦/٥٨ ^{A}
انجمادی ۱	٧٠٢٩	٦٩/٤٠±٢/٥٩	٠/٥٩ ^{ab}	٢٣/٤٠±٢/٨٥	٢/٦٥ ^{ab}	٦/٢٠±٠/٧٥	٢/ ١٠ ^{ab}
انجمادی ۲	٧٩٤٩	٧٦/٢٥ ± ٥/٩٠	١/٤٩ ^{aB}	١٧/٣٣ ± ١/٣٣	٥/٩٥ ^{aB}	٦/٤١ ± ٠/٤٤	٥/٢٠ ^{aB}

در هر ستون اختلافات معنی‌دار ($P>٠/٠٥$) با حروف همسان بزرگ و کوچک نشان داه شده است (برای مثال A :در مقابل a)؛ داده‌ها به‌صورت میانگین درصد ± اختلاف معیار (SE ± Mean Percentage) بیان شده است.

بحث

به‌دلیل تهدید توانایی باروری دختران نابالغ و زنان جوان مبتلا به سرطان توسط درمان‌های شیمی درمانی و رادیوتراپی، حفظ و نگهداری باروری از طریق انجماد بافت تخمدان در این افراد بسیار ضروری به‌نظر می‌رسد [۱]. در این راستا در مطالعه حاضر دو روش متفاوت انجماد شیشه‌ای دربافت تخمدان موش سوری نابالغ با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو مقایسه شد.

از آن‌جایی که بافت تخمدان اجتماعی از سلول‌های مختلف است که هر کدام میزان نفوذپذیری متفاوتی نسبت به ضد یخ‌ها دارد، بنابراین به‌نظر می‌رسد استفاده از ترکیب چند ضد یخ به‌منظورکاهش سمیت و بهبود نفوذپذیری، بسیار مؤثر باشد [۳۳]. به همین دلیل در این طرح از اتیلن گلیکول به‌عنوان محلول انجمادی پایه، با قدرت نفوذپذیری بالا، وزن مولکولی و سمیت پایین و همچنین تشکیل کریستال یخ کمتر، برای انجماد بافت تخمدان استفاده شد [۳٤] و به جای DMSO که به‌طور وسیع در انجماد شیشه‌ای استفاده می‌شود، از پروپاندیول به‌عنوان یک ضد یخ با سمیت کمتر و بهره‌وری بیشتر به‌ویژه در دمای اتاق استفاده شد؛ چرا که به‌نظر می‌رسید DMSO، به‌دلیل سمیت بالا، آثار مخرب بر بافت تخمدان [۳۵]، ایجاد پلیمریزاسیون در رشته‌های دوک تقسیم و همچنین افزایش احتمال پلی پلوییدی (Polyploid)، گزینه مناسبی نباشد. استفاده از پروپاندیول به تنهایی [۳٦، ۳۷] یا به همراه سایر ضد یخ ها [۳۸] در انجماد آهسته بررسی شده است اما مطالعات کمی در مورد استفاده از آن در انجماد شیشه‌ای گزارش شده است. ژانگ (Zhang) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ آثار چند محلول انجمادی مختلف از جمله اتیلن گلیکول، DMSO و پروپاندیول را در موش‌های ٤-٦ هفته‌ای مقایسه کردند و استفاده از ترکیب پروپاندیول و اتیلن گلیکول را مفید ارزیابی نمودند [۳۰]. از طرفی؛ در روش انجمادی ۲، استفاده از اسمولاریته بالای محلول‌های انجمادی و کاهش زمان مراحل انجمادی بر حفظ کیفیت بافت آثار مثبتی داشته است که مطالعات موکیدا (Mochida) و همکارانش در سال ۲۰۱۳ یافته‌های بررسی حاضر را تأیید می‌کند [۳۹]. در تحقیق حاضر نیز بررسی برش‌های بافت‌های تخمدانی انجمادی ۲، با استفاده از ترکیب اتیلن گلیکول و پروپاندیول، حفظ تمامیت و یکپارچگی بافت را به خوبی نشان داد. تشابه نزدیک ساختار ظاهری و همچنین تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه و پره آنترال در گروه انجمادی ۲ در مقایسه با گروه کنترل غیر انجمادی نشان‌دهنده حمایت بافت و کاهش آسیب‌رسانی به بافت توسط این نوع ترکیب از ضد یخ‌ها بود. استفاده از تریپان بلو برای رنگ‌آمیزی بافت‌های تخمدانی هم، به‌دلیل ایجاد افتراق بین سلول‌های زنده و مرده شمارش فولیکول‌ها را در زمان کوتاه‌تر امکان‌پذیر ساخت و ارزیابی‌های بافتی را بسیار آسان‌تر کرد. در این طرح از اتیلن گلیکول و پروپاندیول به‌عنوان ضد یخ‌های نفوذ کننده در محلول‌های انجماد شیشه‌ای، استفاده شد و همچنین زمان انجام مراحل انجمادی تا حد امکان کاهش یافت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-18]

و از کرایوتاپ به جای نی‌های انجمادی به‌عنوان حاملی برای کاهش تماس بافت با محلول‌های انجمادی استفاده شد. حفظ تمامیت و یکپارچگی بافت‌های تخمدان خود تأییدی بر کارآمدی روش انجمادی فوق است.

تشکر و قدردانی

طرح تحقیقاتی حاضر تحت حمایت مالی و علمی پژوهشگاه رویان و دانشگاه علوم پزشکی سمنان انجام شده است. بدین‌وسیله از مسئولین و اساتید هر دو مرکز تقدیر و تشکر می‌نماییم.

منابع

[1] Lee S, Song JY, Ku SY, Kim SH, Kim T. Fertility preservation in women with cancer. Clin Exp Reprod Med 2012; 39(2): 46-51.

[2] Deanesly R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. J Endocrinol 1954; 11(2): 197-200.

[3] Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. Hum Reprod 1997; 12(1): 101-6.

[4] Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. Hum Reprod 1994; 9(4): 597-603.

[5] Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonckt A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet 2004; 364(9443): 1405-10.

[6] Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Guerin JF, Lornage J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. Fertil Steril 2002; 77(2): 403-8.

[7] Lin TC, Yen JM, Kuo TC, Gong KB, Hsu KH, Hsu TT. Comparison of the developmental potential of 2-week-old preantral follicles derived from vitrified ovarian tissue slices, vitrified whole ovaries and vitrified/ transplanted newborn mouse ovaries using the metal surface method. BMC Biotechnol 2008; 8: 38.

[8] Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 1984; 21(4): 407-26.

[9] Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Options on fertility preservation in female cancer patients. Cancer Treat Rev 2012; 38(5): 354-61.

[10] Amorim CA, Curaba M, Van Langendonckt A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. Reprod Biomed Online 2011; 23(2): 160-86.

[11] Pegg DE JI, Armitage WJ, Taylor MJ. Mechanism of cryoinjury in organs Preservation. vol. 2, Edinbourgh: Churchill Livingstone, 1979; p:132-46.

[12] Jadoul P, Dolmans MM, Donnez J. Fertility preservation in girls during childhood: is it feasible, efficient and safe and to whom should it be proposed? Hum Reprod Update 2010; 16(6): 617-30.

[13] Courbière B, Baudot A, Mazoyer C, Salle B,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-18]

Lornage J. Vitrification: a future technique for ovarian cryopreservation? Physical basis of cryobiology, advantages and limits. Gynecol Obstet Fertil 2009; 37(10): 803-13.

[14] Bedaiwy MA, Hussein MR, Biscotti C, Falcone T. Cryopreservation of intact human ovary with its vascular pedicle. Hum Reprod 2006; 21(12): 3258-69.

[15] Parrott DVM. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. J Reprod Fertil 1960; 1: 230-41.

[16] Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, Lass A, Winston RM. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. Hum Reprod 1996; 11(6): 1268-72.

[17] Silber SJ. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. Mol Hum Reprod 2012; 18(2): 59-67.

[18] Silva JM, Pinheiro LG, Leite JA, Melo LH, Lunardi FO, Barbosa Filho RC, Mendonça CV. Histological study of rat ovaries cryopreserved by vitrification or slow freezing and reimplanted in the early or late postmenopausal stage. Acta Cir Bras 2014; 29(5): 299-305.

[19] Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. Fertil Steril 2010; 94(6): 2191-6.

[20] Choi WJ, Yeo HJ, Shin JK, Lee SA, Lee JH, Paik WY. Effect of vitrification method on survivability, follicular growth and ovulation of preantral follicles in mice. J Obstet Gynaecol Res 2007; 33(2): 128-33.

[21] Mukaida T, Takahashi K, Kasai M. Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique. Reprod Biomed Online 2003; 6(2): 221-5.

[22] Eimani H, Mamzoji SS, Soleimani MM, Abnosi MH, Valojerdi MR, Yazdi PE, Shahverdi A, Guorabi H. Survival rate of preantral follicles derived from vitrified neonate mouse ovarian tissue by Cryotop and conventional methods. Biofactors 2007; 31(2): 117-26.

[23] Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 1987; 24(5): 387-402.

[24] Martinez-Madrid B, Camboni A, Dolmans MM, Nottola S, Van Langendonckt A, Donnez J. Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. Fertil Steril 2007; 87(5): 1153-65.

[25] Donnez J, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Demylle D, Van Langendonckt A. The role of cryopreservation for women prior to treatment of malignancy. Curr Opin Obstet Gynecol 2005; 17(4): 333-8.

[26] Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet 2004; 363(9412): 837-40.

[27] Tran SL, Puhar A, Ngo-Camus M, Ramarao N. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of Bacillus cereus. PLoS One 2011; 6(9): e22876.

[28] Park CE, Lee D, Kim KH, Lee KA. Establishment of ovarian reconstruction system

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-18]

in culture for functional genomic analysis. J Biosci Bioeng 2006; 102(5): 396-401.

[29] Fatehi R, Ebrahimi B, Shahhosseini M, Farrokhi A, Fathi R. Effect of ovarian tissue vitrification method on mice preantral follicular development and gene expression. Theriogenology 2014; 81(2): 302-8.

[30] Zhang JM, Liu XL, Yang YX, Wan XP. Comparisons of different protocols for vitrifying mouse ovarian tissue. Reprod Domest Anim 2010; 45(4): 694-8.

[31] Wainwright M. Dyes, trypanosomiasis and DNA: a historical and critical review. Biotech Histochem 2010; 85(6): 341-54.

[32] Matos MH, Bruno JB, Rocha RM, Lima-Verde IB, Santos KD, Saraiva MV, Silva JR, Martins FS, Chaves RN, Báo SN, Figueiredo JR. Figueiredo b. In vitro development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. Res Vet Sci 2011; 90(3): 404-11.

[33] Courbiere B, Massardier J, Salle B, Mazoyer C, Guerin JF, Lornage J. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. Fertil Steril 2005; 84 Suppl 2: 1065-71.

[34] Ali J, Shelton JN. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. J Reprod Fertil 1993; 99(2): 471-7.

[35] Milenkovic M, Diaz-Garcia C, Wallin A, Brännström M. Viability and function of the cryopreserved whole rat ovary: comparison between slow-freezing and vitrification. Fertil Steril 2012; 97(5): 1176-82.

[36] Lan C, Xiao W, Xiao-Hui D, Chun-Yan H, Hong-Ling Y. Tissue culture before transplantation of frozen-thawed human fetal ovarian tissue into immunodeficient mice. Fertil Steril 2010; 93(3): 913-9.

[37] Fabbri R, Pasquinelli G, Keane D, Mozzanega B, Magnani V, Tamburini F, Venturoli S. Culture of cryopreserved ovarian tissue: state of the art in 2008. Fertil Steril 2009; 91(5): 1619-29.

[38] Garor R, Abir R, Erman A, Felz C, Nitke S, Fisch B. Effects of basic fibroblast growth factor on in vitro development of human ovarian primordial follicles. Fertil Steril 2009; 91(5 Suppl): 1967-75.

[39] Mochida K, Hasegawa A, Li MW, Fray MD, Kito S, Vallelunga JM, Lloyd KC, Yoshiki A, Obata Y, Ogura A. High osmolality vitrification: a new method for the simple and temperature-permissive cryopreservation of mouse embryos. PLoS One 2013; 8(1): e49316.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-18]