

## Temperature Reduction Process - a way for Fertility Preservation in Cancer Patients

Rouhollah Fathi<sup>1,2</sup>, Mojtaba Rezazadeh Valojerdi<sup>3, 4\*</sup>, Mojdeh Salehnia<sup>3</sup>, Bita Ebrahimi<sup>2</sup>, Mustafa Najar-Asl<sup>5</sup>, Zahra Ajdari<sup>5</sup>

- 1- Ph.D., Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
- 3- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Professor, Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
- 5- B.Sc., Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

*\*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: mr\_valojerdi@modares.ac.ir*

*\*Corresponding Address: P.O.Code: 1665659911, Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran  
Email: mr\_valojerdi@royaninstitute.org*

**Received: 01/Oct/2013, Accepted: 03/Nov/2013**

### **Abstract**

More than the half of cancer patients undergo cancer treatments of chemotherapy and/or radiotherapy. Unfortunately treatment with invasive methods occasionally lead to severe side effects. Patients who undergo chemotherapy can be affected by premature ovarian failure, an important cause of infertility. Ovarian tissue cryopreservation is suggested as the only way for preservation of sex cells and fertility preservation in cases of prepubertal girls and women with sterility attributed to chemotherapy, radiotherapy, genetic disorders or specific diseases.

**Keywords:** Ovarian tissue, Low temperature, Fertility preservation, Cancer

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 3, Autumn 2013, Pages: 25-41

## فرآیند کاهش دما، راهی برای حفظ قدرت باروری در بیماران سرطانی

روح الله فتحی<sup>۱</sup>، مجتبی رضازاده ولوجردی<sup>۳\*</sup>، مژده صالح نیا<sup>۲</sup>، بیتا ابراهیمی<sup>۲</sup>، مصطفی نجار اصل<sup>۵</sup>، زهرا اژدری<sup>۵</sup>

- ۱- دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران
- ۵- کارشناس، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح  
Email: mr\_valojerdi@modares.ac.ir

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۶۶۵۶۵۹۹۱۱، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین‌شناسی  
Email: mr\_valojerdi@royaninstitute.org

پذیرش مقاله: ۹۲/۰۸/۱۲

دریافت مقاله: ۹۲/۰۷/۰۹

### چکیده

بیش از نیمی از بیماران سرطانی تحت یکی از انواع روش‌های درمان سرطان مانند شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی قرار می‌گیرند. متأسفانه درمان با روش‌های تهاجمی، عوارض جانبی و گاهاً شدیدی را بر جای می‌گذارد. بیماران که تحت شیمی‌درمانی قرار می‌گیرند مستعد ابتلا به نقص تخمدان زودرس شده که عاملی مهم در ناباروری است. بنابراین به‌منظور حفظ قدرت باروری، انجامدافت تخمدان برای خانم‌هایی که در اثر شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، ناهنجاری‌های ژنتیکی یا بیماری‌های خاص دیگر مبتلا به ناباروری می‌شوند و برای دختران نابالغ نیز به‌عنوان تنها راه ممکن برای ذخیره سلول‌های جنسی توصیه می‌شود.

کلیدواژگان: بافت تخمدان، انجامدافت، حفظ باروری، سرطان

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، صفحات: ۲۵-۴۱

### حفظ قدرت باروری (Fertility Preservation)

#### در بیماران سرطانی

موفقیت در درمان سرطان با به‌کارگیری روش‌هایی چون شیمی‌درمانی (Chemotherapy)، رادیوتراپی (Radiotherapy) و پیوند مغز استخوان به‌ویژه پس از دهه ۹۰، افزایش چشم‌گیری یافته است. با این وجود شیوع سرطان در سطح جهانی همچنان بر قربانیان خود می‌افزاید. انتظار می‌رود که تا سال ۲۰۲۰ تعداد بیماران سرطانی در سرتاسر جهان به ۱۵

میلیون نفر برسد که متأسفانه ۶۰ درصد از موارد جدید در کشورهای کمتر توسعه یافته خواهند بود. سرطان دومین عامل مرگ‌زا در کشورهای توسعه یافته و سومین عامل در کشورهای در حال توسعه است و به‌طور کلی ۱۲ درصد مرگ و میر جهانی، ناشی از این سونامی ناخوانده است. در ایران نیز سرطان دومین عامل مرگ و میر محسوب شده و سالانه در حدود ۳۰۰۰۰ نفر جان خود را بر اثر سرطان از دست می‌دهند. پیش‌بینی شده است که با توجه به افزایش امید به زندگی و نیز سن سالمندی، میزان بروز سرطان در دو دهه آتی به دو برابر

## حفظ قدرت باروری در دمای پایین

برای انجماد جنین را دارند، فقط نمی‌توانند از اسپرم فرد دهنده استفاده کنند. در این مورد، (In Vitro Fertilization) IVF تخمک‌های آن‌ها برای تولید جنین و سپس انجماد جنین‌ها ممکن نیست. بنابراین تخمک‌های بالغ یا نابالغ این دسته از بیماران باید منجمد شود (نه جنین). اگر چه می‌توان برای خانم‌های مجرد که تحت تحریک تخمدان قرار گرفته‌اند انجماد تخمک را انجام داد، اما موفقیت این روش بسیار پایین است (۱ تا ۵ درصد بارداری و زایمان پس از انجماد) [۴، ۵]. با این حال انجماد تخمک‌های انسانی در چندین مرکز درمانی به‌صورت گسترده انجام می‌شود [۶].

## انجماد تخمک بالغ

در نگاه اول به‌نظر می‌رسد که انجماد تخمک بالغ روشی مناسب و دست‌یافتنی برای ذخیره سلول‌های زاینده جنس ماده است. اگر خانم‌های مجرد بتوانند مراحل تحریک تخمدان را قبل از شروع شیمی‌درمانی آغاز کنند، انجماد تخمک روشی مناسب برای حفظ قدرت تولید مثل آن‌هاست. اما برای کودکان تحریک تخمک‌گذاری و جمع‌آوری تخمک‌ها برای انجماد امکان‌پذیر نیست [۷]. حدود ۲۱ مطالعه روی انجماد تخمک توسط سانمزر (Sonmezer) و همکارانشان انجام شده است. طی این مطالعات و به‌طور متوسط میزان زنده ماندن تخمک پس از انجماد ۴۷ درصد، میزان لقاح ۵۲/۵ درصد و میانگین بارداری ۱/۵۲ درصد گزارش شده است [۲]. مطالعاتی نیز نشان می‌دهد که با استفاده از حجم بالای سوکروز، نتایج بهتری در انجماد تخمک حاصل می‌شود ولی اعتقاد دارند که هنوز تضمین خوبی برای تأثیر گذار بودن آن در بالین وجود ندارد [۴]. در حالی که مطالعات اخیر رشد یکسان تخمک‌های منجمد شده با شرایط مطلوب نسبت به تخمک‌های غیر منجمد را گزارش نموده‌است [۸].

در مطالعات بورینی (Borini) و همکارانش [۴] نیز ۱۸ بارداری بالینی از ۹۲۷ تخمک منجمد شده گزارش شده است. همچنین در مطالعه دیگری میزان متوسط بارداری از ۱/۸ درصد

افزایش یابد. براساس گزارش «مؤسسه تحقیقات، درمان و آموزش سرطان ایران»، در سال ۱۳۸۶ تعداد موارد سرطانی ثبت شده در کشور ۶۲۰۴۰ نفر بوده است که از این میان تعداد قابل توجهی یعنی ۴۴/۱۹ درصد آن در جمعیت زنان جامعه بروز یافته است.

چندین انتخاب برای بیماران سرطانی وجود دارد تا فرصت مادر شدن را پس از پشت سر گذارندن دوره بیماری مجدداً به‌دست آورند که می‌توان به انجماد جنین، انجماد تخمک و انجماد بافت تخمدان اشاره نمود [۱-۳]. قابل ذکر است که انتخاب روش مناسب به‌منظور کمک به حفظ قدرت باروری، بستگی به زمان رادیوتراپی، نوع سرطان، سن بیمار و وضعیت بیماری فرد دارد.

## انجماد جنین

تنها روش مطمئن و گسترش یافته برای این منظور، انجماد جنین است. اما این روش برای بیماران سرطانی محدودیت‌هایی نیز دارد. اولاً نیازمند آن است که بیمار در دوره سنی بلوغ قرار داشته، در وضعیت جسمی قابل قبولی به سر برد و دهنده اسپرم مناسب داشته باشد. همچنین برای گرفتن تخمک مناسب، بیمار باید تحت فرآیند تحریک تخمدان قرار بگیرد. با توجه به حیاتی بودن زمان برای بیمار سرطانی، شیمی‌درمانی باید به سرعت آغاز شود، بنابراین امکان استفاده از روش‌های زمان‌بر تحریک تخمدان، تقریباً منتفی می‌شود. اگرچه در برخی مراکز درمانی از روش‌های کوتاه مدت (Short Protocol) برای این منظور استفاده شده است، اما نتوانسته اطمینان قطعی نزد متخصصین امر به وجود بیاورد. همچنین اثبات شده است که استفاده از استرادیول‌ها (Estradiol) در تحریک تخمدان، رشد سلول‌های سرطانی را تسریع می‌کند.

## انجماد تخمک

انجماد تخمک نیز روشی است برای بیمارانی که شرایط لازم

فرا تر نرفت [۵]. تخمک مرحله متافاز II، یک سلول بزرگ، ویژه و حساس است. به همین دلیل انجماد تخمک با آسیب‌های بسیاری همراه است که موجب پایین آمدن میزان زنده ماندن پس از ذوب می‌شود [۹]. در این جا دو دلیل مهم وجود دارد: اولاً لایه شفاف (Zona Pellucida: ZP) در محلول انجماد سخت شده و احتمالاً موجب ناقص ماندن عمل گرانول‌های قشری (Cortical Granules) می‌شود. بنابراین موجب عدم نفوذ اسپرم شده و لقاح طبیعی را دچار اشکال می‌کند. البته روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (Intracytoplasmic Sperm Injection: ICSI) تا حدودی می‌تواند گزینه خوبی برای جبران این حالت باشد. دومین دلیل حضور دوک تقسیم در سیتوپلاسم تخمک است که به راحتی توسط کریستال‌های یخ داخل سلولی آسیب می‌بیند [۱۰]. تفاوت بارز در رشد آزمایشگاهی با میزان رشد درون بدن تخمک‌های منجمد [۱۱] و نیز دلایل فوق باعث شده است تا ایجاد بانک تخمک با چالش‌های بزرگی همراه باشد.

### انجماد تخمک نابالغ

انجماد تخمک در مرحله پروفاز I (Germinal Vesicle: GV) نسبت به تخمک مرحله متافاز II با درصد موفقیت بیشتری همراه است [۱۲]. اگر چه تخمک‌های GV اندازه کامل داشته و تقسیمات اول میوزی را نیز کامل نکرده‌اند، اما هنوز به‌طور کامل بالغ نشده و دومین متافاز خود را شروع ننموده‌اند. از طرفی خطر سخت شدن ZP و آسیب به اسکلت سلولی در نتیجه انجماد گریزناپذیر است؛ ولی احتمال دارد که فقدان دوک تقسیم و حضور غشای هسته که از کروماتین محافظت می‌کند، از ایجاد نقایص ژنتیکی در طول تقسیم سلولی جلوگیری کند [۱۳]. بالغ شدن تخمک با آزاد شدن اولین جسم قطبی (Polar Body) در نتیجه کامل شدن تقسیم اول میوز ارزیابی می‌شود، اما بلوغ سیتوپلاسم آن نیز برای انجام لقاح ضروری است [۱۴].

اگر چه گزارش‌هایی از بارداری حاصل از انتقال

تخمک‌های بالغ شده آزمایشگاهی ارابه شده، اما بارداری در نتیجه انتقال تخمک‌های نابالغ حاصل از انجماد و بلوغ آزمایشگاهی، چندان گسترده نبوده است [۱۱، ۱۵]. همچنین ویو (Wu) و همکارانش در سال ۲۰۰۱ [۱۶] بارداری بیوشیمیایی در نتیجه انتقال تخمک GV منجمد- ذوب شده را گزارش دادند و کن (Kan) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ [۱۷]، به دنبال روش فوق یک بارداری ناموفق را که حدود ۱۲ هفته به طول انجامید گزارش نمودند. به هر حال هنوز مباحث زیادی در رابطه با موفقیت‌آمیز بودن این روش مطرح می‌شود [۱۸].

### انجماد بافت تخمدان

همان‌طور که اشاره شد، برای بیمارانی که به شیمی‌درمانی سریع نیازمندند، انجماد تخمدان تنها راه ممکن و میسر است [۳]. هدف اصلی این روش پس از طی دوره درمان و رهایی کامل از سرطان، بازگرداندن بافت قشری تخمدان (که حاوی سلول‌های جنسی ماده است) به حفره لگنی یا ناحیه‌ای شبیه بازو یا دیواره شکم است [۱۳، ۱۹]. روش‌های دیگر برای بازگرداندن قدرت باروری بیماران سرطانی، مثل پیوند فولیکول‌های بدوی جداسازی شده یا پیوند کل بافت تخمدان در ادامه مورد بحث قرار می‌گیرد.

انجماد بافت تخمدان در بیماران سرطانی نسبت به انجماد جنین یا تخمک محاسن زیادی دارد [۲۰، ۲۱]. اول این‌که بافت قشری تخمدان دارای تعداد زیادی فولیکول بدوی است. دوم آن‌که انجماد بافت تخمدان علاوه بر این‌که می‌تواند قدرت فعالیت درون‌ریز تخمدان را حفظ نماید، پس از پیوند و بازگرداندن آن به بدن می‌تواند محورهای هورمونی هیپوفیز-هیپوتالاموس-تخمدان را مجدداً فعال نماید که البته این حالت به‌وسیله انجماد تخمک و جنین رخ نمی‌دهد. سوم، تخمدان‌ها در هر زمانی و بدون توجه به چرخه قاعدگی حتی از طریق یک لاپاراسکوپ (Laparoscopy) ساده به‌دست می‌آیند. چهارم، فولیکول‌های بدوی به دلیل فعالیت متابولیک پایین نسبت به تخمک بالغ به کاهش دما حساسیت کمتری داشته و

## حفظ قدرت باروری در دمای پایین

آناستوموزهای ریز عروقی و برگشت عملکرد هورمونی بافت تخمدان حاصل از انجماد پس از پیوند دیده شده است [۲۷]. در چند سال اخیر تلاش شده است تا تخمدان کامل در حیواناتی نظیر موش صحرایی [۲۷، ۲۸]، خرگوش [۲۹] و گوسفند [۳۰، ۳۱] منجمد شود و پس از پیوند مورد مطالعه قرار گیرند. اولین مورد برگشت قدرت باروری پس از انجماد پیوند بافت تخمدان توسط وانگ (Wang) و همکارانش در سال ۲۰۰۲ [۲۷] گزارش شد. آن‌ها نشان دادند که پیوند عروقی بافت تخمدان و مجاری تولید مثلی موش صحرایی در ۴ مورد از هفت پیوند موفقیت‌آمیز بوده و حیوانات گیرنده بیش از ۶۰ روز زنده مانده‌اند، پس از آن این گروه در ادامه مطالعات خود موفق شدند تخمک‌گذاری و بارداری را در موش صحرایی گزارش کنند. چن (Chen) و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۶ [۲۹] نشان دادند که پس از انجام پیوند ریز عروقی (Micro Vascular)، حدود ۸۶ درصد از تخمدان‌های منجمد- ذوب شده خرگوش می‌تواند تا ۷ ماه به عملکرد خود ادامه دهد.

در جانوران بزرگ جنه مانند انسان، انجماد کل تخمدان بسیار دشوارتر از حیوانات کوچک‌تر است. به دلیل این‌که اولاً مواد ضد یخ در بافت‌های بزرگ و متراکم به سختی نفوذ می‌کنند و دوم آن که احتمال آسیب عروقی در این بافت‌ها بر اثر شکل‌گیری یخ داخل عروقی (Intravascular Ice) بیشتر است. با این وجود آراو (Arav) و همکارانش در سال ۲۰۰۵ [۳۲] ترشح پروژسترون را ۳۶ ماه پس از پیوند در ۳ مورد از ۸ بیمار مشاهده کردند و طی مطالعه‌شان ۶ تخمک به‌دست آوردند که پس از لقاح تا مرحله ۸ سلولی پیش رفتند. همچنین بدایوی (Bedaiwy) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ [۳۳] نشان دادند که برگشت عملکرد هورمونی تخمدان منجمد- ذوب شده در گوسفند پس از پیوند به خود به همراه جراحی ریز عروقی فرآیندی امکان‌پذیر است. اما مشکل اساسی ایجاد لخته در روند رگ‌گیری مجدد بود که منجر به از بین رفتن ۸ رأس حیوان از ۱۱ مورد پیوندی شد. از طرفی ثابت شده است که

همچنین تخمک درون این فولیکول‌ها در مرحله پروفاز I متوقف شده و فعالیت تکوینی کمی دارند. همچنین تخمک در فولیکول‌های بدوی فاقد ZP بوده و از طرف دیگر چربی داخل سیتوپلاسمی بسیار کمی دارند که حضور چربی می‌تواند کاهش درجه حرارت را با مشکل مواجه نماید؛ بنابراین آسیب‌های ناشی از کاهش دما را افزایش می‌دهد. در نهایت فولیکول‌های بدوی که نشانگرهای مخصوص گونه‌ای ندارند، مدل‌های خوبی برای تحقیقات به شمار می‌روند. این فولیکول‌ها در مرحله پیش از برجسته شدن هستند و بیش از ۹۰ درصد فولیکول‌های قشر تخمدان انسان را شامل می‌شوند. تعداد انواع دیگر فولیکول‌ها حالت نوسانی دارند [۲۲].

در حال حاضر انجماد تخمدان به سه طریق انجام می‌شود: انجماد کل تخمدان به همراه پایک عروقی (Vascular Pedicle)، انجماد قطعات قشر تخمدان (Ovarian Cortex) و انجماد فولیکول‌های جدا سازی شده (Isolated Follicles).

## انجماد کل بافت تخمدان

بافت تخمدان انسانی حاوی فولیکول‌های زنده، طی مدت ۳ ساعت با موفقیت از یک شهر به شهر دیگر در کشور دانمارک منتقل شد [۲۳]. همچنین در سال ۲۰۱۲ اولین تولد نوزاد حاصل از فرآیند انجماد و پیوند تخمدان انسان در آلمان گزارش شد که اهمیت آن در انتقال بافت تخمدان از یک شهر به شهر دیگر طی مدت ۱۲ ساعت بود [۲۴]. این مسأله نشان داد که ذخیره‌سازی مؤثر تخمدان بیماران در شهرهایی که بیمارستان یا مرکز ناباروری ندارند، امکان‌پذیر خواهد بود. برای جلوگیری از ایجاد نواحی نکروز (Necrosis) در بافتی که پیوند زده می‌شود و به‌منظور برقراری هر چه بهتر آناستوموزهای عروقی (Vascular Anastomosis) بعد از پیوند، انجماد کل بافت تخمدان به همراه پایک عروقی آن صورت گرفته است [۲۵]. در مطالعه‌ای روی موش صحرایی، تمامی ۸ تخمدانی که پیوند زده شدند، عملکرد مجدد یافته و یک بارداری نیز مشاهده شد [۲۶]. در گوسفند نیز برقراری

به مدولای تخمدان (Ovarian Medulla) از آن جدا شود. سپس در محیط آزمایشگاه ضخامت قشر جداسازی شده از تخمدان به حدود ۱ میلی‌متر تقلیل می‌یابد. این مسأله به برقراری آناستوموزهای عروقی در قطعات قشر پیوند زده شده کمک به‌سزایی می‌کند [۳۸]. اگر قطعه جدا شده از تخمدان بزرگ باشد یا کل تخمدان از بدن خارج شود، بخش قشر از بافت‌های زیرین خود جدا شده و معمولاً به قطعات ۵ × ۵ × ۱ میلی‌متر مکعب تقسیم می‌شود. سپس قطعات آماده شده با روش‌های انجماد شیشه‌ای (Vitrification) یا آهسته (Slow Freezing) منجمد شده و تا زمان پیوند یا ارزیابی‌های پاتولوژیک نگهداری می‌شوند [۲۱]. در برخی موارد بخش مرکزی تخمدان نیز منجمد و نگهداری می‌شود تا در مواقع ضروری بتوان از آن استفاده نمود.

### مقایسه روش‌های مختلف انجمادی بافت تخمدان

به‌طور کلی دو روش انجمادی برای نگهداری بافت تخمدان وجود دارد: انجماد آهسته و شیشه‌ای. به دنبال انجماد بافت تخمدان به‌خصوص در روش آهسته نتایج بسیار مختلفی ارائه شده است [۷، ۳۹]. اصلی‌ترین تفاوت بین انجماد شیشه‌ای و آهسته در سرعت کاهش درجه حرارت و غلظت ضد یخ مصرفی است. سرعت کاهش درجه حرارت در انجماد شیشه‌ای بر خلاف انجماد آهسته، بیش از ۱۵۰۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه بوده و این امر باعث می‌شود که آب خارج سلولی به سرعت از دمای ۵- تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد بگذرد، تا این‌که کریستال‌های یخ داخل و خارج سلولی فرصت تشکیل نداشته باشند. انجماد یک‌باره تمامی عناصر، منجر به ایجاد حالت شیشه‌ای شکل در سلول می‌شود. انجماد شیشه‌ای ابتدا در سال ۱۹۸۵ توسط رال (Rall) و همکارانش برای انجماد جنین‌های موشی استفاده شد [۴۰]. امروزه از این روش در انجماد جنین [۴۱]، تخمک [۱۳]، بافت تخمدان و نیز انجماد سلول‌های بنیادی جنینی انسانی استفاده می‌شود [۴۲] اما اطلاعات و تحقیقات انجام گرفته در زمینه انجماد بافت

پیوند به خودی کل بافت تخمدان منجمد گوسفند به همراه پایه عروقی تخمدان، منجر به بارداری و زایمان می‌شود [۳۰]. علاوه بر این؛ در مطالعه ایمهف (Imhof) و همکارانش [۳۰]، ۶ عدد از ۸ تخمدان با عروق بزرگ بدون ایجاد لخته خون و با حفظ تمامیت ساختاری استرومای تخمدان، آناستوموز داده شد و مشاهده گردید که ۱۸ تا ۱۹ ماه پس از پیوند، تخمدان‌ها همچنان فعال باقی مانده‌اند. مارتینز-مادرید (Martinez-Madrid) و همکاران کل تخمدان انسانی را با پایک عروقی منجمد کردند و توانستند پس از ذوب میزان بالای زنده ماندن فولیکول‌ها (۷۵/۱ درصد) را گزارش نمایند. همچنین در این مطالعه سلول‌های استرومایی، عروق کوچک و نیز ساختار بافتی پس از ذوب در وضعیت طبیعی باقی ماندند [۳۴]. مطالعه دیگری نیز نشان داد که پس از انجماد و ذوب کل تخمدان انسان، افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) در سلول‌های مختلف رخ نداده است [۳۵]. بررسی میکروسکوپ الکترونی نیز نشان داد که قسمت اعظم فولیکول‌های بدوی (۹۶/۷ درصد) بعد از انجماد سالم مانده [۳۶] و علاوه بر این ۹۶/۳ درصد سلول‌های اندوتلیال عروق خونی، ساختار طبیعی خود را حفظ کردند و درصد فعالیت کاسپاز ۳ (Caspase 3) نیز در آن‌ها کمتر از ۱ درصد بوده است.

### انجماد قطعات قشر تخمدان

به منظور حصول بهترین نتیجه، بافت تخمدان باید قبل از شروع شیمی‌درمانی یا تابش تشعشعات رادیو اکتیو از بدن خارج شود. چرا که شیمی‌درمانی حتی با تک دوز درمانی نیز می‌تواند منجر به مرگ فولیکول‌ها و کاهش ذخیره گامت تخمدان شود [۳۷]. قطعات قشر تخمدان می‌تواند به وسیله یک جراحی لاپاراسکوپی ساده و در اسرع وقت بدون در نظر گرفتن چرخه جنسی به‌دست آید. امروزه سعی می‌شود تا این جراحی به دلیل تحمیل بیهوشی عمومی به بیمار، با جراحی‌های دیگر همراه باشد تا هزینه‌ها و آزار بیماران نیز به حداقل برسد [۲۱]. در لاپاراسکوپی تلاش می‌شود تا قشر تخمدان با حداقل چسبندگی

## حفظ قدرت باروری در دمای پایین

همکارانش در سال ۲۰۰۶ نتایج ضعیفی از انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان انسان با استفاده از نی‌های پلاستیکی ارابه کردند. این امر نشان می‌دهد که استفاده از وسایل مختلف برای انتقال نمونه به داخل نیتروژن، آثار متفاوتی در ساختار بافت می‌گذارد. به هر حال با وجود نتایج نه چندان خوب در برخی مطالعات، این طور به نظر می‌رسد که در کل انجماد شیشه‌ای روشی آینده‌دار برای انجماد تخمدان به شمار می‌رود.

## اثر ضد یخ‌های مختلف بر انجماد بافت تخمدان

اگر چه تاریخچه پیوند بافت تخمدان به قرن هجدهم بر می‌گردد، اما برای ذخیره‌سازی گامت‌های ماده، سال‌ها گذشت تا در نهایت در دهه ۵۰ قرن بیستم، با کشف کاربرد مواد ضد یخ در نگهداری مواد زیستی، انجماد بافت تخمدان در مدل‌های حیوانی آغاز شود [۴۹]. مطالعات اولیه به دلیل استفاده از ضد یخ‌های ضعیف مانند گلیسرول (Glycerol) و استامید و نیز به خاطر عدم وجود روش انجمادی مناسب، نتایج خوبی را ارابه نکرد و فقط ۱۰ درصد فولیکول‌های بدوی پس از انجماد حفظ می‌شدند [۵۰]. استفاده از سایر ضد یخ‌ها از دهه ۹۰ به بعد گسترش یافت که متداول‌ترین آن‌ها دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO)، اتیلن گلیکول (Ethylene Glycol: EG) و پروپاندیول (Propanediol: PROH) بود. با به‌کارگیری این نوع از ضد یخ‌ها امکان انجماد و پیوند موفق بافت تخمدان و بازگشت قدرت باروری در حیوانات به‌وجود آمد [۵۱، ۵۲] و نتایج بسیار خوبی به دنبال داشت؛ در حالی که گلیسرول یا استامید چندان اثرگذار نبود [۵۳]. به هر حال این امر ثابت شده است که پاسخ به استفاده از انواع ضد یخ‌ها به نوع گونه، سلول و بافت مورد آزمایش وابسته است.

گوسدن (Gosden) و همکارانش در سال ۱۹۹۴ [۵۴] از DMSO برای انجماد آهسته تخمدان گوسفند استفاده کردند. در مطالعه آن‌ها مدتی پس از پیوند قطعات منجمد-ذوب شده، حیوان بارور شده و در نتیجه آن نیز بره‌ای به دنیا آمد. از آن پس چندین مطالعه موفق روی گونه‌های مختلف حیوانی مانند

تخمدان انسانی اگر چه موفقیت‌هایی را به دنبال داشته ولی هنوز کافی نیست.

در انجماد شیشه‌ای از ابزارهای متنوعی برای انتقال نمونه به داخل نیتروژن استفاده می‌شود که با نام «انتقال دهنده» (Carrier) خوانده می‌شوند مانند کرایوتیوب (Cryotubes)، نی انجمادی (Cryo Straw)، پیپت‌های قابل انعطاف، گریدهای میکروسکوپ الکترونی، همی استراو (Hemi Straw)، شبکه‌های نیایلونی، کرایولوپ (Cryoloop)، کرایولیف (Cryolife)، کرایوتاپ (Cryotop) و کرایوپین (Cryopen) [۴۳].

انجماد بافت تخمدان به دلیل گوناگونی در هندسه، جمعیت سلولی و سیستم عروقی خاص با سلول‌های منفرد بسیار متفاوت است. در برخی از روش‌های انجمادی به دلیل ضخامت دیواره ابزار انتقال نمونه، تغییرات درجه حرارت با سرعت پایین صورت می‌پذیرد. سایر وسایل نیز یا گران بوده یا فضای زیادی برای ذخیره‌سازی لازم دارند؛ بنابراین در مطالعاتی از پیپت پاستور برای انتقال بافت تخمدان به درون نیتروژن استفاده شده است [۵]. نتایج بافت‌شناسی تخمدان‌های منجمد-ذوب شده نشان می‌دهد که ۸۰/۳ درصد فولیکول‌های بدوی (Primordial Follicles) دارای شکل طبیعی بوده و نتایج در مقایسه با مطالعات دیگر آسیب جدی نشان نمی‌دهد (۷۰-۹۰ درصد) [۴۵، ۴۶]. در سال ۲۰۰۳ ایساکچنکو (Isachenko) و همکارانش [۴۶] بافت تخمدان انسانی را منجمد کردند و بیش از ۸۰ درصد فولیکول بدوی سالم به‌دست آوردند. این نتیجه نشان داد که انجماد شیشه‌ای روشی آینده‌دار برای ذخیره بافت تخمدان است. یئومان (Yeoman) و همکارانش [۴۷] در سال ۲۰۰۵ نیز از گریدهای میکروسکوپ الکترونی برای انجماد بافت تخمدان استفاده و نتایج بسیار رضایت‌بخشی را گزارش نمودند. این ظرف تغییر شکل یافته برای انجماد بافت تخمدان انسان مؤثر واقع شد و بعد از ذوب اکثر فولیکول‌ها ظاهر طبیعی خود را حفظ کردند. همچنین بافت تخمدان پس از پیوند، با عملکرد هورمونی مناسب به فعالیت حیاتی بازگشت. اما گاندولفی (Gandolfi) [۴۸] و

گوسفند [۵۵]، بز [۵۶]، گاو [۵۷] و گربه [۵۸] گزارش شد. نیوتن (Newton) و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۶ [۵۹] از DMSO، PROH، گلیسرول و EG برای انجماد بافت تخمدان انسان استفاده کردند. سپس بافت‌های منجمد-ذوب شده را در زیر کپسول کلیه موش‌هایی که دستگاه ایمنی آن‌ها سرکوب شده بود (Immunosuppressed Mice)، پیوند زدند. نتایج نشان داد که بالاترین میزان زنده ماندن متعلق به بافت‌های تخمدان منجمد شده با EG است. در تحقیق دیگری نیوتن و همکاران [۶۰]، زمان متفاوتی را برای نفوذ EG استفاده کرده و نتایج بسیار بهتری گزارش نمودند. همچنین اشمیت (Schmidt) و همکارانش در سال ۲۰۰۴ موفق شدند از تخمدان انسانی حاصل از انجماد با EG و پیوند ارتوتوپیک (Orthotopic Transplant)، تخمک‌های متافاز II با کیفیت خوب به دست آورد [۶۱].

گوک (Gook) و همکاران در سال ۱۹۹۹ [۶۲]، از ترکیب PROH و سوکروز برای انجماد تخمدان انسانی استفاده کرده و نشان دادند که انجماد آهسته برنامه‌ریزی شده به طور معنی‌داری بهتر از انجماد سریع است. در این آزمایش تماس بافت با ضد یخ به مدت ۹۰ دقیقه، باعث ایجاد ظاهری خوب در بررسی میکروسکوپ الکترونی شد. در مطالعات بعدی زمان تماس با ضد یخ، ۱۵ دقیقه کاهش یافت [۶۳] که این امر از واکنش‌پذیری شدن بافت جلوگیری نمود. از طرف دیگر، اثر سرم معمولی و آلبومین سرم انسانی (Human Serum Albumin: HSA) موجود در محلول انجمادی توسط هرینسون (Hreinsson) و همکارانش بررسی شده است. این مقایسه نشان داد که نوع سرم چندان اثر معنی‌داری در زنده ماندن سلول‌های بافت ندارد [۶۴].

همچنین روش‌های انجماد فوق سریع با غلظت بالای DMSO برای انجماد تخمدان‌های جنین انسان استفاده شده است [۶۵]. اگر چه در این روش بعد از ذوب یک نقطه مرکزی نکروزه در بافت تخمدان مشاهده شد، اما استروما و فولیکول‌ها طبیعی بود. در ادامه کار بافت‌های منجمد-ذوب شده در محیط کشت ارگان (Organ Culture) زنده ماندند و به

فعالیت هورمونی بازگشتند. در آزمایش دیگری با استفاده از ترکیب PROH و DMSO تخمدان‌های جنین انسان به روش انجماد آهسته منجمد و نتایج خوبی نیز حاصل شد [۶۶].

اخیراً محققان بررسی حاضر نیز تأثیر ترکیبات مختلف ضد یخ‌های EG، DMSO و PROH بر میزان سالم ماندن فولیکول‌ها و نیز بروز مرگ برنامه‌ریزی شده پس از انجماد شیشه‌ای تخمدان کامل موش صحرایی ۵ هفته‌ای را بررسی کرده‌اند [۲۸]. از طرف دیگر؛ اثر این ترکیبات در حضور سوکروز یا بدون آن نیز مقایسه شد. به منظور بررسی میزان سمیت محلول‌های انجمادی برای هر گروه آزمایشی آزمون سمیت نیز صورت گرفت. به این ترتیب که تخمدان‌ها ابتدا با محلول انجمادی تیمار شدند و سپس بدون ورود به نیتروژن بلافاصله وارد مرحله ذوب (آب‌دهی) شدند. با این روش می‌توان دریافت که آسیب‌های وارد شده به بافت تخمدان در نتیجه کاهش دما بوده یا این که محلول‌های حاوی ضد یخ‌های سمی موجب آن شده است.

همان‌طور که اشاره شد مطالعات مشابهی نیز در مقایسه آثار ضد یخ‌های مختلف بر بافت تخمدان انسان [۶۰، ۶۷]، گوسفند [۶۸، ۶۹]، بز [۵۶، ۷۰]، گاو [۷۱]، گربه [۷۲]، جنین [۷۳] و سمن گراز [۷۴] صورت گرفته است. همچنین در مطالعات دیگری فراساختار بافت تخمدان گاو تحت تأثیر ضد یخ‌های مختلف بررسی [۵۷] و گزارش شده که ترکیب ضد یخ‌های DMSO و PROH در حفظ بافت تخمدان گاو نسبت به سایر ضد یخ‌ها موفق‌تر بوده است. پاینتر (Paynter) [۷۵]، بورگس (Borges) [۷۶] و همکارانشان گزارش کردند که مدت زمان کوتاهی انکوباسیون نمونه‌ها پس از انجماد به سلول‌ها و بافت اجازه بیشتری برای برگشت به حالت طبیعی می‌دهد. بنابراین محققان حاضر نیز پس از انجماد در حدود ۰/۵ ساعت تخمدان‌های موش صحرایی را انکوبه نمودند [۲۸].

باید توجه نمود که معمولاً از ترکیب ضد یخ‌ها برای کاهش اثر سمیت یک ضد یخ به تنهایی نیز استفاده می‌شود. از طرف دیگر؛ نسبت و شدت سمیت یک ضد یخ با تراکم بافت



### حفظ قدرت باروری در دمای پایین

به‌عنوان یک دی ساکارید، به دلیل این‌که در اطراف سلول قرار می‌گیرد، می‌تواند نقش بالشتکی را ایفا کند و سلول را تا حدودی از آسیب‌های فیزیکی و مکانیکی حفظ می‌نماید [۸۱]. البته این نکته مهم به‌نظر می‌رسد که باید اثر سوکروز بر فراساختار بافت نیز بررسی شود تا جنبه‌های مختلف آثار آن مشخص شود؛ چرا که در بسیاری از موارد ظاهر سلول و بافت حکایت درستی از ساختار درونی آن ندارد [۸۲].

در کنار استفاده از دی ساکاریدها به‌منظور کمک به روند نفوذ هر چه بهتر ضد یخ‌های نفوذ کننده، ماکرومولکول‌هایی نظیر فایکول (Ficoll) نیز مورد توجه بوده و در برخی از مطالعات استفاده شده‌است [۸۳، ۸۴]؛ اگرچه گسترش کاربرد آن‌ها مانند دی ساکاریدها نبوده‌است. عابد الهی و همکارانش نشان دادند که استفاده از ترکیب EG، سوکروز و فایکول با یکدیگر جواب بهتری در حفظ بافت تخمدان موش در جریان انجماد نسبت به EG به تنهایی داشته‌است [۸۳]. همچنین گزارش شده‌است که استفاده از سوکروز و فایکول در ترکیبات ضد یخ، میزان تشکیل کریستال یخ را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد [۸۵]. مطالعات دیگری نیز اثر ترکیبی مثبت EG با ماکرومولکول‌ها را در زنده ماندن بیشتر فولیکول‌ها در انجماد تخمدان انسان و حیوانات دیگر گزارش کرده‌اند [۶۴، ۸۶]. بنابراین به‌طور کلی می‌توان گفت که تغییر در ترکیب مواد ضد یخ، تغییر در محلول‌های تعادلی و دمای آن‌ها، استفاده از دی ساکاریدها و ماکرومولکول‌ها و تغییر در شرایط آب‌گیری و آب‌دهی می‌تواند آسیب‌های ناشی از کاهش دما را به حداقل برساند.

### پروتئین‌های ضد انجمادی (Anti-freeze Proteins)

اگرچه مدت زمان زیادی از کشف مواد ضد یخ و تاریخچه کوتاه مدت علم کرایوبیولوژی (Cryobiology) به شکل امروزی نمی‌گذرد، اما اثرگذاری علوم کشف شده در دو دهه اخیر بسیار بیشتر از قرن‌های گذشته بوده‌است. همان‌طور که می‌دانیم بسیاری از جانوران و گیاهان مناطق سردسیر برای

رابطه مستقیم دارد. از این رو انجماد شیشه‌ای تخمدان موش نسبت به انجماد تخمدان انسان راحت‌تر انجام می‌شود، چرا که از تراکم و فشردگی کمتری برخوردار است [۷۷]. ایساچنکو و همکاران در سال ۲۰۰۳ تخمدان انسان را با ترکیبی از ۴۰ درصد EG + ۰/۳۵ مول در لیتر سوکروز و زرده تخم مرغ منجمد کردند [۲۰] و پس از ذوب ظاهر بسیار خوب قطعات تخمدان را گزارش نمودند. به احتمال قوی علت این موفقیت به خاطر سمیت پایین ترکیب ضد یخ به همراه آب‌گیری مناسب توسط این سه ماده بوده‌است. بررسی روش‌های انجمادی نشان می‌دهد که با وجود مشکلات خاص، محققین زیادی اعتقاد دارند که انجماد شیشه‌ای نسبت به آهسته ارجحیت دارد. بیشترین میزان فولیکول‌های سالم در بافت تخمدان غیر انجمادی موش صحرایی، فولیکول‌های بدوی بودند که پس از انجماد در همه گروه‌های انجمادی بیشترین آسیب بر این نوع فولیکول وارد شد [۲۸]. فولیکول‌های بدوی به دلیل اندازه کوچک، فعالیت متابولیکی پایین، عدم وجود لایه زونا و گرانول‌های قشری و نیز میزان کم چربی درون سیتوپلاسمی حساس به کاهش دما [۵۷]، نسبت به فولیکول‌های دیگر به آسیب‌های انجمادی مقاومت بیشتری نشان می‌دهند.

به‌نظر می‌رسد زمانی که سوکروز به میزان ۰/۲۵ مول در لیتر به ترکیبات ضد یخ‌ها اضافه شد، در هر ترکیب اثرگذاری متفاوتی در حفظ گونه‌های مختلف فولیکولی داشته‌است. به‌طوری که در برخی موارد موجب کاهش فولیکول‌های سالم و در بعضی دیگر موجب حفظ آن‌ها شده‌است [۲۸]. شاید به همین دلیل است که در برخی مطالعات سوکروز را از ترکیبات ضد یخ خارج می‌کنند و نقش دی ساکاریدها را در فرآیند انجماد ناچیز دانسته و به همین دلیل از محلول‌های فاقد سوکروز (Free Sucrose Media) استفاده می‌کنند [۷۸]. با این حال سوکروز به‌عنوان یک دی ساکارید نقش به‌سزایی در موفقیت انجماد داشته‌است [۷۹]، چرا که استفاده از آن موجب کاهش میزان سمیت مواد ضد یخ شده و سرعت نفوذ ضد یخ‌های نفوذ کننده را افزایش می‌دهد [۸۰]. همچنین سوکروز

حفاظت خود در برابر سرما از مواد ضد یخ طبیعی استفاده می‌کنند که این امر می‌تواند محققین را در بهبود روش‌های انجمادی و کاهش آسیب‌های ناشی از آن یاری نماید. به‌طور مثال کرمی با نام علمی *Bracon cephi*، در طول پاییز در مایعات بدن خود به میزان ۲۵ درصد گلیسرول انباشته می‌کند تا بتواند سرمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد را تعدیل و تحمل نماید [۸۷]. گزارش شده است در بدن کرم دیگری با عنوان علمی *Tenebrio larvae*، پروتئین‌های ضد انجمادی ساخته می‌شود که اثرشان از مواد موجود در بدن ماهی قطبی نیز بسیار قوی‌تر است [۸۸].

از جمله موارد بسیار جذاب دیگر، تولید پروتئین‌های ضد انجمادی توسط ماهی‌های قطبی و حشرات زمستان خواب آن نواحی است. پروتئین‌های ضد انجمادی در اصل گلیکوپپتیدهایی هستند که به وسیله فرآیند جذب- مهار از ایجاد کریستال یخ در بدن جلوگیری می‌نمایند.

به‌نظر می‌رسد پروتئین‌های ضد انجمادی برای انجماد مواد زیستی با روش‌های فوق سریع برای جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ بسیار مناسب باشند. روبینسکی (*Rubinsky*) و همکارانش نشان دادند که اضافه کردن پروتئین‌های ضد انجمادی به محلول‌های انجماد شیشه‌ای، میزان رشد تخمک‌ها و جنین‌های کشت داده شده پس از ذوب را بهبود می‌بخشد [۸۹]. همچنین این مواد ضد انجماد فقط در بدن حیوانات دیده نمی‌شوند بلکه در ساختار برخی گیاهان نیز به خوبی وجود داشته و در برابر کاهش دما عمل می‌نمایند. محققین از ریشه نوعی هویج با نام علمی *Daucus carota*، پروتئین ضد انجمادی استخراج کرده‌اند که توانسته است از تشکیل کریستال‌های یخ به خوبی جلوگیری نماید [۹۰]. اگر چه اثر این پروتئین‌ها در برابر کاهش دما مشخص شده اما هنوز برای استفاده بهینه از آن‌ها تحقیقات دیگری باید صورت پذیرد.

برخی از آسیب‌های انجماد که ناشی از روش کار هستند، با تغییراتی در شیوه انجمادی تا حدودی بهبود می‌یابند. در حقیقت تعداد بی‌شماری روش‌های انجماد آهسته و شیشه‌ای

برای انجماد سلول‌های جنسی و بافت‌های تناسلی وجود دارد [۹۱] که محیط‌های مایع متفاوتی حاوی مواد و پروتئین‌های ضد یخ در طول فرآیند آب‌گیری و آب‌دهی، اطراف سلول‌ها فراهم کرده و با وجود این مواد سمی و آسیب‌رسان به همراه کاهش دما، آسیب‌های جدی به سلول‌ها و اندامک‌های سیتوپلاسمی آن‌ها وارد می‌آید. از جمله مهم‌ترین این آسیب‌ها می‌توان به برهم خوردن نظم اسکلت سلولی و دوک میوزی [۹۲]، چسبندگی سلول‌های رده میوزی (*Meiotic Cell Line*) و سوماتیک (*Somatic Cell Line*) [۹۳] و از بین رفتن نظم ساختاری درونی تخمک و سلول‌های گرانولوزا [۹۴] اشاره نمود.

در این مسأله که بررسی وضعیت سلول و بافت فقط از طریق بافت‌شناسی معمولی قابل اعتماد نیست، توافق کلی وجود دارد. مطالعات گذشته روی انجماد بافت تخمدان نشان داده‌است که نتایج بافت‌شناسی همیشه پس از بررسی با میکروسکوپ الکترونی تأیید نمی‌شود [۵۷، ۸۲]. از طرف دیگر، اگرچه اطلاعات به‌دست آمده از بررسی بافت‌شناسی می‌تواند به ارزیابی ما از نتایج انجماد کمک بسیاری نماید اما با توانایی رشد و زنده‌مانی سلول‌ها یا بافت مورد بررسی مطابقت کامل ندارند [۹۵]. به عبارت دیگر، با استناد به بافت‌شناسی نمی‌توان از زنده بودن سلول‌ها اطلاع دقیق حاصل کرد. بنابراین برای حصول اطمینان از زنده بودن سلول‌ها یا بافت و نیز توانایی حیات آن‌ها استفاده از روش‌های دیگری از جمله رنگ‌آمیزی‌های حیاتی ضروری می‌نماید [۶۸].

### نتیجه‌گیری

اگر چه سالیان زیادی است که از فرآیند کاهش دما برای حفظ مواد غذایی و عناصر زیستی استفاده می‌شود، اما علم کرایوبیولوژی در دو دهه اخیر توانسته است جایگاه ویژه‌ای نزد محققین در کمک به درمان برخی از بیماری‌ها و به خصوص در فرآیند «حفظ قدرت باروری» ایجاد نماید. به دنبال گزارش تولد نوزاد زنده انسان توسط دونز (*Donnez*) و همکارانش در سال ۲۰۰۴، امید محققین پس از بیش از یک قرن تلاش در

## حفظ قدرت باروری در دمای پایین

تنهایی قادر به ارایه اطلاعات دقیق از میزان آسیب درونی نخواهد بود. درست مانند ساختمانی که تحت اثر زلزله قرار گرفته و نمای بیرونی خود را حفظ کرده اما لوازم و وسایل داخلی آن به هم ریخته باشد، در این صورت زندگی در آن با مشکلات فراوانی همراه خواهد بود. بنابراین برآورد میزان خسارات وارده به سلول‌ها و ساختار یک بافت در اثر انجماد بدون بررسی فراساختار آن، میسر نخواهد بود. حتی در مواردی نیز لازم است تا با ارزیابی نحوه فعالیت بافت منجمد شده در محیط کشت یا بدن زنده (به دنبال پیوند آن)، این آسیب‌ها تا تولید یک موجود زنده رصد شود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل رساله دکتری رشته علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که مشترکاً با حمایت علمی و مالی دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشگاه رویان انجام شده است.

جهت بازگرداندن توانایی تولید مثل به دنبال پیوند بافت تخمدان به بار نشست و این امر نشان داد که انجماد و پیوند بافت تخمدان می‌تواند به عنوان ابزاری مطمئن در اختیار علم پزشکی قرار گیرد. اما با وجود این موفقیت بزرگ و گزارش‌های پراکنده دیگری که نشان دهنده تولد نوزاد پس از پیوند بافت تخمدان انجمادی دارد، هنوز سؤالات متعددی در رابطه با انجماد بافت تخمدان و پیوند آن وجود دارد که بدون راه حل مانده است: این که آیا انجماد می‌تواند ساختار تمامی سلول‌های یک بافت را به خوبی حفظ نماید یا خیر؟ کدام روش انجمادی و برای چه نوع بافتی مؤثرتر است؟ آسیب‌های انجمادی ناشی از کاهش دما یا اثر سمی ضد یخ‌ها تا چه حد فعالیت حیاتی بافت و سلول‌ها را پس از ذوب دستخوش تغییر قرار می‌دهد؟ کدام ضد یخ‌ها، به چه میزان و چه ترکیبی از آن‌ها برای گونه مورد نظر مناسب‌تر است؟ آیا آسیب ناشی از کاهش دما یا اثر ضد یخ‌ها بر سلول‌های بافت و ارتباطات بین آن‌ها برگشت پذیرند؟ تا چه حدودی باید این آسیب‌ها مورد ارزیابی قرار بگیرند؟ مطمئناً بررسی ریخت‌شناسی بافت به

## منابع

- [1] Donnez J, Bassil S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. Hum Reprod Update 1998; 4(3): 248-59.
- [2] Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. Hum Reprod Update 2004; 10(3): 251-66.
- [3] Silber SJ. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. Mol Hum Reprod 2012; 18(2): 59-67.
- [4] Borini A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C, Coticchio G. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. Hum Reprod 2006; 21(2): 512-.
- [5] Levi Setti PE, Albani E, Novara PV, Cesana A, Morreale G. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. Hum Reprod 2006; 21(2): 370-5.
- [6] Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Fratto R, Giunchi S, Venturoli S. Oocyte cryopreservation in oncological patients. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004; 113 Suppl 1: S14-6.
- [7] Akar M, Oktay K. Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. Trends Endocrinol Metab 2005; 16(8): 374-80.
- [8] Wang CT, Liang L, Witz C, Williams D, Griffith J, Skorupski J, Haddad G, Gill J, Wang

- W. Optimized protocol for cryopreservation of human eggs improves developmental competence and implantation of resulting embryos. *J Ovarian Res* 2013; 6(1): 15.
- [9] Van der Elst J. Oocyte freezing: here to stay? *Hum Reprod Update* 2003; 9(5): 463-70.
- [10] Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990; 54(1): 102-8.
- [11] Alcoba DD, Pimentel AM, Brum IS, Corleta HE. Developmental potential of in vitro or in vivo matured oocytes. *Zygote* 2013; 1-6.
- [12] Boiso I, Martí M, Santaló J, Ponsá M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod* 2002; 17(7): 1885-91.
- [13] Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O, Gosden RG. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril* 1998; 69(1): 1-7.
- [14] Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 1998; 4(2): 103-20.
- [15] Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil Steril* 1998; 70(3): 578-9.
- [16] Wu J, Zhang L, Wang X. In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 2001; 121(3): 389-93.
- [17] Kan A, Kilani S, Tilia L, Mitchell F, Burns K, Chapman M. Pregnancy from intracytoplasmic injection of a frozen-thawed oocyte. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2004; 44(3): 262-3.
- [18] Brambillasca F, Guglielmo MC, Coticchio G, Mignini Renzini M, Dal Canto M, Fadini R. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30(12): 1531-9.
- [19] Donnez J, Silber S, Andersen CY, Demeestere I, Piver P, Meirou D, Pellicer A, Dolmans MM. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births. *Ann Med* 2011; 43(6): 437-50.
- [20] 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(2): 186-93.
- [21] Kondapalli LA, Dillon KE, Sammel MD, Ray A, Prewitt M, Ginsberg JP, Gracia CR. Quality of life in female cancer survivors: is it related to ovarian reserve? *Qual Life Res* 2013. [Epub ahead of print]
- [22] Li YB, Zhou CQ, Yang GF, Wang Q, Dong Y. Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120(2): 110-4.
- [23] Schmidt KL, Ernst E, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Yding Andersen C. Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Hum Reprod* 2003; 18(12): 2654-9.
- [24] Dittrich R, Lotz L, Keck G, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, van der Ven H,

- Montag M.. Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. *Fertil Steril* 2012; 97(2): 387-90.
- [25] Bedaiwy MA, Falcone T. Ovarian tissue banking for cancer patients: reduction of post-transplantation ischaemic injury: intact ovary freezing and transplantation. *Hum Reprod* 2004; 19(6): 1242-4.
- [26] Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tan SL, Gosden RG. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod* 2003; 18(6): 1165-72.
- [27] Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Lin Tan S, Gosden RG. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002; 415(6870): 385.
- [28] Fathi R, Valojerdi MR, Salehnia M. Effects of different cryoprotectant combinations on primordial follicle survivability and apoptosis incidence after vitrification of whole rat ovary. *Cryo Letters* 2013; 34(3): 228-38.
- [29] Chen CH, Chen SG, Wu GJ, Wang J, Yu CP, Liu JY. Autologous heterotopic transplantation of intact rabbit ovary after frozen banking at -196 degrees C. *Fertil Steril* 2006; 86(4 Suppl): 1059-66.
- [30] Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M, Rudas M, Hofstetter G, Huber J. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertil Steril* 2006; 85 Suppl 1: 1208-15.
- [31] Maffei S, Hanenberg M, Pennarossa G, Silva JR, Brevini TA, Arav A, Gandolfi F. Direct comparative analysis of conventional and directional freezing for the cryopreservation of whole ovaries. *Fertil Steril* 2013; 100(4): 1122-31.
- [32] Arav A, Revel A, Nathan Y, Bor A, Gacitua H, Yavin S, Gavish Z, Uri M, Elami A. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Hum Reprod* 2005; 20(12): 3554-9.
- [33] Bedaiwy MA, Jeremias E, Gurunluoglu R, Hussein MR, Siemianow M, Biscotti C, Falcone T. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil Steril* 2003; 79(3): 594-602.
- [34] Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrère S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 2004; 82(5): 1390-4.
- [35] Martinez-Madrid B, Camboni A, Dolmans MM, Nottola S, Van Langendonck A, Donnez J. Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. *Fertil Steril* 2007; 87(5): 1153-65.
- [36] Nottola SA, Camboni A, Van Langendonck A, Demyelle D, Macchiarelli G, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Correr S, Donnez J. Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertil Steril* 2008; 90(1): 23-32.
- [37] Oktem O, Oktay K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. *Cancer Res* 2007; 67(21):

- 10159-62.
- [38] Silber SJ, Gosden RG. Ovarian transplantation in a series of monozygotic twins discordant for ovarian failure. *N Engl J Med* 2007; 356(13): 1382-4.
- [39] Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001; 16(3): 411-6.
- [40] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 313(6003): 573-5.
- [41] Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Hassani F, Movaghar B. Effect of laser zona thinning on vitrified-warmed embryo transfer at the cleavage stage: a prospective, randomized study. *Reprod Biomed Online* 2010; 20(2): 234-42.
- [42] Beier AF, Schulz JC, Zimmermann H. Cryopreservation with a twist - towards a sterile, serum-free surface-based vitrification of hESCs. *Cryobiology* 2013; 66(1): 8-16.
- [43] Fathi R, Valojerdi MR, Eimani H, Hasani F, Yazdi PE, Ajdari Z, Tahaei LS. Sheep ovarian tissue vitrification by two different dehydration protocols and needle immersing methods. *Cryo Letters* 2011; 32(1): 51-6.
- [44] Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril* 1997; 67(3): 481-6.
- [45] Fabbri R, Venturoli S, D'Errico A, Iannascoli C, Gabusi E, Valeri B, Seracchioli R, Grigioni WF. Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation. *Gynecol Oncol* 2003; 89(2): 259-66.
- [46] Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J, Montag M, van der Ven K, Dorn C, Roesing B, van der Ven H. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of rapid and conventional freezing. *Cryobiology* 2007; 55(3): 261-8.
- [47] Yeoman RR, Wolf DP, Lee DM. CCoculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertil Steril* 2005; 83 Suppl 1: 1248-54.
- [48] 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: 1150-6.
- [49] Gosden RG. Gonadal tissue cryopreservation and transplantation. *Reprod Biomed Online* 2002; 4 Suppl 1: 64-7.
- [50] Hovatta O. Cryobiology of ovarian and testicular tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17(2): 331-42.
- [51] Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonck A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364(9443): 1405-10.
- [52] Meirou D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005; 353(3):

- 318-21.
- [53] Donnez J, Godin PA, Qu J, Nisolle M. Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; 12(1): 1-9.
- [54] 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.
- [55] Baird DT, Campbell B, de Souza C, Telfer E. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and autotransplantation of cryopreserved cortical strips. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 113 Suppl 1: S55-9.
- [56] Rodrigues AP, Amorim CA, Costa SH, Matos MH, Santos RR, Lucci CM, Bao SN, Ohashi OM, Figueiredo JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci* 2004; 84(1-2): 211-27.
- [57] Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LH, Rumpf R, Bao SN. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology* 2004; 61(6): 1101-14.
- [58] Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, Wininger JD, Massey JB, Lamb SV, Brackett BG. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology* 2004; 61(2-3): 581-94.
- [59] Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996; 11(7): 1487-91.
- [60] Newton H, Fisher J, Arnold JR, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 1998; 13(2): 376-80.
- [61] Tryde Schmidt KL, Yding Andersen C, Starup J, Loft A, Byskov AG, Nyboe Andersen A. Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer - follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. *Reprod Biomed Online* 2004; 8(4): 448-53.
- [62] Gook DA, Edgar DH, Stern C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1, 2-propanediol. *Hum Reprod* 1999; 14(8): 2061-8.
- [63] Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online* 2003; 7(6): 623-33.
- [64] Salehnia M, Abbasian Moghadam E, Rezazadeh Velojerdi M. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 2002; 78(3): 644-5.
- [65] Tokieda Y, Ishiwata I, Segino M, Ishikawa H, Sato K. Establishment of a novel method for cryopreservation and thawing of the mouse ovary. *Hum Cell* 2002; 15(4): 230-7.
- [66] Migishima F, Suzuki-Migishima R, Song SY, Kuramochi T, Azuma S, Nishijima M, Yokoyama M. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod* 2003; 68(3): 881-7.
- [67] Sobaniec-Lotowska ME, Lebensztejn DM. Ultrastructure of Kupffer cells and hepatocytes

- in the Dubin-Johnson syndrome: a case report. *World J Gastroenterol* 2006; 12(6): 987-9.
- [68]Capacchietti G, Cecconi S, Gioia L, Turriani M. Effect of cryoprotectant agents on the potential development of sheep preantral follicles. *Vet Res Commun* 2004; 28 Suppl 1: 173-6.
- [69]Santos RR, Rodrigues AP, Costa SH, Silva JR, Matos MH, Lucci CM, Bão SN, van den Hurk R, Figueiredo JR. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2006; 91(3-4): 249-63.
- [70]Santos RR, Tharasanit T, Figueiredo JR, van Haefen T, van den Hurk R. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell Tissue Res* 2006; 325(3): 523-31.
- [71]Celestino JJ, dos Santos RR, Lopes CA, Martins FS, Matos MH, Melo MA, Bão SN, Rodrigues AP, Silva JR, de Figueiredo JR. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Anim Reprod Sci* 2008; 108(3-4): 309-18.
- [72]Lima AK, Silva AR, Santos RR, Sales DM, Evangelista AF, Figueiredo JR, Silva LD. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology* 2006; 66(6-7): 1664-6.
- [73]Fornari DC, Ribeiro RP, Streit D, Godoy LC, Neves PR, de Oliveira D, Sirol RN. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at 8°C. *Zygote* 2011: 1-6. [Epub ahead of print].
- [74]Zhang W, Yi K, Chen C, Hou X, Zhou X. Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2012; 132(3-4): 123-8.
- [75]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(4): 301-9.
- [76]Borges EN, Silva RC, Futino DO, Rocha-Junior CM, Amorim CA, Bão SN, Lucci CM. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology* 2009; 59(2): 195-200.
- [77]Erickson GF, Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(5): 193-8.
- [78]El-Gayar M, Gauly M, Holtz W. One-step dilution of open-pulled-straw (OPS)-vitrified mouse blastocysts in sucrose-free medium. *Cryobiology* 2008; 57(3): 191-4.
- [79]Jin B, Mochida K, Ogura A, Hotta E, Kobayashi Y, Ito K, Egawa G, Seki S, Honda H, Edashige K, Kasai M. Equilibrium vitrification of mouse embryos. *Biol Reprod* 2010; 82(2): 444-50.
- [80]Liu Z, Foote RH, Brockett CC. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology* 1998; 37(3): 219-30.
- [81]Yap LV, Noor NM, Clyde MM, Chin HF. Cryopreservation of *Garcinia cowa* shoot tips by vitrification: the effects of sucrose preculture and loading treatment on ultrastructural changes in meristematic cells.



- Cryo Letters 2011; 32(3): 188-96.
- [82] Silva JR, Bao SN, Lucci CM, Carvalho FC, Andrade ER, Ferreira MA, Figueiredo JR. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved in vitro. *Anim Reprod Sci* 2001; 66(3-4): 209-23.
- [83] Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA. The effects of different concentrations of sodium selenite on the in vitro maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25(9-10): 483-8.
- [84] Fathi R, Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P. Effect of laser-assisted hatching and necrotic blastomere removal on the development of vitrified-warmed four-cell mouse embryos. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25(7): 333-9.
- [85] Nagano M, Atabay EP, Atabay EC, Hishinuma M, Katagiri S, Takahashi Y. Effects of isolation method and pre-treatment with ethylene glycol or raffinose before vitrification on in vitro viability of mouse preantral follicles. *Biomed Res* 2007; 28(3): 153-60.
- [86] Gook DA, Edgar DH, Borg J, Archer J, McBain JC. Diagnostic assessment of the developmental potential of human cryopreserved ovarian tissue from multiple patients using xenografting. *Hum Reprod* 2005; 20(1): 72-8.
- [87] Rubinsky B, Arav A, Devries AL. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. *Cryobiology* 1992; 29(1): 69-79.
- [88] Graham LA, Liou YC, Walker VK, Davies PL. Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature* 1997; 388(6644): 727-8.
- [89] Rubinsky B, Cogger R, Ewart KV, Fletcher GL. Ice-crystal growth and lectins. *Nature* 1992; 360(6400): 113-4.
- [90] Smallwood M, Worrall D, Byass L, Elias L, Ashford D, Doucet CJ, Holt C, Telford J, Lillford P, Bowles DJ. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*). *Biochem J* 1999; 340(Pt 2): 385-91.
- [91] Makarevich AV, Kubovicova E, Popelkova M, Fabian D, Cikos S, Pivko J, Chrenek P. Several aspects of animal embryo cryopreservation: anti-freeze protein (AFP) as a potential cryoprotectant. *Zygote* 2010; 18(2): 145-53.
- [92] Vincent C, Johnson MH. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxf Rev Reprod Biol* 1992; 14: 73-100.
- [93] Gilchrist RB, Nayudu PL, Nowshari MA, Hodges JK. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biol Reprod* 1995; 52(6): 1234-43.
- [94] Navarro-Costa P, Correia SC, Gouveia-Oliveira A, Negreiro F, Jorge S, Cidadao AJ, Carvalho MJ, Plancha CE. Effects of mouse ovarian tissue cryopreservation on granulosa cell-oocyte interaction. *Hum Reprod* 2005; 20(6): 1607-14.
- [95] van den Hurk R, Spek ER, Hage WJ, Fair T, Ralph JH, Schotanus K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Hum Reprod Update* 1998; 4(6): 833-41.