

Vitrification does not Increase the Incidence of Apoptosis and Caspase 3/7 Activity in Human Ovarian Tissues

Maasoume Abdollahi¹, Mojdeh Salehnia^{2*}, Saghar Salehpour³

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Associated Professor, Infertility and Reproductive Health Research Center (IRHRC), Ayatollah Taleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

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

Received: 20/Nov/2013, Accepted: 08/Jan/2014

Abstract

Objective: This study aimed to evaluate the incidence of apoptosis in vitrified and non-vitrified human ovarian tissue by the use of morphological analysis and apoptosis assay techniques.

Methods: We obtained human ovarian tissue biopsies from 30 women who underwent elective caesarean sections. Tissues were transported to the laboratory in pre-warmed, equilibrated Leibovitz L-15 medium within 2 hours. The tissues were cut into small pieces and divided into two groups, vitrified and non-vitrified (control). Apoptosis incidence was assessed by light microscope and the TUNEL assay and DNA laddering. Evaluation of caspase 3/7 protein levels was performed by the luminescent assay.

Results: We observed no morphological signs of apoptosis in the vitrified samples. There were no apoptosis signals as evidenced by TUNEL staining and no DNA laddering pattern observed in the vitrified group. Caspase 3/7 activity was 2294 ± 169.19 RLU/ μ g protein in the non-vitrified control group and 2231 ± 89.271 RLU/ μ g protein in the vitrified group, which was not significantly different.

Conclusion: The structure of human vitrified ovarian tissue was well preserved. Vitrification could not increase apoptosis and caspase 3/7 activity in human ovarian tissue.

Keywords: Vitrification, Ovary, Human, Apoptosis, Caspase 3, Caspase 7

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 4, Winter 2014, Pages: 47-58

انجماد شیشه‌ای باعث افزایش وقوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و فعالیت کاسپاز ۳/۷ در بافت تخمدان انسانی نمی‌شود

معصومه عبدالحی^۱، مؤده صالح‌نیا^{۲*}، ساغر صالح‌پور^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقاتی باروری و ناباروری، بیمارستان آیت الله طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

Email: salehnm@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۱۰/۱۸

دریافت مقاله: ۹۲/۰۸/۲۹

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه ارزیابی وقوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) در بافت تخمدان انسانی انجماد شیشه‌ای شده در مقایسه با گروه کنترل به وسیله مطالعات مورفولوژیک و چندین روش ارزیابی آپوپتوز بود.

مواد و روش‌ها: قطعات قشر بافت تخمدان انسان از ۳۰ نفر تحت عمل سزارین گرفته شد و در محیط Leibovitz L-15 طی ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس قشر تخمدان به قطعات کوچکی بریده و به صورت تصادفی در دو گروه انجماد شیشه‌ای و کنترل غیر انجمادی تقسیم‌بندی شد. ارزیابی میزان وقوع آپوپتوز به وسیله مطالعات ریخت‌شناسی و روش‌هایی چون تانل، طرح نردبانی DNA و بررسی سطح بیان پروتئین‌های کاسپاز ۳/۷ به روش لومینوسنت، در بافت تخمدان صورت گرفت.

نتایج: نشانه‌ای از تغییرات ریخت‌شناسی مرتبط با مرگ سلولی آپوپتوز در بافت تخمدان انسان پس از انجماد شیشه‌ای و ذوب دیده نشد. نشانه‌های آپوپتوزی و طرح نردبانی DNA در گروه انجمادی مشاهده نشد. سطح کاسپاز ۳/۷ در دو گروه غیر انجمادی و انجمادی به ترتیب $2231 \pm 89/271$ ، $2294 \pm 169/19$ RLU بر میلی‌گرم پروتئین بود و بین دو گروه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: ریخت‌شناسی بافت تخمدان انسان پس از انجماد شیشه‌ای به خوبی حفظ شد به طوری که روش انجمادی ارایه شده در مطالعه حاضر باعث افزایش آپوپتوز و نیز فعالیت کاسپاز ۳/۷ در بافت تخمدان نشد.

کلیدواژگان: انجماد شیشه‌ای، تخمدان، انسان، آپوپتوز، کاسپاز ۳، کاسپاز ۷

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، صفحات: ۴۷-۵۸

مقدمه

در حال رشد و سلول‌های مختلف است که هر کدام به طور متفاوت طی فرآیند انجماد و ذوب تحت تأثیر قرار می‌گیرند. به همین دلیل دستیابی به شرایط بهینه انجماد بافت تخمدان با چالش‌های زیادی روبه‌رو است.

انجماد بافت تخمدان یکی از روش‌های حفظ باروری است که برخلاف انجماد تخمک و جنین می‌تواند قبل یا بعد از بلوغ و در هر مرحله‌ای از چرخه قاعدگی انجام شود. بافت تخمدان دارای مجموعه‌ای از فولیکول‌های بدوی، فولیکول‌های

انجماد بافت تخمدان برای اولین بار در دهه ۱۹۵۰ توسط دینسلی (Deansely) و همکارانش مطرح شد. در این پژوهش آن‌ها تخمدان‌های نوزاد موش صحرایی ۷ روزه را منجمد و ذوب کردند و به بدن موش صحرایی بالغ پیوند زدند [۱]. دو روش برای انجماد بافت تخمدان کاربرد دارد: انجماد آهسته و انجماد شیشه‌ای. مفهوم انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان انسانی اولین بار در اوایل قرن اخیر توسط ژانگ (Zhang) و همکارانش شرح داده شد [۲]. به منظور دستیابی به انجماد شیشه‌ای موفق محققین دریافته‌اند که سرعت سرد شدن بالا و غلظت‌های بالای ترکیبات ضد یخ لازم است. این مسئله در ابتدا غیر کاربردی به نظر می‌رسید؛ به همین دلیل توجه محققین به توسعه بیشتر روش انجماد آهسته معطوف شد و این روش تاکنون نیز به عنوان روش معمول در کرایوبیولوژی (Cryobiology) مطرح است [۳]. انجماد بافت تخمدان انسانی به روش آهسته اولین بار در سال ۱۹۹۶ توسط دو گروه از محققین به نام‌های هوواتا (Hovatta) و نیوتن (Newton) و همکارانشان انجام شد [۴، ۵]. اخیراً توجه بیشتری به روش انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان انسان شده است [۶-۸]. انجماد شیشه‌ای فرآیند جامد شدن بدون تشکیل کریستال‌های یخ است که باعث حفظ یکپارچگی و عملکرد بافت تخمدان و فولیکول‌های آن می‌شود [۹].

انجماد شیشه‌ای یک روش سریع، راحت و به صرفه برای انجماد بافت تخمدان است که نیاز به تجهیزات پر هزینه ندارد و نتایج امیدوار کننده‌ای داشته است. اما انجماد شیشه‌ای تخمدان انسان به دلیل تراکم بالای بافت و احتمال القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز (Apoptosis)) در آن طی فرآیند انجماد/ ذوب نیاز به بررسی بیشتری دارد [۶].

آپوپتوز پاسخ نهایی سلول به شرایط نامناسب و فشارهای مختلف است. آپوپتوز امکان دارد طی فرآیند انجماد به خاطر تغییر شرایط فیزیکی القا شود. هنگامی که در سلول فرآیند آپوپتوز القا می‌شود، آبشار مرگ سلولی باعث فعال شدن کاسپازها و در نتیجه تخریب سلول می‌شود [۱۰]. گزارش‌های متفاوتی راجع به ارزیابی مرگ سلولی بعد از ذوب بافت

تخمدان انسانی انجماد شیشه‌ای شده وجود دارد [۱۱-۱۴]. ژو (Zhou) و همکارانش با استفاده از رنگ‌آمیزی تانل (TUNEL) میزان بیشتری از مرگ آپوپتوز در بافت تخمدان انجماد شیشه‌ای شده را نسبت به غیر انجمادی مشاهده کردند [۱۱]. اما چانگ (Chang) و همکارانش نشانه‌های آپوپتوزی کمتری در بافت تخمدان انجماد شیشه‌ای شده نسبت به گروه انجماد آهسته گزارش کردند [۱۲]. گزیو (Xiao) و همکارانش نیز با رنگ‌آمیزی تانل میزان آپوپتوز کمتری در فولیکول‌های بدوی، سلول‌های استرومایی بافت تخمدان انجماد شیشه‌ای شده نسبت به گروه انجماد آهسته مشاهده کردند [۱۳]. صالح‌نیا و همکاران نیز وقوع آپوپتوز را در گروه انجماد شیشه‌ای در مقایسه با انجماد فوق سریع بررسی کردند و مشاهده کردند که انجماد تأثیری بر وقوع آپوپتوز نداشته است [۱۴]. در مطالعه گذشته که اولین گزارش انجماد بافت تخمدان انسانی به روش شیشه‌ای در ایران بود، محققان حاضر به بررسی بیان چندین ژن پروآپوپتوزی و آنتی‌آپوپتوزی (Fas, Bax, Bcl-2, p53, caspase 3, BIRC5, caspase 8) پرداختند که در بقای فولیکول نیز نقش دارد. بر اساس نتایج تفاوت اندکی در بیان ژن‌های آپوپتوزی در گروه انجمادی نسبت به گروه غیر انجمادی وجود داشت [۱۵].

با توجه به اهمیت بررسی آپوپتوز پس از انجماد و ذوب که می‌تواند روشی مناسب برای ارزیابی کیفیت روش انجماد نیز باشد، هدف این مطالعه ارزیابی آپوپتوز در بافت تخمدان انسانی انجماد شیشه‌ای شده با استفاده از چندین روش تکمیلی بود به خصوص بررسی فعالیت آنزیم کاسپاز ۳/۷ به روش لومینوسنت (Luminescent) که برای اولین بار نه تنها در ایران بلکه در سطح جهانی صورت گرفته است.

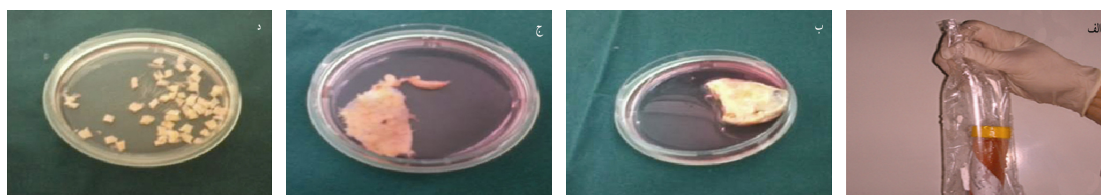
مواد و روش‌ها

جمع‌آوری بافت تخمدان انسانی

پس از تکمیل فرم رضایت بیمار و تأیید کمیته اخلاق

آماده‌سازی بافت تخمدان

با استفاده از اسکالپل بخش مرکزی بافت تخمدان جدا و سپس قشر بافت آن نیز به صورت قطعات باریک کوچک با ابعاد تقریبی $1 \times 1 \times 1$ میلی‌متر بریده شد (شکل ۱). پس از شستشو در محیط کشت، تعدادی از قطعات به عنوان گروه انجمادی به روش انجماد شیشه‌ای منجمد و قطعات دیگر به عنوان گروه کنترل به صورت تازه تحت عنوان گروه غیر انجمادی بررسی شدند.



شکل ۱ مراحل آماده‌سازی قطعات بافت تخمدانی برای انجماد شیشه‌ای؛ نحوه انتقال نمونه به آزمایشگاه (الف)، شست و شوی تخمدان در محیط کشت (ب)، حذف بخش مرکزی بافت تخمدان از قسمت قشری (ج)، قطعه قطعه کردن نمونه به صورت قطعات کوچک (د)

انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان

برای انجماد شیشه‌ای در این پژوهش از روش رایج شده توسط صالح‌نیا و همکاران به نام EFS 40 (Ethylene Glycol Ficol Sucrose) حاوی محلول ضد یخ حاوی ۴۰ درصد اتیلن گلیکول، ۳۰ درصد فایکول ۷۰ (وزنی/ حجمی)، ساکارز نیم مول در لیتر و سرم آلبومین انسانی (Human Serum Albumin: HSA)، با اندکی تغییر استفاده شد [۱۶].

قطعات بافت تخمدان (۳۰ نمونه) از قطره محیط کشت به ۳ قطره متوالی محلول ضد یخ منتقل شدند تا عمل آب‌گیری در مدت زمان ۵ دقیقه انجام شود. قطعاتی از بافت تخمدان که عمل آب‌گیری آن‌ها رو به انتها بود با مقدار کمی محلول ضد یخ به کرایوتوب (Cryotop) حاوی محلول انجمادی (به میزان ۱۰۰ لاند) منتقل و به مدت یک هفته درون تانک حاوی نیتروژن مایع نگهداری شدند.

ذوب بافت تخمدان انسانی

ذوب به روش سریع و به کمک محلول‌های ساکارز با غلظت

نزولی و PBI (Phosphate Buffer I) به ترتیب زیر انجام گرفت؛ محلول‌های ساکارز ۱، ۰/۵ مول در PBI ساخته شد و سپس زیر هود با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در موقع ذوب قطعات بافت تخمدان، در ظرف کشت ۶ سانتی‌متر، ۳ قطره به حجم ۱۰۰ میکرولیتر از هرکدام از محلول‌های ساکارز نزولی و PBI ریخته شد. مراحل ذوب قطعات بافت تخمدان بدین ترتیب بود که ابتدا کرایوتوب‌های حاوی قطعات بافت تخمدان از ازت مایع بیرون آورده شد و ۳۰ ثانیه در بخار ازت و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در درجه حرارت آزمایشگاه نگه داشته شد. در مرحله بعد، کرایوتوب‌ها در آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا زمانی که محلول درون کرایوتوب‌ها ذوب شود. بلافاصله قطعات بافت تخمدان به کمک پنس برداشته و به ترتیب به قطرات ساکارز نزولی و PBI که از قبل آماده شده بود، منتقل شدند. کل زمان آب‌دهی ۵ دقیقه بود. پس از این زمان قطعات بافت تخمدان به پلیت حاوی محیط کشت α -MEM (α -Minimum Essential Medium) حاوی سرم منتقل شدند و در انکوباتور CO_2 در دمای

کیت بررسی مرگ سلولی تانل (Roche, آلمان؛ Cat. No. 1 795 684) استفاده شد. قطعات بافت تخمدان انجمادی و غیرانجمادی (۳ نمونه در هر گروه و سه برش از هر نمونه هر گروه) در فرمالین ۱۰ درصد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب (Overnight) تثبیت شدند. مراحل آماده‌سازی بافت، مشابه تهیه نمونه در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین بود. سپس برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و روی لام‌های آغشته شده به پلی-ال لیزین (Poly-L lysine) قرار داده شد. از هر قطعه بافت تخمدان ۱۰ برش به صورت تصادفی انتخاب و بعد از پارافین‌زدایی و آب‌دهی در محلول واکنش تانل، در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شد.

قطعه قطعه شدن DNA به علت آپوپتوز، در روش تانل با کروماتین واکنش داده و زیر میکروسکوپ فلورسانس Zeiss (911, Zeiss, آلمان) ایجاد رنگ زرد درخشان نمود. از پرویدیدیم یدید (Propidium Iodide) نیز برای رنگ‌آمیزی افتراقی استفاده شد.

بر اساس دستورالعمل کیت بعد از مرحله نفوذپذیری به وسیله پروتئیناز K، ۵۰ میکرولیتر از محلول واکنش تانل به مدت یک ساعت در تاریکی روی نمونه‌ها قرار داده شد. لام‌ها در پلیت‌هایی که کف آن برای ایجاد رطوبت و جلوگیری از خشک شدن نمونه، کاغذ صافی نم دار گذاشته شده بود قرار داده شد.

در این پژوهش از تیموس موش که آپوپتوز در آن‌ها القا شده بود به عنوان کنترل مثبت خارجی استفاده شد. بدین منظور و برای القا آپوپتوز در بافت تیموس، ۸ میلی‌گرم/کیلوگرم دگزامتازون به صورت داخل صفاقی به موش‌های سوری چهار هفته‌ای تزریق شد. بعد از ۱۵ ساعت تیموس از بدن حیوان خارج و برش‌های با ضخامت ۵ میکرومتر مطابق معمول تهیه شد. مراحل رنگ‌آمیزی این نمونه‌ها مشابه روش کار گفته شده در رنگ‌آمیزی تانل انجام شد.

به عنوان کنترل منفی مطابق دستورالعمل کیت تعدادی از

۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵ درصد به مدت نیم ساعت نگهداری شدند.

بررسی میزان وقوع آپوپتوز در بافت تخمدان انسانی

برای بررسی اثر انجماد شیشه‌ای بر میزان وقوع آپوپتوز بافت تخمدان از روش‌های ارزیابی ریخت‌شناسی، قطعه قطعه شدن DNA به وسیله تانل، طرح نردبانی DNA (DNA Laddering) و ارزیابی کاسپاز ۳/۷ استفاده شد. ارزیابی ریخت‌شناسی بافت‌ها با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (Hematoxylin and Eosin) و همچنین میکروسکوپ الکترونی انجام شد. قطعه قطعه شدن DNA نشانه خوبی از آپوپتوز است که برای تأیید آن از رنگ‌آمیزی تانل و الکتروفورز ژل حاوی DNA استخراج شده از بافت استفاده شد.

مطالعه بافت‌شناسی تخمدان انسانی

پس از تهیه قطعات بافت تخمدانی (۳۰ نمونه)، از هر یک از گروه‌های اصلی انجمادی و غیر انجمادی برای مطالعات بافت‌شناسی در نظر گرفته شد. تثبیت بافت تخمدان به وسیله محلول فرمالین ۱۰ درصد صورت گرفت. فولیکول‌ها بر اساس ریخت‌شناسی سلول‌های گرانولوزا به صورت گروه‌های زیر تقسیم‌بندی شدند: مرحله بدوی، مرحله اولیه، مرحله در حال رشد. بر اساس این تقسیم‌بندی، شمارش فولیکول‌ها از نظر تعداد و سلامت آن‌ها در هر مرحله از رشد در بافت تخمدان، قبل از انجماد انجام شد. فولیکول‌های سالم دارای سلول‌های گرانولوزای سالم با رنگ‌پذیری طبیعی بودند و به دنبال از دست دادن زودرس تخمک، تیره رنگ شدن فولیکول و سلول‌های گرانولوزای جدا شده، فولیکول به عنوان دژنره در نظر گرفته شد [۱۴].

ارزیابی آپوپتوز به وسیله روش تانل

برای ارزیابی قطعه قطعه شدن DNA هسته سلول‌ها، از

برش‌های تهیه شده از قطعات بافت تخمدان تنها با ۵۰ میکرولیتر از نوکلئوتیدهای نشاندار شده با رنگ فلورسانس بدون آنزیم TdT پوشانده شد. بقیه مراحل کار مطابق رنگ‌آمیزی تانل انجام شد.

ارزیابی آپوپتوز تخمدان به وسیله طرح نردبانی DNA

یکی از نشانه‌های آپوپتوز، ایجاد طرح نردبانی DNA روی ژل آگارز است که به علت قطعه قطعه شدن DNA ایجاد می‌شود. به همین علت در این پژوهش DNA از نمونه‌ها (در هر بار استخراج ۳ قطعه بافت تخمدانی در هر گروه حداقل سه بار تکرار برای هر گروه، مجموعاً ۹ عدد در هر گروه) طبق دستورالعمل کیت (Apoptotic DNA Ladder Kit 1 835 246 Roche، آلمان) استخراج شد. سپس برای مشخص شدن قطعه قطعه شدن DNA روی ژل آگارز ۱ درصد به مدت ۴۵ دقیقه و با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز صورت گرفت. از تیموس موش‌های تیمار شده با دگزامتازون به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بدین ترتیب DNA استخراج شده از تیموس این موش‌ها روی ژل الکتروفورز ایجاد طرح نردبانی مشخصه آپوپتوز نمود.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاسپاز ۳/۷

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت کاسپاز ۳/۷ از کیت (Caspase- Glo® 3/7 Assay، Promega، آمریکا) بر اساس واکنش لوسین و لوسیفراز استفاده شد. در این مطالعه تعداد ۳ قطعه تخمدان در هر گروه و حداقل سه بار تکرار، مجموعاً ۹ عدد در هر گروه در نظر گرفته شد. روش کار به طور خلاصه به شرح زیر بود:

بافر لیز کننده شامل ۲۵ میلی‌مولار هپس (Hepes) (۷/۵ pH)، ۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۱ میلی‌مولار EDTA (Ethylene-diaminetetraacetic Acid) به بافت تخمدان اضافه و به مدت

۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد، سپس با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مخلوط حاصل جمع‌آوری و به دو بخش، بخشی برای محاسبه پروتئین کل و بخشی برای محاسبه فعالیت آنزیم تقسیم شد.

ابتدا غلظت پروتئین نمونه‌های مورد آزمایش با استفاده از روش برادفورد (Bradford) اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که ابتدا ۱۰ میکرولیتر محلول برادفورد به نمونه‌های لیز شده اضافه و ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس میزان پروتئین نمونه توسط دستگاه مربوط اندازه‌گیری و میزان ثابتی از پروتئین برای ارزیابی کاسپاز استفاده شد [۱۷].

برای اندازه‌گیری کاسپاز ۳/۷ بر اساس دستورالعمل کیت اقدام شد (Caspase- Glo® 3/7 Assay، Promega، آمریکا) قبل از شروع کار سوبسترا و بافر با یکدیگر در تاریکی مخلوط شد و سپس در یخچال ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۵۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به نمونه‌ها در تاریکی اضافه و مخلوط شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای یک ساعت در تاریکی انکوبه شد تا آنزیم عمل نماید. محلول حاصل به داخل لوله ریخته شد و درون دستگاه لومینومتر قرار گرفت و عدد پایه دستگاه خوانده و ثبت شد. عدد حاصل میزان کاسپاز ۳/۷ بر حسب RLU (Relative Activity Unit) در میزان ثابت پروتئین بود. در برنامه اکسل میزان فعالیت کاسپاز ۳/۷ در هر میکروگرم پروتئین محاسبه و برای رسم نمودار استفاده شد [۱۷].

بررسی آماری

بررسی آماری به وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد. متغیرهای کمی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($Means \pm SD$) بیان شد. آزمون T مستقل (Independent T-Test) برای مقایسه میزان فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوین و طبیعی بودن فولیکول‌ها بین گروه انجمادی و غیر

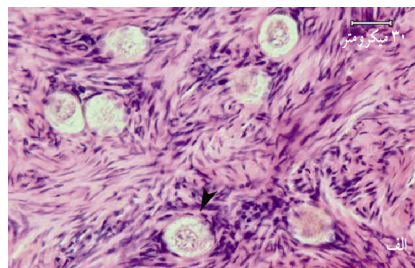
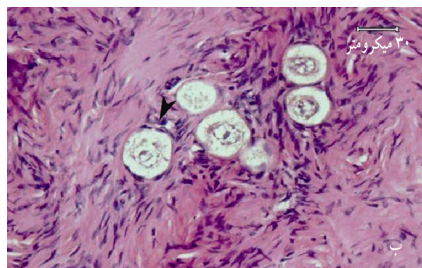
آپوپتوز و تخمدان انجماد شیشه‌ای شده

فولیکول‌های بدوی و اولیه به خوبی حفظ شده بود و نشانه دژنره شدن در فولیکول‌ها مشاهده نشد (شکل ۲). میزان فولیکول‌های با ریخت‌شناسی سالم در دو گروه انجمادی و غیر انجمادی به ترتیب $(93/75 \pm 5/121)$ و $(91/07 \pm 4/802)$ بود و تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه وجود نداشت.

انجمادی استفاده شد. $P \leq 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

ریخت‌شناسی بافت تخمدانی در گروه انجمادی به ویژه در



شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ نوری بافت تخمدان انسانی رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین که ریخت‌شناسی طبیعی فولیکول‌های تخمدانی را در گروه غیر انجمادی (الف) و انجمادی (ب) نشان می‌دهد. نوک پیکان فولیکول‌ها را در بافت تخمدانی نشان می‌دهد.

از رنگ‌آمیزی تانل انجام شد. سلول تانل مثبت در هیچ‌کدام از فولیکول‌های تخمدانی در دو گروه مورد مطالعه مشاهده نشد؛ اما تعدادی سلول آپوپتوتیک (تانل مثبت) در استرومای بافت تخمدان مشاهده شد (شکل ۴). در نمونه‌های کنترل منفی هیچ سلول تانل مثبتی مشاهده نشد. همچنین در نمونه کنترل مثبت نشانه‌های آپوپتوزی به وضوح قابل مشاهده بود.

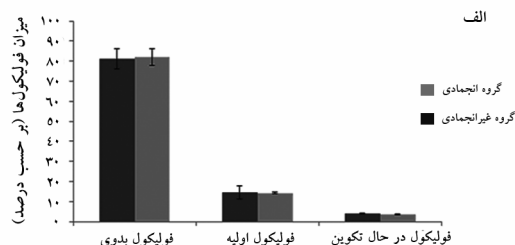
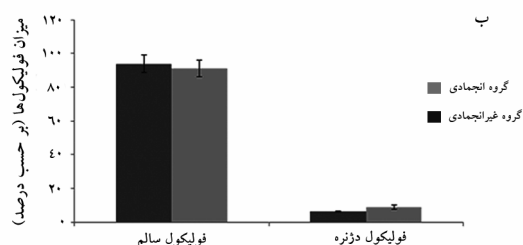
در دو گروه کنترل (غیر انجمادی) و انجمادی از بین فولیکول‌های طبیعی، میزان فولیکول‌های بدوی به ترتیب $(81/25 \pm 3/46)$ و $(82/14 \pm 4/064)$ ، فولیکول‌های اولیه $(14/58 \pm 3/293)$ و $(14/29 \pm 0/4806)$ و فولیکول‌های در حال رشد نیز $(17 \pm 0/1795)$ و $(3/57 \pm 0/1128)$ بود. از این نظر بین دو گروه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳). نشانه‌ای از تراکم هسته یا تخریب سلولی مشاهده نشد. تعدادی سلول‌های تیره در استروما و حاشیه قشر تخمدان مشاهده شد.

بررسی قطعه قطعه شدن DNA

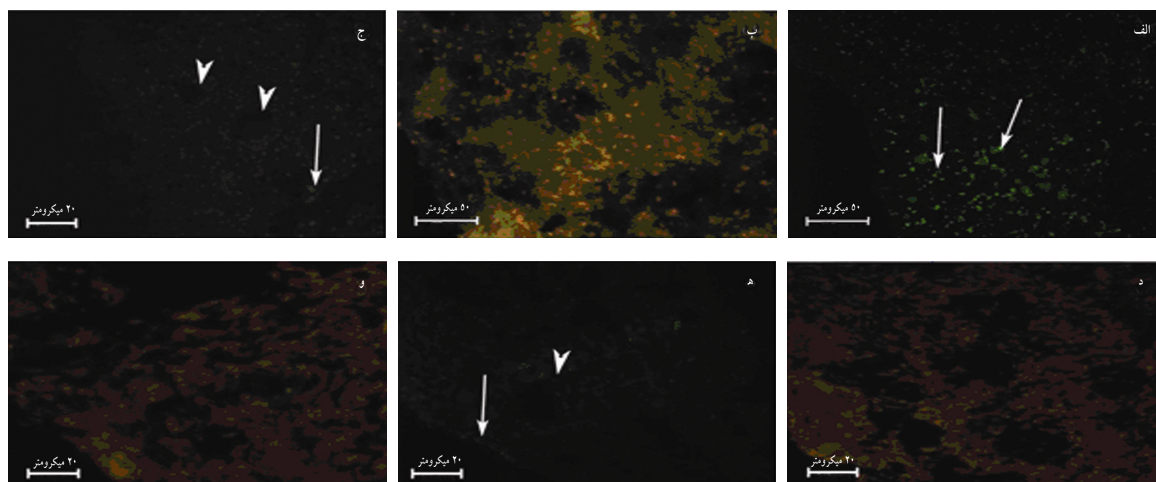
در ژل الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از قطعات بافت تخمدان گروه‌های انجمادی و غیر انجمادی، طرح نردبانی مشاهده نشد؛ در حالی که طرح نردبانی در تیموس موش تزریق شده با دگزامتازون مشاهده شد (شکل ۵ الف).

بررسی میزان وقوع آپوپتوز با روش تانل

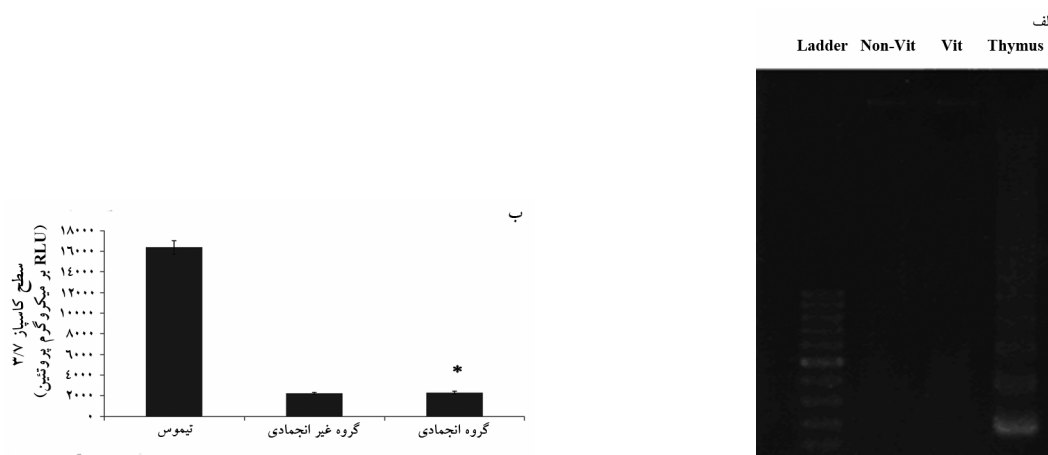
ارزیابی میزان آپوپتوز در فولیکول‌ها و سلول‌های استرومایی در بافت تخمدان غیر انجمادی و انجمادی با استفاده



شکل ۳ مقایسه میزان فولیکول‌ها در گروه‌های غیر انجمادی و انجمادی در مراحل مختلف تکوین (الف) و میزان طبیعی بودن فولیکول‌ها (ب)



شکل ۴ رنگ آمیزی تانل در تیموس القای آپوپتوز شده (الف و ب)، بافت تخمدان غیر انجمادی (ج و د)، بافت تخمدان انجمادی (ه و). در ردیف دوم رنگ آمیزی افتراقی با پروپیدایوم یدید همان گروه ها نشان داده شده است. نوک پیکان فولیکول های تخمدانی را نشان می دهد. پیکان سلول های آپوپتوز مثبت را نشان می دهد.



شکل ۵ (الف) ارزیابی آپوپتوز به وسیله الکتروفورز DNA بافت تخمدان غیر انجمادی (Non-vit) و انجمادی (Vit)؛ طرح نردبانی DNA نشان دهنده آپوپتوز است که در بافت تیموس القای آپوپتوز شده (Thymus) دیده می شود. Ladder: نشانگر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز، (ب) نمودار ارزیابی سطح کاسپاز ۳/۷ در بافت تخمدان غیر انجمادی و انجمادی، بافت تیموس القای آپوپتوز شده به عنوان گروه کنترل انتخاب شده است.

بحث

ارزیابی فعالیت کاسپاز ۳/۷

این مطالعه برای ارزیابی اثر انجماد شیشه ای بر میزان وقوع آپوپتوز در بافت تخمدان انسانی طراحی شده است. آپوپتوز یک فرآیند طبیعی است که در اثر آن مرگ سلول به خاطر فعال شدن اندونوکلازهای درونزا و قطعه قطعه شدن DNA به قطعاتی با وزن مولکولی کم صورت می گیرد [۱۱] و احتمال دارد طی فرآیند انجماد و ذوب رخ دهد.

فعالیت کاسپاز ۳/۷ در نمونه های تخمدان انسانی بعد از ذوب (۲۲۹۴±۱۶۹/۱۹ RLU/میلی گرم پروتئین) تفاوت معنی داری با گروه غیر انجمادی (۲۳۳۱±۸۹/۲۷۱ RLU/میلی گرم پروتئین) نداشت؛ اما در تیموس القای آپوپتوز شده موش به عنوان گروه کنترل مثبت، سطح کاسپاز ۳/۷ $16370 \pm 658/493$ RLU/میلی گرم پروتئین بود (شکل ۵ ب).

[۲۸]. همچنین نتایج ایساچنکو (Isachenko) و همکارانش نشان داد که انجماد شیشه‌ای کارآیی کمتری نسبت به انجماد آهسته بافت تخمدان انسان دارد [۲۹]. به دست آمدن این نتایج مختلف صرفاً به علت فرآیند انجماد شیشه‌ای تخمدان نیست، بلکه ناشی از تفاوت در روش انجماد، ترکیب و غلظت ضد یخ مورد استفاده، سرعت سرد و گرم شدن نمونه است. همچنین نوع نمونه و نیز سن بیمار در موارد انسانی از دیگر عوامل تأثیرگذار در نتیجه انجماد است [۱۴، ۲۷].

در مطالعه حاضر برای بررسی آپوتوز از روش‌های تانل، طرح نردبانی DNA، کاسپاز ۳/۷، استفاده شد. رنگ‌آمیزی تانل نشان داد که با وجود مشاهده نشدن نشانه تانل مثبت در فولیکول‌ها و حضور تعدادی نشانه تانل مثبت در بافت استرومای هر دو گروه تفاوت مشخصی در نشانه‌های آپوتوزی بین دو گروه غیر انجمادی و انجمادی وجود نداشته است. به نظر می‌رسد که انجماد شیشه‌ای تغییری در وقوع آپوتوز در بافت تخمدان انجمادی نسبت به بافت غیر انجمادی نکرده است. به طور مشابه گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد نشانه‌های آپوتوزی کمتری در بافت تخمدان انجماد شیشه‌ای شده دیده شده است [۱۲، ۱۳]. اما برعکس در همین ارتباط ژو (Zhou) و همکارانش در ارزیابی با تانل مشاهده کردند که میزان سلول‌های آپوتوتیک در بافت تخمدان انجماد شیشه‌ای شده به طور قابل توجهی بالاتر از بافت منجمد نشده است [۱۱]. گرچه حضور تعدادی سلول تانل مثبت در استروما که قبلاً نیز گزارش شده می‌تواند مربوط به لکوسیت‌های مهاجر از خون، سلول‌های اندوتلیال عروقی، سلول‌های بافت همبند، میوسیت‌های عروقی و جسم سفید بافت تخمدان باشد [۱۴، ۳۰].

در بررسی طرح نردبانی DNA، الگوی نردبانی در بافت تخمدان انجمادی مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که انجماد احتمالاً باعث قطعه قطعه شدن DNA نمی‌شود. چنانچه بافت دچار آپوتوز شده باشد کروماتین به قطعات متعددی شکسته می‌شود که در ژل الکتروفورز طرح نردبانی را نشان می‌دهد. البته در گزارش قبلی نیز مشاهدات مشابهی ارائه شده

بررسی‌های ریخت‌شناسی در پژوهش حاضر شواهدی از مرگ و تخریب سلولی در تخمک، سلول‌های فولیکولی و استرومای بافت تخمدان از قبیل متراکم شدن هسته و جدا شدن سلول‌های فولیکولی از یکدیگر را نشان نداد و طی فرآیند انجماد و ذوب یکپارچگی فولیکول حفظ شده بود. این مشاهدات نشان می‌دهد که انجماد شیشه‌ای باعث القای آپوتوز در بافت تخمدان نمی‌شود. بررسی‌های زیادی در زمینه ارزیابی آپوتوز پس از انجماد شیشه‌ای بافت تخمدانی گونه‌های مختلف پستانداران صورت گرفته است که نتایج متفاوتی گزارش کرده‌اند [۱۸-۲۲].

برخی مطالعات مشابه مطالعه حاضر در مورد انجماد بافت تخمدان انسان نشان داده که ریخت‌شناسی فولیکول‌های بدوی و اولیه و وقوع آپوتوز در بافت تخمدان طی انجماد شیشه‌ای و آهسته تفاوتی نداشته است [۲۳، ۲۴]. صالح‌نیا و همکارانش نیز مشاهده کردند که تفاوتی در میزان بروز آپوتوز پس از انجماد بافت تخمدان انسانی با دو روش شیشه‌ای و فوق سریع وجود ندارد [۱۴].

در برخی بررسی‌ها گزارش شده است که روش انجماد شیشه‌ای روش مؤثری برای انجماد بافت تخمدان است زیرا بیشترین تعداد فولیکول‌های سالم (۸۰ درصد) بعد از ذوب گزارش شده است [۲۵].

کروس (Keros) و همکارانش نیز نشان دادند که یکپارچگی ریخت‌شناسی به ویژه در استروما بعد از انجماد شیشه‌ای بهتر از انجماد آهسته حفظ می‌شود [۲۶]. همچنین شیخی (Sheikhi) و همکارانش تفاوتی در ریخت‌شناسی و فراساختار اووسیت‌ها در بافت تخمدان انسانی انجماد شیشه‌ای شده و غیر انجمادی مشاهده نکردند [۲۷]. در مطالعه دیگری ژو (Zhou) و همکاران گزارش کردند که درصد فولیکول‌های طبیعی و زنده در انجماد شیشه‌ای به طور قابل توجهی بالاتر از روش انجماد آهسته است [۱۱]. اما برعکس گاندولفی (Gandolfi) و همکارانش مشاهده کردند که انجماد شیشه‌ای باعث آسیب‌های وسیعی در بافت تخمدان انسانی می‌شود

است [۱۴]. اما مشاهده نشدن طرح نردبانی نمی‌تواند نبودن آپوپتوز را به طور قطعی تأیید کند چرا که در این روش محدودیتی از نظر مقدار آپوپتوز وجود دارد و چنانچه میزان وقوع آپوپتوز کم باشد طرح نردبانی واضحی نخواهد داشت. در مجموع با توجه به محدودیت‌های این روش‌ها لازم بود تا بررسی‌ها با دقت بیشتری با به کارگیری یک روش حساس‌تر بیوشیمیایی انجام شود. به این منظور از ارزیابی میزان فعالیت کاسپاز ۳/۷ به عنوان روشی تکمیلی استفاده شد. کاسپاز ۳ و ۷ پروتئازهای سیستمی (اسید آسپارتیک) داخل سلولی است که قادر است پروتئین‌ها را بعد از بیان‌های آسپارتیک اسید برش دهد و در فاز اجرایی مرگ سلولی نقش مهمی دارد و در مراحل آخر فعال شده و باعث قطعه قطعه شدن DNA می‌شود. کاسپاز ۳ و ۷ در بعضی مطالعات به روش ایمونوهیستوشیمی [۳۱] ارزیابی شده است. این روش نیز محدودیت‌های مطرح شده قبلی از جمله کیفی بودن روش ارزیابی را دارد. بنابراین سعی شد مدرکی مستندتر بر وقوع قطعه قطعه شدن DNA که توسط ارزیابی تانل و طرح نردبانی DNA عدم وقوع آن تأیید شده بود، ارایه شود. بررسی بیوشیمیایی میزان کاسپاز ۳/۷ برای اولین بار در بافت تخمدان انسانی انجام شد که میزان آن بین دو گروه انجمادی و غیر انجمادی تفاوت معنی‌دار نداشت.

در مطالعه گذشته محققان حاضر نیز بیان چندین ژن پروآپوپتوزی و آنتی آپوپتوزی (Fas, Bax, Bcl-2, p53, FasL, BIRC5, caspase3, caspase8) که در بافت تخمدان انسانی نقش به‌سزایی در ایجاد آپوپتوز دارد، بعد از انجماد شیشه‌ای و ذوب بررسی شد. نتایج نشان داد که تفاوت اندکی در بیان ژن‌های آپوپتوزی در گروه انجمادی نسبت به گروه غیر انجمادی وجود داشته است [۱۵]. از مجموع ارزیابی‌های مولکولی در مطالعه قبل و همچنین ارزیابی‌های تکمیلی در پژوهش حاضر نتیجه گرفته می‌شود که انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان با استفاده از EFS ۴۰ درصد اثری در القای آپوپتوز در این مرحله نداشته است؛ گرچه برای اثبات آثار انجماد بر بافت نیاز به مطالعات بیشتر و گذشت زمان است تا بتوان آثار دراز مدت بعدی را بر وقوع آپوپتوز بررسی کرد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از رساله دکترای تخصصی رشته علوم تشریحی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه و نیز صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری انجام شده است.

منابع

- [1] Deanesly R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. J Endocrinol 1954; 11(2): 197-200.
- [2] Zhang J, Liu J, Xu KP, Liu B, DiMattina M. Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova. J Assist Reprod Genet 1995; 12(6): 361-8.
- [3] Kelly SM, Buckett WM, Abdul-Jalil AK, Tan SL. The cryobiology of assisted reproduction. Minerva Ginecol 2003; 55(5): 389-98.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an

- alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011; 23(2): 160-86.
- [7] Amorim CA, Dolmans MM, David A, Jaeger J, Vanacker J, Camboni A, Donnez J, Van Langendonckt A. Vitrication and xenografting of human ovarian tissue. *Fertil Steril* 2012; 98(5): 1291-8.e1-2.
- [8] Isachenko E, Isachenko V, Nawroth F, Rahimi G, Kreienberg R, Reinsberg J, Weiss J. Human ovarian tissue preservation: is vitrication acceptable method for assisted reproduction? *Cryo Letters* 2008; 29(4): 301-14.
- [9] Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G. Vitrication Of Ovarian Tissue. In: Tucker Mj, Liebermann J (Editors). *Vitrication In Assisted Reproduction: A User's Manual And Trouble-Shooting Guide*. London: Informa Uk Ltd, 2007: 261-72.
- [10] Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* 1999; 213(1): 1-17.
- [11] Zhou XH, Wu YJ, Shi J, Xia YX, Zheng SS. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrication and conventional vitrication. *Cryobiology* 2010; 60(2): 101-5.
- [12] Chang HJ, Moon JH, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Optimal condition of vitrication method for cryopreservation of human ovarian cortical tissues. *J Obstet Gynaecol Res* 2011; 37(8): 1092-101.
- [13] Xiao Z, Wang Y, Li L, Luo S, Li SW. Needle immersed vitrication can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. *Fertil Steril* 2010; 94(6): 2323-8.
- [14] Salehnia M, Sheikhi M, Pourbeiranvand S, Lundqvist M. Apoptosis of human ovarian tissue is not increased by either vitrication or rapid cooling. *Reprod Biomed Online* 2012; 25(5): 492-9.
- [15] Abdollahi M, Salehnia M, Salehpour S, Ghorbanmehr N. Human ovarian tissue vitrication/warming has minor effect on the expression of apoptosis-related genes. *Iran Biomed J* 2013; 17(4): 179-86.
- [16] Salehnia M, Abbasian Moghadam E, Rezazadeh Velojerdi M. Ultrastructure of follicles after vitrication of mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 2002; 78(3): 644-5.
- [17] Carrasco RA, Stamm NB, Patel BK. One-step cellular caspase-3/7 assay. *Biotechniques* 2003; 34(5): 1064-7.
- [18] Fathi R, Valojerdi MR, Salehnia M. Effects of different cryoprotectant combinations on primordial follicle survivability and apoptosis incidence after vitrication of whole rat ovary. *Cryo Letters* 2013; 34(3): 228-38.
- [19] Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, Mowla SJ. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitricated-warmed mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 2008; 90(4 Suppl): 1480-6.
- [20] Mazoochi T, Salehnia M, Pourbeiranvand S, Forouzandeh M, Mowla SJ, Hajizadeh E. Analysis of apoptosis and expression of genes related to apoptosis in cultures of follicles derived from vitricated and non-vitricated ovaries. *Mol Hum Reprod* 2009; 15(3): 155-64.
- [21] Nyachio A, Spiessens C, Chai DC, Kiulia NM, Willemen D, Mwenda JM, Bourgain C,

- D'Hooghe TM. Ovarian tissue cryopreservation by vitrification in olive baboons (*Papio anubis*): a pilot study. *Gynecol Obstet Invest* 2013; 75(3): 157-62.
- [22] Liu J, Cheng KM, Silversides FG. Novel needle-in-straw vitrification can effectively preserve the follicle morphology, viability, and vascularization of ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Anim Reprod Sci* 2012; 134(3-4): 197-202.
- [23] Depalo R, Lorusso F, Bettocchi S, Selvaggi L, Cavallini A, Valentini AM, Caruso ML, Lippolis C. Assessment of estrogen receptors and apoptotic factors in cryopreserved human ovarian cortex. *Syst Biol Reprod Med* 2009; 55(5-6): 236-43.
- [24] Huang L, Mo Y, Wang W, Li Y, Zhang Q, Yang D. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 139(2): 193-8.
- [25] 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.
- [26] Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A, Hreinsson J, Hovatta O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009; 24(7): 1670-83.
- [27] Sheikhi M, Hultenby K, Niklasson B, Lundqvist M, Hovatta O. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Hum Reprod* 2011; 26(3): 594-603.
- [28] 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.
- [29] Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, Krivokharchenko A, Kreienberg R, Woriedh M, Bader M, Weiss JM. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction* 2009; 138(2): 319-27.
- [30] Brodowska A, Laszczyńska M, Starczewski A. Apoptosis in ovarian cells in postmenopausal women. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45(2): 99-105.
- [31] Rahimi G, Isachenko V, Todorov P, Tawadros S, Mallmann P, Nawaroth F, Isachenko E. Apoptosis in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *Cryo Letters* 2009; 30(4): 300-9.