

Sucrose Effect on Follicular Survival Rate and Apoptosis Incidence in Rat Ovarian Tissue after Vitrification

Rouhollah Fathi¹, Mojtaba Rezazadeh Valojerdi^{2,3*}, Mojdeh Salehnia²

1- Ph.D. Candidate, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Embryology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, 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

Received: 10/Dec/2012, Accepted: 02/Feb/2013

Abstract

Objective: the aim of this study was to evaluate the effect of sucrose on follicular survival rate and the incidence of apoptosis in rat ovarian tissue following vitrification.

Methods: Ovaries of approximately 5-week-old female Wistar rats were divided randomly into three groups: control (non-vitrified), V_I (Ethylene Glycol + Dimethyl Sulfoxide) and V_{II} (EG + DMSO + 0.25 mol/lit sucrose). Vitrified-warmed samples were incubated for approximately 30 minutes and fixed in Bouin's fixative. The samples were serially sectioned and stained either with H&E or immunohistochemistry kit of anti-active and a pro-caspase-3 kit.

Results: Data analysis showed that the rate of growing follicles that survived, with the exception of primordial follicles, was comparable between the vitrified-warmed and control samples. Morphologically healthy primordial follicles showed significant reductions in all vitrification groups compared to the control, however this rate was not significant between the vitrification groups. In comparison with healthy follicles, there were significantly more dead follicles in the vitrification groups than the control group. In addition the apoptotic follicles increased significantly after vitrification, with the exception of the antral follicles. Although the number of apoptotic follicles was similar between both vitrification groups, however there were significantly more pre-antral apoptotic follicles in the V_{II} group compared to the V_I and control groups.

Conclusion: According to these results, the presence or absence of sucrose has no significant effect on the preservation of primordial and primary follicles which are important for transplantation.

Keywords: Vitrification, Sucrose, Rat, Ovarian Tissue

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 4, Winter 2013, Pages: 49-61

اثر سوکروز بر میزان بقای فولیکول‌ها و وقوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده پس از انجماد شیشه‌ای بافت تخمدان موش صحرائی

روح‌الله فتحی^۱، مجتبی رضازاده ولوجردی^{۲،*}، مؤده صالح‌نیا^۳

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۲- استاد، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۳- استاد، گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه آناتومی
 Email: mr_valojerdi@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۱۱/۲۸

دریافت مقاله: ۹۱/۰۹/۲۰

چکیده

هدف: از این مطالعه بررسی اثر سوکروز بر میزان زنده ماندن فولیکول‌ها و شیوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در بافت تخمدان موش صحرائی پس از انجماد شیشه‌ای بود.

مواد و روش‌ها: تخمدان موش‌های صحرائی ۵ هفته‌ای پس از خارج شدن از بدن به سه گروه کنترل (غیرانجمادی)، انجمادی V_I (اتیلن گلیکول + دی متیل سولفوکساید) و V_{II} (اتیلن گلیکول + دی متیل سولفوکساید + ۰/۲۵ مول در لیتر سوکروز) تقسیم شد. پس از مرحله انجماد و ذوب، تخمدان‌ها حدود نیم ساعت انکوبه و بلافاصله در محلول بوئن تثبیت و سپس به صورت سریالی برش زده شد. به منظور بررسی ریخت‌شناسی بافت و نیز شمارش تعداد فولیکول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، قطعات به ترتیب رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین و ایمونوهیستوشیمی تیمار شده با آنتی‌بادی 3 anti-active & pro caspase انجام شد.

نتایج: مطالعات آماری نشان داد که میزان سالم ماندن فولیکول‌های در حال تکوین به استثنای فولیکول‌های بدوی بین گروه‌های انجمادی و کنترل یکسان است. فولیکول‌های بدوی سالم در گروه‌های انجمادی ضمن کاهش معنی‌دار در مقایسه با کنترل، تفاوت معنی‌داری را بین خود نشان ندادند. برخلاف فولیکول‌های سالم، فولیکول‌های مرده در همه مراحل مختلف تکوینی، افزایش معنی‌داری را در دو گروه انجمادی نسبت به کنترل نشان دادند. هر چند که این اختلاف بین گروه‌های انجمادی معنی‌دار نبود. در گروه‌های انجمادی، فولیکول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نیز در تمامی مراحل به غیر از آنترال افزایش معنی‌داری را نسبت به کنترل نشان دادند. بین دو گروه انجمادی نیز به غیر از مرحله فولیکولی پره‌آنترال (V_I: ۰/۰۳ ± ۱/۹۵ درصد و V_{II}: ۰/۰۲ ± ۴/۱۲ درصد، P < ۰/۰۳۷) میزان فولیکول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یکسان بود.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد که حضور سوکروز یا عدم حضور آن در فرآیند انجماد شیشه‌ای تخمدان موش صحرائی، به خصوص برای حفظ فولیکول‌های بدوی و اولیه که در فرآیند پیوند از اهمیت خاصی برخوردار است تفاوت چندانی را ایجاد نمی‌کند.

کلیدواژه‌ها: انجماد شیشه‌ای، سوکروز، موش صحرائی، بافت تخمدان

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات: ۴۹-۶۱

مقدمه

حفظ مواد زیستی با استفاده از کاهش دما به قرن‌ها پیش برمی‌گردد، زمانی که بشر برای ذخیره مواد غذایی خود از یخچال‌های طبیعی بهره می‌برده است. اما باید اشاره نمود که پرداختن به مسئله انجماد به صورت علمی از قرن هفدهم و با انتشار مقاله‌ای تحت عنوان «آزمایش و مشاهده‌ای جدید در تماس با سرما» توسط روبرت بویل (Robert Boyle) آغاز شد [۱].

در دهه‌های اخیر انجماد به دلیل کسب موفقیت‌های قابل توجه در حفظ سلول‌های جنسی، جنین و بافت‌های تناسلی نیز از اهمیت خاصی در تحقیقات و بالین برخوردار شده است [۲] به گونه‌ای که محققین سعی نموده‌اند ضمن ارایه روش‌های مختلف و آثار احتمالی آن‌ها برای بافت، روشی را اتخاذ نمایند که حداقل آسیب را برای بافت تولید مثلی به خصوص بافت تخمدان که منبع ذخایر سلول‌های جنسی ماده است، داشته باشد. بر این اساس در یک جمع‌بندی می‌توان گفت که دو روش کلی نظیر انجماد آهسته و شیشه‌ای برای ذخیره نمونه‌های زیستی به خصوص بافت تخمدانی وجود دارد. تفاوت در این دو روش را می‌توان به سرعت کاهش دما و چگونگی استفاده از مواد محافظت کننده در برابر سرما نسبت داد.

در این رابطه دو سؤال مهم وجود دارد: (۱) چه میزان از بافت را منجمد کنیم؟ (۲) از چه مواد ضدیخی برای انجماد کمک بگیریم؟ در پاسخ به سؤال اول باید گفت، از آنجایی که گامت‌های ماده در اکثر گونه‌های جانوری در ناحیه قشری تخمدان قرار دارند، بنابراین برای ذخیره‌سازی آن‌ها کافیست قشر تخمدان جداسازی و قطعات آن منجمد شود. این روش در جانوران بزرگ مانند انسان [۳]، گاو [۴] و گوسفند [۵] لازم و ضروری است. اگر چه گزارش‌هایی در خصوص انجماد کل بافت تخمدان مشاهده می‌شود [۶]، اما به دلیل بزرگ بودن کل بافت تخمدان، متراکم بودن آن و نیز دارا بودن یک قسمت مرکزی بزرگ و سخت، انجماد کل تخمدان

اثر سوکروز بر انجماد شیشه‌ای تخمدان موش صحرایی

مفید نیست. در خصوص سؤال دوم نیز باید اشاره نمود که ضدیخ‌ها در گونه‌های مختلف آثار متفاوتی دارد. ممکن است یک ضدیخ در گونه‌ای اثر سمی داشته و در گونه‌ای دیگر غیر سمی باشد [۷-۹].

از سوی دیگر؛ باید اذعان نمود که از زمان کشف اثر ضدیخ‌ها در فرآیند انجماد و حفظ بافت و نمونه‌های زیستی، تاکنون ضدیخ‌های متفاوتی ارزیابی شده‌اند [۱۰]. از آن میان ضدیخ‌هایی چون گلیسرول و استامید در سال‌های ابتدایی کاربرد بیشتری داشته ولی به دنبال کشف اثر سرطان‌زایی آن‌ها [۷، ۱۱]، امروزه کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند و برعکس، ضدیخ‌هایی چون اتیلن گلیکول (Ethylene Glycol: EG)، پروپاندیول (Propanediol: PROH) و دی متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) که جزء ضدیخ‌های نفوذ کننده محسوب می‌شوند، امروزه کاربرد بیشتری در بالین داشته و استفاده از آن‌ها برای انجماد بافت همچنان رو به گسترش است [۱۲]. اتیلن گلیکول به دلیل داشتن جرم مولکولی پایین و نیز اثر سمی کمتر نسبت به سایر ضدیخ‌ها، محبوبیت بیشتری یافته است. جرم مولکولی پایین آن موجب افزایش سرعت نفوذ شده و در موفقیت انجماد دخیل است [۷]. DMSO نیز در تحقیقات و بالین کاربرد فراوانی دارد و گزارش‌ها در زمینه استفاده مفید از این ضدیخ زیاد است [۱۳]. در هر صورت باید اضافه نمود که برای کاهش سمیت ضدیخ‌ها گاهی نیاز است که از ترکیب یک یا چند ضدیخ استفاده نمود [۵، ۱۳، ۱۴]. گروهی از ضدیخ‌ها برخلاف EG و DMSO به داخل سلول نفوذ نمی‌کنند و بیشتر به افزایش سرعت نفوذ ضدیخ‌های نفوذ کننده کمک کرده و از سمیت آن‌ها می‌کاهند. از جمله این مواد می‌توان به دی ساکاریدهایی مانند سوکروز یا ماکرومولکول‌هایی مانند فایکول اشاره نمود [۱۵]. موفقیت استفاده از سوکروز در بسیاری از گزارش‌های انجماد بافت تخمدان گونه‌های مختلف [۱۶] آمده است، اما برخی مطالعات نیز نشان می‌دهد که عدم استفاده از آن به خصوص در موش و انسان چندان مؤثر نخواهد بود [۱۷-۱۸] و استفاده از آن

همواره می‌تواند بیانگر این نکته باشد که برای انجماد بافت تخمدان یک گونه قبل از هر چیز نقش سوکروز در انجماد باید مورد بررسی قرار گیرد. بنابراین در مطالعه حاضر اثر ترکیب ضدیخ‌های EG و DMSO با سوکروز یا بدون آن بر میزان زنده ماندن فولیکول‌ها و شیوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) در کل بافت تخمدان موش صحرایی ۵ هفته‌ای بررسی شد.

۳ گروه تقسیم‌بندی شدند: دو تخمدان به عنوان گروه کنترل یا غیرانجمادی در نظر گرفته شد و بلافاصله در محلول تثبیت کننده بوئن (Bouin's) تثبیت شدند. چهار تخمدان دیگر نیز به صورت تصادفی در دو گروه انجمادی V_I (شامل دو ضد یخ EG و DMSO) و V_{II} (شامل EG، DMSO و ۰/۲۵ مول در لیتر سوکروز) قرار گرفتند و هر آزمایش برای هر دو گروه انجمادی که شرح آن در ادامه می‌آید، ۵ بار تکرار شد.

مواد و روش‌ها

تهیه تخمدان موش صحرایی و طراحی آزمایش

در هر بار آزمایش، ابتدا تخمدان‌ها از بدن ۳ سر موش صحرایی ۵ هفته‌ای بالغ با وزن ۷۰ تا ۸۰ گرم خارج و در محیط کشت ۱۹۹ حاوی HEPES (modified HEPES tissue culture medium 199: HTCM (Sigma، آلمان) و ۱۰ درصد آلبومین سرم انسانی (Human Serum Albumin: HSA) قرار داده شدند. سپس تخمدان‌ها به صورت تصادفی به

مراحل انجماد شیشه‌ای

برای هر یک از گروه‌های آزمایشی V_I و V_{II}، آب‌گیری به ترتیب به وسیله دو محلول انجمادی ۱ و ۲ و هر یک به مدت ۵ دقیقه انجام شد. ترکیب HTCM و ۱۰ درصد HSA به عنوان محلول پایه انجمادی و میزان ترکیبات EG، DMSO و سوکروز طبق جدول ۱ در نظر گرفته شد. پس از آب‌گیری مراحل برداشت بافت تخمدان به وسیله نوک سوزن و شناور ساختن آن در نیتروژن مایع نیز به مانند آنچه که در مورد بافت تخمدان گوسفند آمده است، انجام پذیرفت [۵].

جدول ۱ ترکیب و غلظت ضد یخ‌ها در گروه‌های مختلف انجمادی

گروه	محلول انجمادی ۱	محلول انجمادی ۲
V _I	۷/۵ درصد EG+DMSO ۷/۵ درصد	۱۵ درصد EG+DMSO ۱۵ درصد
V _{II}	۷/۵ درصد EG+DMSO ۷/۵ درصد	۱۵ درصد EG+DMSO ۰/۲۵ مول بر لیتر سوکروز

ذوب

ذوب در ۴ مرحله و هر مرحله به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در ابتدا تخمدان‌های هر گروه آزمایشی از نیتروژن مایع خارج و بلافاصله در محلول ذوب اول (W1: HTCM + ۱ مول در لیتر سوکروز) غوطه‌ور شدند. سپس در محلول ذوب دوم (W2: HTCM + ۰/۵ مول در لیتر سوکروز) و به همین ترتیب در محلول ذوب سوم (W3: HTCM + ۰/۲۵ مول در لیتر سوکروز) و چهارم (W4: HTCM + ۰/۱۲۵ مول در لیتر سوکروز) قرار گرفتند. تمامی مراحل ذوب در دمای اتاق انجام شد به غیر از مرحله اول که در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد

صورت گرفت. در انتها تخمدان‌های ذوب شده به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد کشت داده شدند [۴، ۷] و سپس مانند گروه کنترل در محلول بوئن برای ارزیابی‌های بعدی تثبیت شدند.

ارزیابی‌های ریخت‌شناختی (Morphologic) و

ایمونوهیستوشیمی

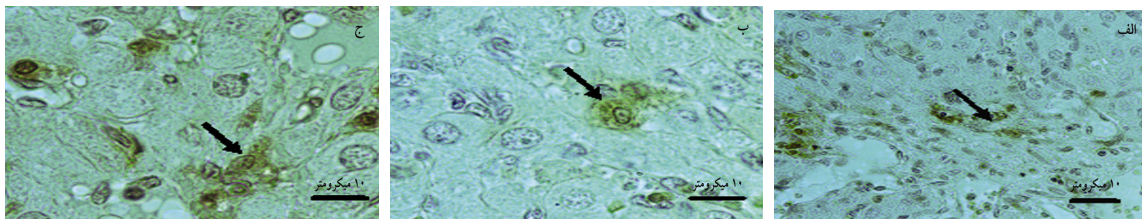
تخمدان‌های تثبیت شده، تحت فرآیند آب‌گیری قرار گرفته و پس از قالب‌گیری در محلول پارافینی، به صورت سریالی و با ضخامت ۶ میکرومتر برش داده شدند و با روش هماتوکسیلین

اثر سوکروز بر انجماد شیشه‌ای تخمدان موش صحرایی

جانداري که آنتی‌بادی در بدن او ساخته شده) به وسیله سرم بز ۱۰ درصد حذف شد (۱ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد). در این مرحله قطعات بافتی ابتدا با آنتی‌بادی اولیه (۲ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و سپس آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱:۵۰۰ (۱ ساعت، ۳۷ درجه سانتی‌گراد) تیمار شد. پس از این مرحله، برای دیده شدن آنتی‌بادی ثانویه با نور مرئی (نوری‌سازی واکنش)، قطعات بافتی ابتدا با آنزیم پراکسیداز (Horseradish Peroxidase: HRP) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و سپس با محلول حاوی کروموژن (Diaminobenzidine: DAB) به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه و در دمای اتاق تیمار شد. باید توجه کرد که مدت تیمار با DAB تا زمان رنگ‌پذیری ادامه یابد. در نهایت قطعات بافتی تحت فرآیند آب‌گیری قرار گرفته و پس از پوشاندن سطح لام با لامل با میکروسکوپ نوری قابل مشاهده خواهد بود. اگر شمارش تعداد کل سلول‌های بافت مهم است، می‌توان قبل از آب‌گیری، قطعات بافتی را با رنگ متمایز دیگری مانند هماتوکسیلین رنگ کرد. بهتر است رنگ دوم جایگاه اتصال متفاوتی با عامل مورد بررسی که به آنتی‌بادی اول متصل می‌شود، داشته باشد. به طور مثال در این پژوهش عامل مورد بررسی کاسپاز ۳ (Caspase 3) بوده که جایگاه بیان آن در سیتوپلاسم است، بنابراین برای رنگ‌آمیزی دوم از هماتوکسیلین استفاده شد که غیرسیتوپلاسمی است و هسته را رنگ می‌کند.

و اتوزین (Hematoxylin and Eosin) رنگ‌آمیزی شدند. قطعات بافتی رنگ‌آمیزی شده به وسیله میکروسکوپ نوری ارزیابی و تعداد فولیکول‌های سالم و مرده براساس مطالعه گوگئون (Gougeon) شمارش شدند [۱۹]. اتوزینوفیلیک شدن شدید سیتوپلاسم تخمک، جمع شدن و تراکم بیش از حد کروماتین، چروکیدگی غشای هسته و زونا پلوسیدا (Zona Pellucida) و فاصله گرفتن بیش از حد سلول‌های گرانولوزا (Granulosa Cells) از یکدیگر و تخمک نشانه‌هایی از آترزی شدن (Atresia) فولیکول به شمار می‌روند.

آزمایش ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی rabbit anti-pro and active caspase 3 و نیز روش آویدین-بیوتین-ایمونوپراکسیداز (avidin-biotin-immunoperoxidase) (Vector Labs، کانادا) صورت گرفت. قبل از انکوبه شدن با آنتی‌بادی اولیه (با رقت ۱ به ۵۰۰)، قطعات بافت با پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۳ درصد برای مهار پراکسیدازهای داخلی به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد و سپس تحت احیای آنتی‌ژن با روش آنزیمی (تریپسین $+CaCl_2/2H_2O$) به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس بافت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق تحت تیمار با محلول تریتون $X100$ (Triton X100) برای نفوذپذیر شدن قرار گرفت. به منظور جلوگیری از اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی اولیه، آنتی‌ژن‌های مشترک بین دو گونه جانوری (جانداري که آنتی‌بادی علیه او و



شکل ۱ مقطع عرضی تخمدان‌های موش صحرایی تیمار شده با آنتی‌بادی anti-pro & active caspase 3 (الف) کنترل (غیر انجمادی)، (ب) انجماد V_1 ، (ج) انجماد V_{II} ، فلش: سلول‌های جسم زرد دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Caspase Positive)

کاسپاز ۳ مثبت بودند، به عنوان فولیکول دچار مرگ برنامه‌ریزی شده در نظر گرفته شدند (شکل ۱).

در این آزمایش فولیکول‌هایی که تخمک یا بیش از ۵۰ درصد سلول‌های کومولوسی (Cumulus Cells) آن‌ها در رنگ‌آمیزی

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمامی داده‌ها با آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) طبیعی و تعداد فولیکول‌های سالم، مرده و دچار مرگ برنامه‌ریزی شده بین گروه‌های انجمادی و کنترل با استفاده از آزمون t-test مقایسه شد. برای این منظور نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. داده‌ها نیز به همراه میانگین خطای استاندارد (Standard Error Mean: SEM) و اختلاف زیر عدد ۰/۰۵ ($P < 0/05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

به طور کلی در این مطالعه اثر حضور یا عدم حضور سوکروز در محلول انجمادی بافت تخمدان بر ریخت‌شناسی

فولیکول‌ها و میزان وقوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ارزیابی شد. در نهایت تجزیه و تحلیل آماری تمامی داده‌ها بین گروه‌های کنترل و آزمایشی انجام شد.

تعداد فولیکول‌های سالم و مرده

تعداد فولیکول‌های بدوی سالم بین گروه کنترل ($0/03 \pm$) ۳۶/۵۳ درصد) و هر دو گروه انجمادی V_I و V_{II} (به ترتیب ۰/۰۲ \pm ۱۴/۳۷ درصد و ۰/۰۳ \pm ۱۹/۰۴ درصد) تفاوت معنی‌دار نشان داد ($P < 0/004$). تفاوت در تعداد فولیکول‌های بدوی مرده نیز بین گروه کنترل ($0/00 \pm$ ۲/۹۱ درصد) و هر دو گروه انجمادی V_I و V_{II} (به ترتیب ۰/۰۲ \pm ۹/۳۶ درصد و ۰/۰۱ \pm ۷/۴۶ درصد) معنی‌دار بود ($P < 0/047$) (جدول ۲). تعداد فولیکول‌های بدوی سالم و مرده بین گروه‌های انجمادی V_I و V_{II} یکسان بوده و تفاوت آماری محسوسی را نشان ندادند.

جدول ۲ فولیکول‌های سالم و مرده در گروه‌های کنترل، انجمادی

گروه	بدوی		اولیه		پره‌آنترال		آنترال	
	مرده	سالم	مرده	سالم	مرده	سالم	مرده	سالم
کنترل	۲/۹۱ \pm ۰/۰۰*	۳۶/۵۳ \pm ۰/۰۳*	۳/۲۶ \pm ۰/۰۰۶*	۲۴/۲۰ \pm ۰/۰۳	۱/۴۹ \pm ۰/۰۰*	۹/۰۱ \pm ۰/۰۰	۲/۷۰ \pm ۰/۰۰*	۱۹/۸۶ \pm ۰/۰۲
V_I	۹/۳۶ \pm ۰/۰۲	۱۴/۳۷ \pm ۰/۰۲**	۱۸/۰۶ \pm ۰/۰۳**	۲۱/۸۳ \pm ۰/۰۲	۵/۷۹ \pm ۰/۰۰**	۷/۰۵ \pm ۰/۰۱	۶/۴۰ \pm ۰/۰۰**	۱۷/۱۰ \pm ۰/۰۲
V_{II}	۷/۴۶ \pm ۰/۰۱**	۱۹/۰۴ \pm ۰/۰۳**	۱۴/۱۵ \pm ۰/۰۳**	۲۱/۲۶ \pm ۰/۰۱	۵/۸۶ \pm ۰/۰۰**	۸/۹۲ \pm ۰/۰۱	۶/۲۵ \pm ۰/۰۱**	۱۷/۰۲ \pm ۰/۰۲

داده‌ها به صورت میانگین درصد \pm SEM ارائه شده‌است. گروه کنترل: تخمدان‌های غیر انجمادی، V_I : DMSO + EG، V_{II} : DMSO + EG + ۰/۲۵ مول در لیتر سوکروز. در هر ستون داده‌های دارای * با ** معنی‌دار است.

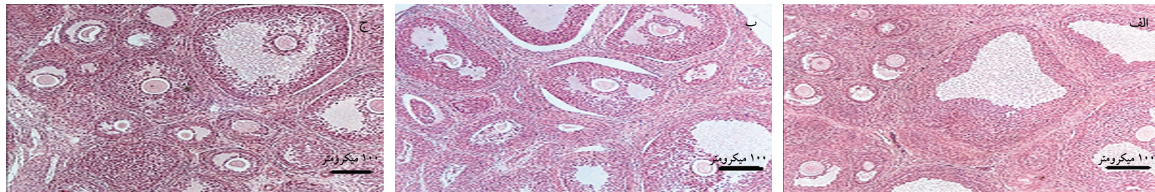
انجمادی تفاوت آماری آشکاری را نشان نداد (جدول ۲). تفاوت در تعداد فولیکول‌های پره‌آنترال (Pre-antral) سالم نیز بین خود گروه‌های انجمادی (V_I : ۷/۰۵ \pm ۰/۰۱ درصد و V_{II} : ۸/۹۲ \pm ۰/۰۱ درصد) و همچنین گروه کنترل (۹/۰۱ \pm ۰/۰۰ درصد) معنی‌دار نبود اما فولیکول‌های پره‌آنترال مرده در هر دو گروه انجمادی V_I (۵/۷۹ \pm ۰/۰۰ درصد) و V_{II} (۵/۸۶ \pm ۰/۰۰ درصد) با وجود یکسان بودن، نسبت به گروه کنترل (۱/۴۹ \pm ۰/۰۰ درصد) افزایش معنی‌داری نشان دادند ($P < 0/022$) (جدول ۲).

تعداد فولیکول‌های اولیه سالم در گروه‌های انجمادی V_I (۲۱/۸۳ \pm ۰/۰۲ درصد) و V_{II} (۲۱/۲۶ \pm ۰/۰۱ درصد) با گروه کنترل (۲۴/۲۰ \pm ۰/۰۳ درصد) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. اما افزایش در تعداد فولیکول‌های اولیه مرده در هر دو گروه انجمادی V_I و V_{II} (به ترتیب ۱۸/۰۶ \pm ۰/۰۳ درصد و ۱۴/۱۵ \pm ۰/۰۳ درصد) نسبت به گروه کنترل (۳/۲۶ \pm ۰/۰۰۶ درصد) معنی‌دار بود ($P < 0/015$). تعداد فولیکول‌های اولیه سالم و مرده نیز به مانند فولیکول‌های بدوی بین دو گروه

اثر سوکروز بر انجماد شیشه‌ای تخمدان موش صحرایی

یکسان بودن در هر دو گروه انجمادی V_I ($6/40 \pm 0/00$ درصد) و V_{II} ($6/25 \pm 0/01$ درصد)، مانند سایر انواع فولیکول‌ها نسبت به گروه کنترل ($2/70 \pm 0/00$ درصد) افزایش معنی‌داری نشان دادند ($P < 0/017$) (جدول ۲) (شکل ۲).

فولیکول‌های آنترال سالم در بین گروه‌های انجمادی (V_I): $17/10 \pm 0/02$ درصد و V_{II} : $17/02 \pm 0/02$ درصد) و گروه کنترل ($19/86 \pm 0/02$ درصد) افزایش یا کاهش معنی‌دار نشان ندادند. در حالی‌که فولیکول‌های آنترال (Antral) مرده علی‌رغم



شکل ۲ مقطع عرضی تخمدان‌های موش صحرایی رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و اتوزین: (الف) کنترل (غیر انجمادی)، (ب) انجمای V_I ، (ج) انجمادی V_{II}

جدول ۳ فولیکول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در گروه‌های کنترل و انجمادی

گروه	بدوی	اولیه	پره‌آنترال	آنترال
کنترل	$0/8 \pm 0/02$	$1/28 \pm 0/01^{**}$	$2/92 \pm 0/03^*$	$2/13 \pm 0/09^*$
V_I	$1/15 \pm 0/03$	$1/95 \pm 0/03^{**}$	$12/75 \pm 0/05^{**}$	$6/50 \pm 0/02^{**}$
V_{II}	$1/55 \pm 0/02$	$4/12 \pm 0/02^*$	$11/23 \pm 0/06^{**}$	$4/87 \pm 0/02^{**}$

داده‌ها به صورت میانگین درصد \pm SEM ارائه شده است. گروه کنترل: تخمدان‌های غیر انجمادی، V_I : DMSO+EG، V_{II} : DMSO+EG + ۰/۲۵ مول در لیتر سوکروز. در هر ستون داده‌های دارای * با ** معنی‌دار است.

در فولیکول‌های پره‌آنترال پس از انجماد، میزان بروز مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در گروه V_{II} ($4/12 \pm 0/02$ درصد) افزایش معنی‌داری نسبت به دو گروه کنترل ($1/28 \pm 0/01$ درصد) و V_I ($1/95 \pm 0/03$ درصد) داشت ($P < 0/037$) و در نهایت در فولیکول‌های آنترال اگر چه وقوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در دو گروه انجمادی V_I و V_{II} (به ترتیب: $1/15 \pm 0/03$ درصد و $1/55 \pm 0/02$ درصد) نسبت به گروه کنترل ($0/8 \pm 0/02$ درصد) افزایش داشت اما این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۳) (شکل ۲).

میزان شیوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده

بررسی میزان بیان پروتئین کاسپاز ۳ به روش ایمونوهیستوشیمی در گروه‌های انجمادی (V_I و V_{II}) نشان داد که تعداد فولیکول‌های دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در مراحل مختلف به غیر از فولیکول‌های آنترال نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار می‌یابد.

میزان وقوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در فولیکول‌های بدوی در گروه کنترل ($2/13 \pm 0/09$ درصد) به طور معنی‌داری کمتر از دو گروه انجمادی بود (V_I : $6/50 \pm 0/02$ و V_{II} : $4/87 \pm 0/02$ درصد) ($P < 0/042$). تعداد فولیکول‌های اولیه دچار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در دو گروه انجمادی V_I و V_{II} (به ترتیب: $12/75 \pm 0/05$ درصد و $11/23 \pm 0/06$ درصد) نسبت به گروه کنترل ($2/92 \pm 0/03$ درصد) افزایش نشان داد ($P < 0/025$).

بحث

در مطالعه حاضر تأثیر ترکیب ضدیخ‌های EG و DMSO در حضور سوکروز یا بدون آن، بر میزان سالم ماندن فولیکول‌ها و نیز شیوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در بافت تخمدان

شده است. ظاهراً PVS (Perivitelline Space) در فولیکول‌های گروه V_I افزایش بیشتری یافته است. با توجه به نقش سوکروز در حفاظت از بافت در برابر آسیب‌های مکانیکی به نظر می‌رسد گروه حاوی سوکروز با این که تغییر معنی‌داری در سایر موارد تحت بررسی با گروه فاقد آن نشان نداده است اما تمامیت بافت را بهتر حفظ کرده و این طور به نظر می‌رسد که از این منظر، محلول انجمادی حاوی سوکروز (گروه V_{II}) روش قابل قبول‌تری در حفظ بافت ارایه می‌نماید.

البته ذکر این نکته مهم است که باید آثار سوکروز را بر فراساختار بافت نیز بررسی نمود تا جنبه‌های مختلف استفاده از آن مشخص شود، چرا که در بسیاری از موارد ظاهر سلول و بافت حکایت درستی از ساختار درونی آن ندارد [۹، ۳۳]. لازم به ذکر است که نتایج این مطالعه تا حدودی با مطالعه قبلی محققان حاضر متفاوت است. در مطالعه قبلی اثر ترکیب ضدیخ‌های EG و DMSO به همراه ۰/۲۵ مول در لیتر سوکروز بر قطعات قشر تخمدان گوسفند بررسی شد [۵]. نتایج در آن‌جا نشان داد که در گروه آزمون سمیت تقریباً کل فولیکول‌ها نسبت به گروه انجمادی بهتر حفظ شده بود که این میزان در تعداد فولیکول‌های پره‌آنترال معنی‌دار بود (به ترتیب $2/00 \pm 80/00$ درصد و $1/90 \pm 42/00$ درصد). این امر نتیجه آن است که احتمالاً ترکیبات مختلف ضدیخ در گونه‌های جانوری آثار متفاوتی دارد و این آثار وابسته به گونه است و حتی اثر استفاده از آن در سلول‌ها و بافت‌های مختلف یک گونه نیز می‌تواند متفاوت باشد. بنابراین استفاده از سوکروز به عنوان یک دی‌ساکارید در تمامی گونه‌ها و نمونه‌ها ضروری به نظر نمی‌رسد.

EG و DMSO در بسیاری از مطالعات به عنوان ضدیخ‌های مناسب در انجماد بافت تخمدان معرفی شده‌است: گاو [۹، ۲۶]، بز [۲۴، ۲۵]، گوساله [۲۱-۲۳]، انسان [۳۴]، گربه‌سانان [۲۷، ۲۸] و گوسفند [۵]. در برخی از این مطالعات، EG بهتر از DMSO معرفی شده [۲۱، ۲۲، ۲۴، ۲۶] و در برخی دیگر نتایج معکوس است [۹، ۲۳]. نیوتن (Newton) در سال ۱۹۹۸ اثر ضدیخ‌های DMSO، EG، PROH و گلیسرول

موش صحرایی ۵ هفته‌ای بررسی شد. باید اذعان نمود که مطالعات مشابهی نیز در مقایسه آثار ضدیخ‌های مختلف بر بافت تخمدان انسان [۲۰]، گوساله [۲۱-۲۳]، بز [۲۴، ۲۵]، گاو [۹، ۲۶]، گربه‌سانان [۲۷، ۲۸]، جنین آبزیان [۲۹] و مایع منی خوک [۳۰] انجام شده است. همچنین فراساختار بافت تخمدان گاو تحت تأثیر ضدیخ‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته [۹] و در آن گزارش شده است که ضدیخ‌های DMSO و PROH در حفظ بافت تخمدان گاو نسبت به سایر ضدیخ‌ها موفق‌تر عمل می‌کنند.

در پژوهش حاضر بیشترین تعداد فولیکول‌های سالم در بافت تخمدان گروه کنترل، فولیکول‌های بدوی بودند ($0/03 \pm 36/53$ درصد). پس از انجماد در گروه‌های انجمادی بیشترین آسیب متوجه این نوع فولیکول‌ها بود به طوری که در دو گروه انجمادی V_I ($0/02 \pm 14/37$ درصد) و V_{II} ($0/03 \pm 19/04$ درصد) تعداد فولیکول‌های بدوی سالم کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشتند. به نظر می‌رسد زمانی که سوکروز به میزان ۰/۲۵ مول در لیتر به ترکیب ضدیخ‌ها اضافه شده است، اثرگذاری چندانی برای حفظ فولیکول‌های بدوی نداشته یا استفاده از آن طبق مقالات مختلف وابسته به گونه است و شاید به همین دلیل است که در برخی مطالعات نقش دی‌ساکاریدها را در فرآیند انجماد ناچیز دانسته و از محلول‌های بدون سوکروز استفاده می‌کنند [۱۷، ۱۸]. با این حال جین (Jin) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ ادعا کردند که سوکروز به عنوان یک دی‌ساکارید نقش به‌سزایی در موفقیت فرآیند انجماد دارد [۱۵]، چرا که استفاده از آن موجب کاهش میزان سمیت مواد ضدیخ شده و سرعت نفوذ ضدیخ‌های نفوذ کننده نظیر گلیسرول و PROH را افزایش می‌دهد [۳۱]. همچنین سوکروز به دلیل این‌که در اطراف سلول قرار می‌گیرد، می‌تواند نقش بالشتکی را ایفا کند که سلول را تا حدودی از آسیب‌های فیزیکی و مکانیکی حفظ می‌نماید [۳۲]. با توجه به تصاویر رنگ‌آمیزی شده به وسیله هماتوکسیلین و اتوزین، تمامیت بافت در گروه انجمادی V_{II} از گروه V_I بهتر حفظ

اثر سوکروز بر انجماد شیشه‌ای تخمدان موش صحرایی

حد سلول و آسیب جدی به اندامک‌های داخلی و غشا را به دنبال دارد [۳۹]. تمامی موارد فوق می‌تواند موجب القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و نکروز (Necrosis) بافتی شود.

میزان سمیت EG نیز نسبت به DMSO کمتر است [۴۰]. البته این مسئله می‌تواند وابسته به گونه باشد. یعنی ممکن است EG در بافت تخمدان موش صحرایی سمی باشد اما در بافت تخمدان گوسفند سمی نباشد یا این که EG نسبت به DMSO بر بافت تخمدان گاو اثر سمی بیشتری داشته باشد [۹]. این مسئله نیز بسیار مهم است که هر چقدر بر درصد ضدیخ در محلول افزوده می‌شود، نقطه انجمادی محلول نیز کاهش می‌یابد. به عنوان مثال نقطه انجماد محلول حاوی ۵ درصد EG، ۵ درجه سانتی‌گراد است. اما محلولی با ۱۰ درصد EG نقطه انجمادی در حدود ۴- درجه سانتی‌گراد دارد. البته در غلظت بیش از ۷۰ درصد EG، نقطه انجماد به صورت عکس با افزایش غلظت، بالا رفته و مجدداً به صفر نزدیک می‌شود [۴۱].

DMSO با فرمول مولکولی C_2H_6OS دارای وزن مولکولی $78/13$ گرم در مول و چگالی $1/1004$ گرم در هر سانتی‌متر مکعب است. DMSO از اولین موادی است که برای حفاظت در برابر سرما استفاده شده است و تا حدودی در این مسئله بیش از EG محبوبیت دارد. DMSO ابتدا در سال ۱۸۶۶ توسط شیمیدان روسی الکساندر زایتسو (Alexander Zaytsev) ساخته شد. اکسید کردن دی‌متیل سولفاید (Dimethyl Sulfide) با اکسیژن خالص و یا به‌وسیله اکسید نیتروژن باعث ایجاد DMSO می‌شود [۴۲] که به دلیل قدرت حلالیت بالا در بسیاری از واکنش‌های شیمیایی از آن استفاده می‌شود [۴۲]. حلالیت بالای DMSO می‌تواند در کاهش چسبندگی محلول و افزایش تماس سلول‌ها با آن مؤثر باشد. اگرچه DMSO نسبت به سایر ترکیبات هم‌خانواده خود نظیر دی‌متیل فرمامید (Dimethylformamide) و دی‌متیل استامید (Dimethylacetamide) از کمترین میزان سمیت برخوردار است اما به طور کلی نسبت به ضدیخ‌های متداول دیگر مانند EG سمیت بیشتری دارد [۳۱].

را بر بافت تخمدان انسانی ارزیابی کرد و اشاره نموده که قدرت نفوذ ضدیخ‌های DMSO و EG به دلیل داشتن وزن مولکولی کمتر نسبت به سایرین بهتر بوده است [۳۵]. مطالعاتی نیز به دلیل نفوذ خوب DMSO، آن را برای انجماد انواع سلول‌ها مناسب دانسته‌اند [۳۶]. همچنین لوسی (Lucci) اثر ضدیخ‌های فوق و PROH را به تنهایی بر بافت تخمدان گاو بررسی کرد و نتیجه گرفت که EG ضعیف‌ترین اثر را برای حفظ فولیکول‌های در حال تکوین داشته است [۹].

در هر حال به منظور مقایسه اثر ضدیخ‌ها بر بافت تخمدانی باید به سه نکته اساسی اشاره نمود: ۱) سرعت نفوذ ضدیخ به داخل سلول‌های بافت تخمدانی (۲) میزان سمیت ضدیخ (۳) انواع مختلف سلولی در بافت تخمدان. سرعت نفوذ یک ضدیخ به دو عامل بستگی دارد: وزن مولکولی و چگالی که در بین سه ضدیخ مورد بررسی در مطالعه حاضر، EG با فرمول مولکولی $C_2H_6O_2$ ، کمترین وزن مولکولی ($62/068$ گرم در مول) و بیشترین چگالی را دارد ($1/1132$ گرم در هر سانتی‌متر مکعب). EG اولین بار در سال ۱۸۵۹ توسط شیمیدان فرانسوی چارلز-آدلف وورتز (Charles-Adolphe Wurtz) از روی استات اتیلن گلیکول (Acetate Ethylene Glycol) و از طریق ساپونیفیکیشن (Saponification) با هیدروکسید پتاسیم (Potassium Hydroxide) و در سال ۱۸۶۰ از آب‌دهی اکسید اتیلن (Ethylene Oxide) به‌دست آمد. تقریباً ۶۰ درصد EG تولیدی در جهان به عنوان ماده ضدیخ و بقیه در صنایع پلیمر به‌کار می‌رود [۳۷]. اگر چه EG به دلیل داشتن وزن مولکولی پایین، قدرت نفوذ بهتری نسبت به سایر ضدیخ‌ها دارد [۳۸]، اما باید توجه داشت که اثر این ویژگی می‌تواند با توجه به اندازه متفاوت و عدم یکنواختی سلول‌ها به خصوص در بافت تخمدان تغییر کند؛ چرا که سرعت جابه‌جایی بین آب و EG در سلول‌های با اندازه‌های متفاوت متغیر است و در این حالت EG به سرعت وارد سلول می‌شود ولی آب نمی‌تواند با همان سرعت از سلول خارج شده و موجب ترکیدن سلول می‌شود. همین مسئله در زمان آب‌دهی مجدد نیز، چروکیدگی بیش از

پایین، عدم وجود لایه زونا و گرانول‌های قشری و نیز میزان کم چربی درون سیتوپلاسمی حساس به کاهش دما [۹]، نسبت به فولیکول‌های دیگر به آسیب‌های انجمادی مقاومت بیشتری دارند، اما نتایج نشان دادند که شاید میزان سرعت نفوذ و نیز سمیت ضدیخ‌ها در بافت تخمدان موش صحرایی، در درجه اول اهمیت قرار داشته و این امر بر آسیب به فولیکول‌ها به خصوص فولیکول‌های بدوی نزدیک به سطح، تأثیرگذار بوده است به گونه‌ای که افزودن سوکروز نیز نتوانسته است ضامنی برای حفظ بهتر فولیکول‌ها باشد.

به طور کلی مطالعه حاضر نشان می‌دهد که افزودن سوکروز به ترکیب محیط انجمادی نظیر EG و DMSO نمی‌تواند چندان به حفظ فولیکول‌ها به خصوص فولیکول‌های بدوی و اولیه که در روند انجماد و پیوند از اهمیت خاصی برخوردار هستند کمک کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری رشته علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بوده که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشگاه رویان انجام شده است.

نکته دیگر در ارزیابی اثر ضدیخ‌ها، نوع بافت و سلول است. از آنجایی که بافت تخمدان از مجموعه سلولی با اقطار متفاوت مانند سلول‌های استروما و اندوتلیال با قطر حدود ۲ میکرومتر و تخمک با قطر حدود ۱۲۰ میکرومتر تشکیل شده است، میزان اثرگذاری ضدیخ‌ها و بقای سلولی متغیر خواهد بود. همچنین وجود فضاهایی با اندازه‌های متفاوت در لایه‌های سلول‌های گرانولوزا نیز نفوذ و عبور ضدیخ‌ها را به سمت تخمک با مشکل مواجه می‌کند. از طرف دیگر فاصله فولیکول‌های بزرگ‌تر از سطح تخمدان، تأثیرپذیری آن‌ها را از ضدیخ‌ها سخت‌تر می‌نماید. فولیکول‌های بدوی و اولیه به دلیل نزدیک بودنشان به سطح، سریع‌تر با ضدیخ تماس حاصل کرده و آب‌گیری می‌شوند. در حالی که تخمک درون این فولیکول‌ها وارد فاز چروکیدگی می‌شوند اما تخمک‌های موجود در عمق بافت تخمدان که در دل فولیکول‌های آنترال یا پره‌آنترال بزرگ قرار دارند، هنوز با ضدیخ تماس حاصل نکرده‌اند [۹]؛ بنابراین هماهنگی مناسب بین زمان تیمار با ضدیخ، غلظت و نوع ضدیخ بسیار اهمیت دارد.

در مطالعه حاضر، فولیکول‌های آنترال نسبت به فولیکول‌های کوچک‌تر آسیب کمتری دیدند. اگرچه فولیکول‌های بدوی به دلیل اندازه کوچک، فعالیت متابولیکی

منابع

- [1] Christopoulou C. Robert Boyle's experiments on cold: A study of the role of chemical experiments. 6th International Conference on The History of Chemistry 2007; 423-431. Available at: http://www.euchems.eu/fileadmin/user_upload/binaries/49_Christopoulou_tcm23-139407.pdf
- [2] Demeestere I, Moffa F, Peccatori F, Poirot C, Shalom-Paz E. Multiple approaches for individualized fertility protective therapy in cancer patients. *Obstet Gynecol Int* 2012; 2012: 961232.
- [3] 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.
- [4] 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.

- [5] 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.
- [6] Baudot A, Courbiere B, Odagescu V, Salle B, Mazoyer C, Massardier J, Lornage J. Towards whole sheep ovary cryopreservation. *Cryobiology* 2007; 55(3): 236-48.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LH, Rumpf R, Bão 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.
- [10] 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.
- [11] Buranaamnuay K, Grossfeld R, Struckmann C, Rath D. Influence of cryoprotectants glycerol and amides, combined with antioxidants on quality of frozen-thawed boar sperm. *Anim Reprod Sci* 2011; 127(1-2): 56-61.
- [12] Forero-Gonzalez RA, Celeghini EC, Raphael CF, Andrade AF, Bressan FF, Arruda RP. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia* 2012; 44 Suppl 1: 154-9.
- [13] Fathi R, Valojerdi MR, Yazdi PE, Ebrahimi B, Alipour H, Hassani F. Development of 4-cell mouse embryos after re-vitrification. *Cryobiology* 2012; 64(1): 23-6.
- [14] Rezazadeh Valojerdi M, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Hassani F, Movaghar B. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26(6): 347-54.
- [15] 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.
- [16] Marsella T, Sena P, Xella S, La Marca A, Giulini S, De Pol A, Volpe A, Marzona L. Human ovarian tissue cryopreservation: effect of sucrose concentration on morphological features after thawing. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(2): 257-67.
- [17] 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.
- [18] Isachenko V, Isachenko E, Petrunikina AM, Sanchez R. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. *Reprod Fertil Dev* 2012; 24(2): 323-6.

- [19] Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986; 1(2): 81-7.
- [20] Amorim CA, David A, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. *Fertil Steril* 2011; 95(3): 1094-7.
- [21] 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.
- [22] Cecconi S, Capacchietti G, Russo V, Berardinelli P, Mattioli M, Barboni B. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. *Biol Reprod* 2004; 70(1): 12-7.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Rodrigues AP, Amorim CA, Costa SH, Matos MH, Santos RR, Lucci CM, Bão SN, Ohashi OM, Figueiredo JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci* 2004; 84(1-2): 211-27.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, Wining 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.
- [29] 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; 26:1-6. [Epub ahead of print]
- [30] Martinez-Alborcia MJ, Valverde A, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PLoS One* 2012; 7(5): e36550.
- [31] Liu Z, Foote RH. Osmotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and nonpermeable agents. *Cryobiology* 1998; 37(3): 207-18.
- [32] 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.
- [33] Silva JR, Báo 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.
- [34] 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.
- [35] Newton H, Fisher J, Arnold JRP, 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.
- [36] Cabrita E, Robles V, Chereguini O, de Paz P, Anel L, Herraéz MP. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. *Theriogenology* 2003; 60(3): 463-73.
- [37] Elert, G. Viscosity. *The Physics Hypertextbook*. 2007; Available at: <http://physics.info/viscosity/>
- [38] Voelkel SA, Hu YX. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 1992; 37(3): 687-97.
- [39] Katkov II, Pogorelov AG. Influence of exposure to vitrification solutions on 2-cell mouse embryos: II. Osmotic effects or chemical toxicity? *Cryo Letters* 2007; 28(6): 409-27.
- [40] Szurek EA, Eroglu A. Comparison and Avoidance of Toxicity of Penetrating Cryoprotectants. *PLoS One* 2011; 6(11): e27604.
- [41] Rebsdats S, Mayer D. Ethylene Glycol. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH 2000; Available at: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a10_101/abstract
- [42] Roy KM. Sulfones and Sulfoxides. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH 2000; Available at: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a25_487/abstract