

پیوند اتولوگ بافت بیضه نابالغ منجمد - ذوب شده در موش بعد از بلوغ

رمضان خان بابایی^{▲*}، Ph.D.، سعید کاظمی آشتیانی[✉]، Ph.D.، کاظم پریور^{*}، Ph.D.، محمدعلی صدیقی گیلانی^{◆*}، Ph.D.، محمدحسین نصرافهانی^{*}، Ph.D.، حسین بهاروند^{*}، Ph.D.

چکیده

هدف: تعیین بهترین روش انجماد بافت بیضه نابالغ و دستیابی به اسپرماتوزوئید با انجماد بافت بیضه موش نابالغ و ذوب و پیوند (اتولوگ) آن پس از بلوغ.

روش بررسی: موشهای نر نابالغ (NMRI) بیهوش و سپس یک بیضه آنها خارج و به قطعات $0.5-1\text{mm}^3$ بریده شد و با روشهای آهسته و شیشه‌ای با ضدیخهای گلیسرول (GLY)، اتیلن گلیکول (EG) و دی متیل سولفو کساید (DMSO) منجمد شد. یک ماه بعد بافتها ذوب و درصد سلولهای سالم در تعدادی از قطعات تعیین گردید و بقیه قطعات در زیر پوست ناحیه پشتی همان حیوان پیوند شدند. ۴ تا ۶ هفته پس از پیوند، موشها با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و بافت بیضه خارج گردید و مطالعات بافتی صورت گرفت.

یافته‌ها: سلولهای منجمد شده با استفاده از ضدیخهای GLY، EG و DMSO با روش انجماد آهسته کنترل نشده طولانی مدت، پس از ذوب، به ترتیب $12/7 \pm 1/4$ ، $15/5 \pm 3/6$ و $15/2 \pm 2/9$ درصد سالم بودند و در روش انجماد آهسته کنترل نشده کوتاه مدت با استفاده از ضدیخهای GLY، EG و DMSO، درصد سلولهای سالم پس از ذوب به ترتیب $48/8 \pm 5/3$ ، $63/3 \pm 6/4$ و $79/4 \pm 4/7$ بود. درصد سلولهای سالم منجمد شده با روش انجماد شیشه‌ای با استفاده از ضدیخهای EG و DMSO پس از ذوب نیز به ترتیب $59/2 \pm 4$ و $53/6 \pm 3/3$ بود. درصد سلولهای سالم گروه شاهد (بدون انجماد) $92/9 \pm 1/2$ بود. ۲۳٪ پیوندهای انجام شده، با بافت زمینه ارتباط برقرار کرده، از ابعاد $1-0.5\text{mm}^3$ به $2-3\text{mm}^3$ رشد کردند. در برشهای بافتی رده‌های متفاوت سلولهای اسپرماتوژنیک و اسپرماتوزوئیدهای تیبیک مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که درصد سلولهای سالم بافت بیضه منجمد شده با روش انجماد آهسته کوتاه مدت نسبت به روشهای دیگر بیشتر است و استفاده از ضد یخ DMSO در این روش به عنوان حفاظ انجمادی نسبت به ضد یخهای دیگر نتیجه بهتری را به همراه دارد. با انجماد بافت بیضه موش نابالغ و ذوب و پیوند آن بعد از بلوغ به صورت قطعات بافتی می‌توان به اسپرماتوزوئید کامل دست یافت.

واژه‌های کلیدی: انجماد، بافت بیضه، موش نر نابالغ، شیمی درمانی، پیوند.

دریافت مقاله: ۸۴/۱۰/۷، اصلاح مقاله: ۸۵/۷/۱۵، پذیرش مقاله: ۸۵/۷/۱۶

✉ نویسنده مسئول: گروه سلولهای بنیادی، پژوهشکده رویان، تهران، ایران

* گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

✉ گروه سلولهای بنیادی، پژوهشکده رویان

▲ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائمشهر

◆ گروه اورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

آدرس پست الکترونیکی: Khanbabaee@gmail.com

مقدمه

یکی از مهمترین نکات مورد توجه در برنامه‌های درمانی بیماران سرطانی، حفظ توان تولیدمثل بیماران در طی روند درمان و پس از آن است. با وجود این که سعی می‌شود از ترکیبات دارویی کم ضرر برای گنادها استفاده شود (۱)، اما ۱۰ تا ۱۰۰ درصد بیماران سرطانی درمان شده، بسته به نوع سرطان، سن، نوع ترکیبات به کار گرفته شده، دوز و مدت زمان درمان، کاهش شاخصه‌های منی را نشان می‌دهند و به طور متوسط ۱۵ تا ۳۰ درصد برای همیشه عقیم باقی می‌مانند. (۲) ناباروری در این بیماران به علت از دست دادن سلولهای اسپرماتوژنیک در نتیجه شیمی درمانی و مخصوصاً اشعه‌درمانی است. (۳،۴) نتایج اپیدمیولوژی نشان می‌دهد که تقریباً از هر ۶۵۰ کودک، یک نفر قبل از ۱۵ سالگی به سرطان مبتلا می‌شود. در سالهای اخیر پیشرفتهای قابل ملاحظه‌ای در درمان سرطان کودکان حاصل شده است و به خاطر انتخاب روشهای درمانی بهتر، ۷۵ درصد آنان معالجه می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که میزان مرگ و میر در کودکان بیشتر از گروههای سنی دیگر کاهش یافته است و به طور معمول در جامعه، از هر ۱۰۰۰ نفر در گروه سنی ۲۰ تا ۳۰ سالگی، یک نفر وجود دارد که از سرطان دوران کودکی نجات یافته است. (۵) تخمین زده می‌شود در سال ۲۰۱۰ این رقم به ۴ نفر در هر ۱۰۰۰ نفر افزایش یابد. (۶) پیشرفتهای گسترده در روشهای نوین درمان نازایی و افزایش میزان باروری در روش تزریق مستقیم اسپرم به داخل تخمک (ICSI) که نیاز به تعداد معدودی اسپرم دارد، این ایده را در ذهن پژوهشگران به وجود آورد که انجماد منی بالغین و بافت بیضه پسران نابالغ مبتلا به سرطان قبل از شروع درمان می‌تواند راه عملی و مؤثر در حفظ توان تولیدمثل این افراد باشد و پیشرفت تکنولوژی در آینده، پژوهشگران را قادر خواهد ساخت تا گامتهای سالمی از این بافتهای منجمد شده جدا کنند (۷) و آنان را پدر فرزندان کنند که از نظر ژنتیکی متعلق به خود آنان است. (۱، ۸-۱۵) امروزه تکنیک استاندارد جهت حفظ توان تولیدمثل مردان و پسران بالغ مبتلا به

سرطان، انجماد اسپرماتوزوئید (۱۷،۱۶) و در پسران نابالغ، انجماد بافت بیضه قبل از شروع درمان است. (۱۸،۷) یک راه دستیابی به اسپرم در بافت بیضه نابالغ منجمد شده این است که بافت منجمد شده، ذوب و کشت داده شود. البته این امر با توجه به اطلاعات امروزی بسیار مشکل است. راه دیگر جهت دستیابی به نسل جدید از این بافت، پیوند اسپرماتوگونی به صورت تزریق به داخل لوله‌های اسپرم‌ساز و یا به صورت پیوند قطعات بافتی در بیضه و یا در جای دیگری از بدن مانند زیر پوست است. (۱۹-۲۱) پیوند بافت، مزیت‌های فراوانی در مقایسه با پیوند اسپرماتوگونی دارد (۲۰) زیرا انجماد بافت بیضه به صورت قطعات بافتی آسانتر از انجماد آن به صورت سوسپانسیون سلولی است و نیاز به هضم آنزیمی قوی جهت جمع‌آوری اسپرماتوگونی و انجماد و پیوند آن ندارد. (۲۰،۲۲) تهیه سوسپانسیون سلولی به روش هضم آنزیمی و جداسازی مکانیکی ارتباط‌های بین سلولی موجب افزایش هیپوکسی می‌شود که به سلول آسیب می‌رساند. (۳) مزیت دیگر پیوند بافت این است که با تعداد اندک سلولهای بنیادی که در قطعات کوچک نمونه‌های بیوپسی وجود دارد، روش کارآمدی است چرا که تعداد سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه‌ها نسبتاً کم [۲ سلول بنیادی در هر ۱۰^۴ سلول زاینده جدا شده از یک بیضه جونده بالغ (۳،۲۳)] است (۲۴) و شناسایی آنها نیز آسان نیست (۲۵) و بعد از پیوند تنها ۵ تا ۱۰ درصد سلولهای بنیادی می‌توانند در لوله‌های اسپرم ساز تکثیر شوند. (۳،۲۶،۲۷) انجماد بافت بیضه به صورت قطعه‌ای از آن موجب عدم از دست دادن تعداد اندک اسپرماتوگونی می‌شود که در طی مراحل جداسازی سلولها رخ می‌دهد. (۳) از طرف دیگر تزریق همزمان سلولهای اسپرماتوگونی و سلولهای سوماتیک، عدم توازن هورمونی ایجاد شده در طی درمان سرطان را برطرف می‌سازد. (۲۰،۲۸،۲۹) با توجه به اهمیت انجماد بافت بیضه، پروتکل‌های متفاوت توسط پژوهشگران ارائه شده است ولی تاکنون نظر قطعی و مورد توافق تأمین نگردیده است. همچنین تاکنون گزارشی مبنی بر پیوند بافت بیضه نابالغ به صورت اتولوگ و نابه‌جا در دست

تربیان بلو تعیین گردید. گروه‌های تجربی هر یک شامل ۵ سر موش نر نابالغ بود که قطعات بافت بیضه آن با روش‌های زیر منجمد شد: گروه ۱ با روش انجماد آهسته کنترل نشده طولانی مدت با استفاده از ضد یخ گلیسرول، گروه ۲ با روش انجماد آهسته کنترل نشده طولانی مدت با استفاده از ضد یخ اتیلن گلیکول، گروه ۳ با روش انجماد آهسته کنترل نشده طولانی مدت با استفاده از ضد یخ دی متیل سولفوکساید، گروه ۴ با روش انجماد آهسته کنترل نشده کوتاه مدت با استفاده از ضد یخ گلیسرول، گروه ۵ با روش انجماد آهسته کنترل نشده کوتاه مدت با استفاده از ضد یخ اتیلن گلیکول، گروه ۶ با روش انجماد آهسته کنترل نشده کوتاه مدت با استفاده از ضد یخ دی متیل سولفوکساید، گروه ۷ با روش انجماد شیشه‌ای با استفاده از ضد یخ اتیلن گلیکول و گروه ۸ با روش انجماد شیشه‌ای با استفاده از ضد یخ دی متیل سولفوکساید.

روش انجماد. برای انجماد قطعات بافت بیضه با روش انجماد آهسته کنترل نشده طولانی مدت از پروتکل بهینه شده Frederickx و همکاران استفاده شد. (۲۲) بلافاصله پس از خارج سازی، بیضه شستشو و قطعه قطعه گردید. قطعات بافتی وارد لوله انجمادی ۱/۸ میلی‌لیتری (Nunk, Biotechnologies, Denmark) حاوی ۰/۵ میلی لیتر محیط DMEM/F-12 توام با ۱۰٪ BSA (sigma, USA) شدند و ضد یخ GLY، با غلظت ۳ مول بر لیتر به صورت قطره قطره به مدت ۱۵ ثانیه در لوله‌های حاوی محیط و قطعات بیضه به نسبت ۱:۱ حجمی اضافه شد تا غلظت نهایی ضد یخ به ۱/۵ مول بر لیتر برسد. لوله‌های انجمادی سپس به یخچال (با برودت ۸۰- درجه سانتی‌گراد) منتقل شد و بعد از ۴۸ ساعت در نیتروژن مایع غوطه ور شد. روش یاد شده بالا با ضد یخ‌های EG و DMSO با غلظت نهایی ۱/۵ مول بر لیتر نیز انجام شد. برای انجماد قطعات بافت بیضه با روش انجماد آهسته کنترل نشده کوتاه مدت، از ترکیبی از روش Dafopoulos و همکاران (۳۰) و Keros و همکاران (۳) استفاده شد. قطعات بیضه در لوله‌های انجمادی حاوی ۰/۵ میلی لیتر DMEM/F-12 همراه با ۵ درصد BSA قرار گرفتند و قطره قطره ضد یخ DMSO با غلظت ۱/۴ مول بر لیتر به نسبت ۱:۱ حجمی - حجمی در مدت ۱۰ ثانیه اضافه شد تا غلظت نهایی ضد یخ به ۰/۷

نیست. با توجه به دلایل ذکر شده، این تحقیق سعی نمود تا با ارزیابی روش‌های متفاوت انجماد بافت، بهترین روش انجماد بافت بیضه موش نابالغ را انتخاب و پس از بلوغ، بافتهای منجمد شده را ذوب و در زیر پوست ناحیه پشتی همان حیوان پیوند و نتیجه آن را بررسی نماید.

روش بررسی

حیوان آزمایشگاهی. در این تحقیق از ۵۱ سر موش نر نابالغ (NMRI) ۱۷ تا ۲۰ روزه تهیه شده از انستیتو پاستور کرج (ایران) استفاده شد. حیوانات طبق روش استاندارد شماره‌گذاری شدند. حیوانات به تعداد ۵ تا ۶ سر در یک قفس با آب و غذای کافی در حیوانخانه پژوهشکده رویان در ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۴۵٪ نگهداری شدند.

مواد بیهوشی و روش جراحی. موشها با تزریق درون صفاقی آورتین (Avertine, Sigma, USA) به میزان ۶۳ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند. (۲۱) ناحیه دستگاه تناسلی خارجی ضد عفونی شد و شکافی به طول ۵ تا ۷ میلیمتر در کیسه بیضه در امتداد محور طولی بدن ایجاد شد و با فشار ملایم به ناحیه شکمی یک کیسه بیضه خارج و بافت اسپرماتیک کورد قطع شد. جهت جلوگیری از خونریزی، این بافت در دو ناحیه توسط گیره مهار شد و ناحیه بین دو گیره با قیچی نیمه داغ بریده شد. بیضه‌ها در محیط DMEM/ F-12 (Sigma, USA) دو بار شستشو و به محیط تازه DMEM/ F-12 انتقال داده شدند و توسط تیغ اسکالپل به قطعات ۰/۵ تا ۱ میلی‌متر مکعب بریده شدند. جهت به حداقل رساندن صدمات بافتی به هنگام قطعه قطعه کردن، برای هر بیضه از تیغ اسکالپل جدید و تیز استفاده شد.

گروه‌های تحقیق. بررسی‌ها در قالب یک گروه کنترل و هشت گروه تجربی انجام شد. برای تایید نابالغ بودن حیوانات هنگام برداشت بیضه جهت انجماد، برش برداری و مطالعه بافتی بر روی قسمتی از بافت بیضه صورت گرفت. گروه کنترل شامل ۵ سر موش نر نابالغ بود که قطعات بافت بیضه آن تا حد امکان تک سلولی شد و سپس درصد سلولهای سالم آن با روش

بریدن نی‌ها حد فاصل میان محیط انجماد شیشه‌ای حاوی قطعات بیضه و هوا، محیط حاوی نمونه در پتری تخلیه شد و قطعات بیضه به قطرات دیگری که به ترتیب حاوی محیط DMEM/ F-12 و سوکروز ۰/۵ و ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ —مول بر لیتر بودند، جهت شستشو وارد شدند و در نهایت به قطره تازه‌ای از محیط DMEM/ F-12 وارد شد.

سنجش حیاتی سلولهای منجمد - ذوب شده . سنجش حیاتی سلولهای منجمد - ذوب شده با تریپان بلو ۱٪ انجام شد. (۳۲) قطعات بیضه منجمد - ذوب شده با گذراندن از سرنگ با سر سوزن نمره ۱۷ به صورت تک سلولی درآمدند و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (محتوی تمام رده‌های سلولی بافت بیضه نابالغ) با ۱۰۰ میکرولیتر تریپان بلو ۱٪ مخلوط گردید. مخلوط حاصل روی لام نئوبار قرار گرفت و با قراردادن لامل روی آن، با میکروسکوپ نوری (Nikon, YS-100, Japan) با درشت‌نمایی $\times 400$ تعداد سلولهای رنگ شده (آسیب دیده) و رنگ نشده (سالم) شمارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری . با توجه به این که گروههای آزمایشی از یکدیگر مستقل بودند و پنج بار تکرار برای هر گروه انجام گرفت، برای مقایسه معنی‌دار بودن گروهها از آزمون ناپارامتری من ویتنی با ضریب اطمینان ۰/۹۵ ($p < 0.05$) استفاده و گروهها با یکدیگر مقایسه شدند.

جراحی و پیوند . حیوانات یک ماه پس از انجماد، با بالغ شدن، با تزریق درون صفاقی آورتین به میزان ۶۳ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند. ناحیه پشتی و ناحیه کیسه بیضه‌ای با الکل ۷۰٪ استریل شد و موهای این ناحیه تراشیده شد. در این مرحله، بیضه دیگر حیوان را که برای بلوغ حیوان باقی گذاشته شده بود، با ایجاد شکاف خطی به طول ۵-۷ میلی متر بین مخرج و ناحیه تناسلی خارج شد و شکاف ایجاد شده توسط گیره مایکل بسته شد. جهت تأیید بلوغ حیوان، برش‌برداری و مطالعه بافتی بر روی بیضه خارج شده صورت گرفت.

پیوند قطعات بافت بیضه منجمد-ذوب شده . با توجه به میزان بقای سلولی، فقط قطعات بیضه‌ای که به روش انجماد آهسته کنترل نشده کوتاه مدت و انجماد شیشه‌ای منجمد شده بودند (با ضدیخهای EG و DMSO)، ذوب و پیوند شدند. برای این عمل، ۴ شکاف به طول ۵-۷ میلی‌متر در ناحیه پشتی حیوان، دو طرف ستون مهره ای ایجاد و یک قطعه بیضه ای منجمد - ذوب شده در هر شکاف

مول بر لیتر برسد. لوله‌ها در ارتفاع ۲۰ سانتی‌متری سطح نیتروژن مایع به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس در داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. روش فوق با ضدیخهای GLY و EG با غلظت نهایی ۱/۵ مول بر لیتر نیز انجام شد.

برای انجماد شیشه‌ای قطعات بافت بیضه از پروتوکل بهینه شده Chen و همکاران (۳۱) استفاده شد. ابتدا قطعات بیضه در محیط DMEM/ F-12 حاوی ۱/۵ مول بر لیتر EG به مدت ۲/۵ دقیقه قرار گرفت تا به تعادل برسند. سپس در محیط DMEM/ F-12 حاوی ۵/۵ مول بر لیتر EG به مدت ۳۰ ثانیه و سپس در قطره‌های دیگر از DMEM/ F-12 حاوی ۵/۵ مول بر لیتر EG قرار گرفتند. تمام مراحل یاد شده برای انجماد بافتها با ضدیخ DMSO نیز انجام شد. نی‌ها (0.5 ml straw, French) به ترتیب از ۱ cm محیط انجماد شیشه‌ای، ۱ cm هوا، ۱/۵ cm محیط انجماد شیشه‌ای حاوی قطعات بیضه، ۱ cm هوا و بقیه از محیط انجماد شیشه‌ای پر شد تا سطح بالای ستون به پودر کتان بالای نی برسد. انتهای نی توسط خمیر هماتوکریت مسدود شد و نی‌ها برای ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه روی بخار نیتروژن و سپس در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند.

روش ذوب . ذوب بافتهای بیضه منجمد شده یک ماه پس از انجماد، با بالغ شدن موشها صورت گرفت.

ذوب بافتهای بیضه منجمد شده به روش آهسته کنترل نشده طولانی مدت و کوتاه مدت . لوله‌های انجمادی (۱/۸ میلی لیتری حاوی ۱ میلی لیتر محیط انجمادی و قطعات بیضه) از نیتروژن مایع خارج شدند و باقیمانده حجم لوله‌ها از محیط DMEM/ F-12 جهت رقیق کردن ضدیخ پر شد. لوله‌ها در حمام آب ۳۷ درجه سانتیگراد تا زمانی که یخ آنها ذوب شود، قرار گرفتند و سپس محتویات آنها در پتری (Falcon 35,3001, England) تخلیه شد. قطعات بیضه جهت شستشو به قطرات تازه‌ای از محیط DMEM/ F-12 وارد شدند.

ذوب قطعات بافتی منجمد شده با روش انجماد شیشه‌ای. نی‌ها پس از خروج از نیتروژن مایع به مدت ۵ ثانیه در دمای اتاق و پس از پاک کردن بخار روی نی توسط حوله کاغذی، به مدت ۱۰ ثانیه در حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. با

سنجش حیاتی سلولهای بیضه‌ای منجمد - ذوب شده.

سنجش حیاتی سلولهای گروه کنترل (منجمد نشده) با رنگ حیاتی تریپان بلو نشان داد که $1/2 \pm 92/9$ درصد از سلولها از غشای سالمی برخوردارند و غشای $7/1\%$ از سلولها در طی روند تک سلولی شدن آسیب دید و موجب نفوذ رنگ به داخل آن شد (نمودار ۱). بافتی‌هایی که با استفاده از روش آهسته کنترل نشده طولانی مدت با استفاده از ضدیخهای EG, GLY و DMSO منجمد شده بودند، پس از ذوب به ترتیب $1/4 \pm 12/7$ ، $3/6 \pm 5/5$ و $2/9 \pm 15/2$ درصد سلولهای سالم داشتند (نمودار ۱) که با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد، اما بین این سه تیمار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. تفاوت میانگین درصد سلولهای سالم منجمد شده با روش انجماد آهسته کوتاه مدت (با به کارگیری ضدیخهای EG, GLY و DMSO به ترتیب $4/3 \pm 48/8$ ، $6/4 \pm 63/3$ و $4/7 \pm 79/4$ درصد) در مقایسه با یکدیگر و گروه شاهد معنی‌دار بود ($p < 0/001$). مقایسه میانگین درصد سلولهای سالم منجمد شده با روش انجماد آهسته کوتاه مدت با به کارگیری ضدیخ DMSO با تمام گروههای آزمایشی دیگر و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/001$) و بالاترین درصد سلولهای سالم را پس از انجماد - ذوب در میان تمام گروههای آزمایشی داشت (نمودار ۱).

مقایسه میانگین درصدهای سلولهای سالم گروههای منجمد شده با روش انجماد شیشه‌ای (با به کارگیری ضدیخهای EG و DMSO به ترتیب $4 \pm 59/2$ و $3/3 \pm 53/6$ درصد) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. اما در مقایسه با گروه شاهد و گروههای منجمد شده با روش انجماد آهسته کنترل نشده طولانی مدت تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/001$) (نمودار ۱).

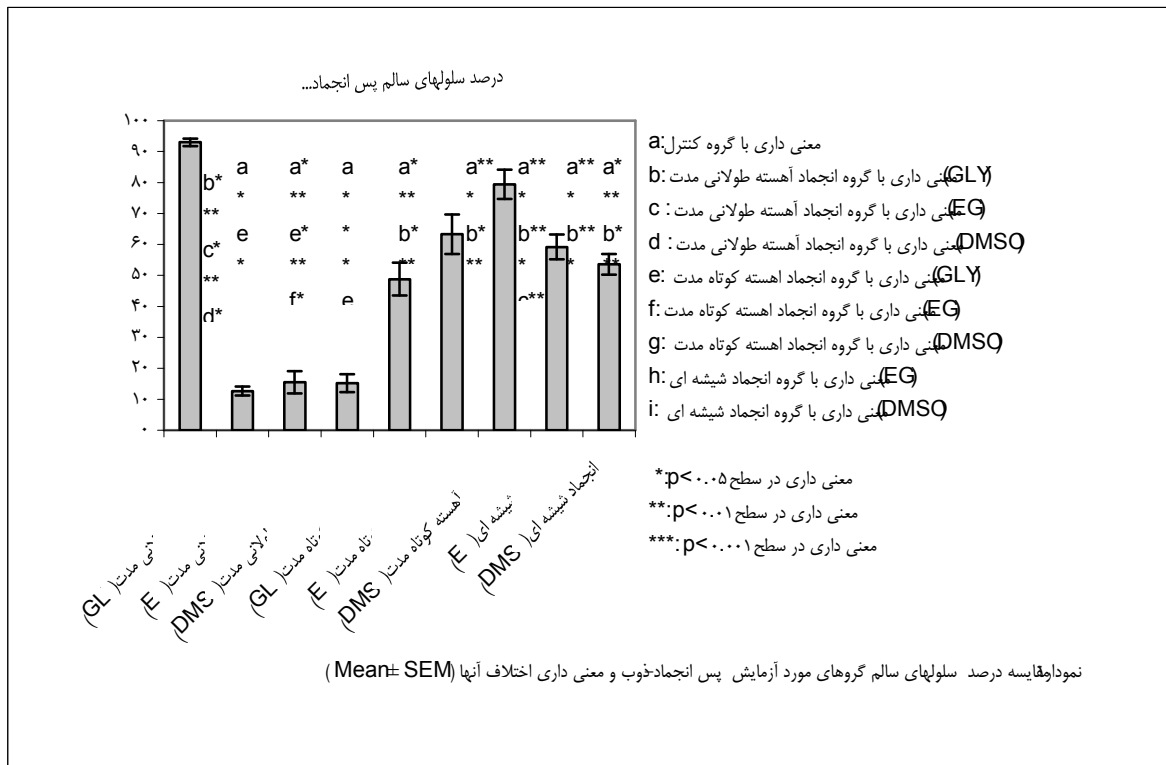
پیوند - در هر حیوان یک تا دو پیوند (از چهار پیوند انجام شده) با بافت اطراف ارتباط سلولی برقرار کرده، با رگزایی بیشتر در این ناحیه استقرار پیدا کردند و از ابعاد $0/5$ تا 1 میلی متر مکعب به 2 تا 3 میلی‌متر مکعب تکوین یافتند. تفاوت معنی‌داری در رد یا پذیرش پیوند در بین گروههای پیوند شده مشاهده نشد.

مطالعات بافتی - مطالعات بافتی بر روی پیوندهای موفق نشان می‌دهد که نسج بیضه در این قطعات به صورت نامنظم وجود دارد

قرار گرفت و توسط نخ بخیه پرولین نمره $6/0$ غیر قابل جذب (Ethicon, Prolene, Belgium) با 2 تا 3 بخیه به لایه ماهیچه‌ای زیر پوست بخیه شد و شکاف پوستی توسط گیره مایکل بسته شد. حیوانات پس از به هوش آمدن به مدت 2 ساعت در قفس در مکان 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا به وضع طبیعی برگردند و سپس به حیوانخانه منتقل شدند. 6 هفته پس از پیوند، حیوانات با جا به جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و موهای ناحیه پیوند تراشیده شد. سپس پوست ناحیه پیوند شکافته شد و بافت بیضه پیوند شده بیوپسی شد. **مطالعات بافتی** - بافتی‌های بیضه پیوند شده‌ای که با بافت اطراف ارتباط سلولی برقرار کرده و با رگزایی بیشتر در این ناحیه استقرار پیدا کرده اند و از ابعاد $0/5$ تا 1 میلی متر مکعب به 2 تا 3 میلی‌متر مکعب تکوین یافتند، پیوند موفق نامیده شدند و بافتی‌های بیضه پیوند شده‌ای که با بافت اطراف ارتباط سلولی برقرار نکرده، دژنره شدند، پیوند ناموفق نامیده شدند. بافت بیضه پیوند شده از محل پیوند شده خارج و به مدت 15 تا 20 ساعت در فیکساتیو بوئن قرار گرفت. آبیگری با درجات افزایش یابنده الکل، نفوذ پارافین و قالبگیری انجام و سپس به ضخامت $5-7$ میکرون قطع زده و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی گردید. مطالعات بافتی با میکروسکوپ نوری (Nikon, YS100, Japan) با درشت‌نمایی‌های مختلف صورت گرفت و عکسبرداری از اسلایدهای بافتی با میکروسکوپ (Olympus, BX-51, Japan) و دوربین دیجیتالی (DP-70, Japan) انجام گرفت.

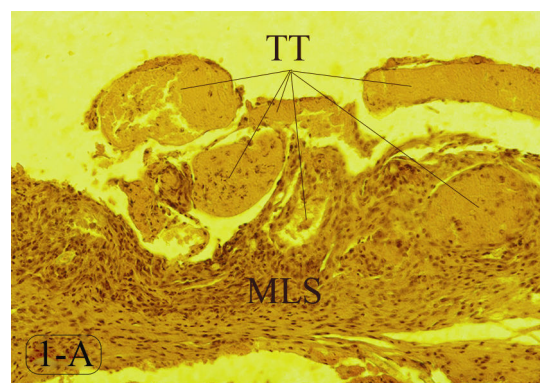
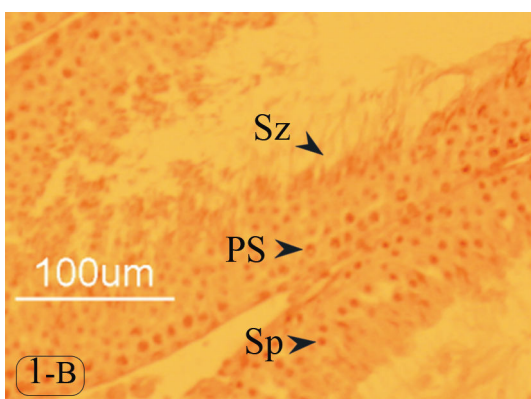
یافته‌ها

مطالعات بافتی قبل از انجماد نشان داد که قطعات بررسی شده دارای لوله‌های سمینفروس با نمای طبیعی و سلولهای اسپرماتوگونی A (تیره‌تر) در نزدیک به غشای پایه و اسپرماتوگونی B (روشن‌تر) در نزدیک به لومن هستند و هیچ‌گونه ساختار اسپرم بالغ در این لوله‌های سمینفروس دیده نشد و این ساختار با سن موش و گزارشهای قبلی مطابقت دارد. مطالعات بافتی بر روی بیضه دیگر حیوان که هنگام پیوند شدن خارج می‌گردید، نشان داد که بیضه دارای لوله‌های سمینفروس با ابعاد و شکل طبیعی و تمام رده‌های سلولی از اسپرماتوگونیا تا اسپرماتوزوئید بالغ می‌باشد. نمای تازکهای اسپرمی در داخل لوله سمینفروس مؤید بالغ بودن این حیوانات در هنگام پیوند می‌باشد. بافت بینابینی توسعه یافته در مقایسه با بافت بیضه نابالغ مشاهده شد.



نمودار ۱. سنجش حیاتی سلولهای بیضه‌ای منجمد- ذوب شده با پروتکل‌های مختلف و ضدیخ‌های مختلف با رنگ حیاتی تریپان بلو و محاسبه درصد سلولهای سالم (P < 0.02)

شکل ۱. فتومیکروگراف میکروسکوپی نوری بافت بیضه پیوند شده زیر پوست (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین).



(1-B) مقطعی از بافت بیضه پیوند شده زیر پوست و بیوپسی شده پس از ۶ هفته (×۲۰۰)

PS: Primary Spermatocyte Sp: Spermatid Sz: Spermatozoa

(1-A) بافت بیضه در مجاورت بافت پیوندی و عضلانی پوست (×۱۰۰)

TT: Testicular Tissues MLS: Muscle Layer of Skin

شیشه‌ای در این تحقیق با این جمله که انجماد شیشه‌ای می‌تواند بسیار مورد قبول تر از انجماد آهسته باشد (۳۸) متفاوت است. ممکن است این جمله در مورد انجماد سوسپانسیون سلولی و تخمک و یا جنین مناسب باشد، اما در مورد بافت بیضه صادق نیست. نمونه‌ها در روش انجماد آهسته کنترل نشده کوتاه مدت که روی بخار نیتروژن به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس در نیتروژن مایع قرار داده شدند، پس از ذوب، توان زیستی (viability) بالایی داشتند. در این روش، انجماد بافتها با استفاده از ضدیخ DMSO بالاترین درصد سلولهای سالم را پس از انجماد- ذوب در میان تمام گروههای آزمایشی نشان داد. در مطالعه‌ای که توسط Keros و همکاران (۲۰۰۵) صورت گرفت، DMSO به خاطر داشتن وزن مولکولی کم و قابلیت نفوذ آن، بهترین ضدیخ برای انجماد بافت بیضه معرفی شد که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. انتخاب صحیح ضدیخ و غلظت آن می‌تواند تأثیر زیادی در افزایش تعداد سلولهای سالم پس از روند انجماد- ذوب داشته باشد. بنا براین روش انجماد آهسته کنترل نشده کوتاه مدت با استفاده از ضدیخ DMSO با توجه به نتایج این تحقیق و نتایج حاصل از تحقیق دیگر پژوهشگران برای انجماد بافت بیضه می‌تواند بسیار مناسب باشد. تحقیقات بیشتری در این زمینه جهت اخذ نتیجه بهتر، مورد نیاز است.

با توجه به این که تحقیقات نشان می‌دهد که مدت زمان ذوب کردن بهتر است کوتاه باشد (۳۳) لذا، در این تحقیق از روش ذوب سریع (استفاده از حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد) استفاده شد، اما باب تحقیق بیشتر در زمینه ذوب نیز وجود دارد. قطعات بیضه‌ای که با روش انجماد آهسته طولانی مدت منجمد شده بودند، پس از ذوب توان زیستی بسیار پایینی داشتند و لذا این قطعات به دلیل داشتن تعداد زیاد سلولهای آسیب دیده، پیوند نشدند و قطعات بیضه‌ای که با روش انجماد آهسته کوتاه مدت و انجماد شیشه‌ای منجمد شده بودند و پس از ذوب، توان زیستی بالایی داشتند، پیوند شدند. تعدادی از پیوندها به دلایل نامعلوم یک تا دو هفته بعد از پیوند دژنره شده، از بین می‌رفتند. دلایل متعددی از جمله عدم برقراری ارتباط تغذیه‌ای و توسعه رگهای خونی، فعال شدن سیستم ایمنی، شرایط محیط پیوند، آلودگی حین پیوند و بعد از آن،

می‌دهد که نسج بیضه در این قطعات به صورت نامنظم وجود دارد و لوله‌های سمینفروس در بعضی از بافتها به صورت نامنظم و درهم ریخته دیده می‌شود (شکل ۱-A) و در بعضی از پیوندها شکل منظم‌تری به خود گرفته، دارای لومن بوده و تمام رده‌های سلولهای اسپرما توژنیک نیز در آن دیده می‌شود که بیانگر وجود اسپرم و بلوغ در این پیوندها می‌باشد (شکل ۱-B).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که انجماد آهسته کوتاه مدت بافت بیضه نابالغ، کارآمدتر از روش انجماد آهسته طولانی مدت و انجماد شیشه‌ای است. در روش انجماد آهسته کنترل نشده طولانی مدت، به علت افزایش بیش از اندازه زمان آبیگری و سرعت پایین سرد شدن نمونه (قرار دادن در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت و بعد انتقال به نیتروژن مایع)، سلولها پس از ذوب توان زیستی بسیار پایینی داشتند. افزایش غلظت محلول درون سلولی و برون سلولی به علت افزایش زمان آبیگری (۳۳، ۳۴)، آسیب غشایی سلولها (لیپیدهای غشاء) و نشت مواد از سلول و شکسته شدن ارتباطات بین سلولی سلولهای منجمد شده با این روش می‌تواند علت توان زیستی (viability) بسیار پایین این سلولها پس از ذوب را توجیه نماید. (۳۳، ۳۵-۳۷) بنابراین روش انجماد آهسته کنترل نشده طولانی مدت برای انجماد بافت بیضه مناسب نمی‌باشد. در روش انجماد شیشه‌ای، تفاوت میانگین درصد سلولهای سالم پس از انجماد-ذوب با استفاده از ضدیخهای EG و DMSO معنی‌دار نیست. میانگین درصد سلولهای سالم پس از ذوب در این روش نسبت به روش انجماد آهسته کنترل نشده طولانی مدت بیشتر است اما در مقایسه با روش انجماد آهسته کنترل نشده کوتاه مدت به خصوص با به کارگیری ضدیخ DMSO پایین‌تر است. احتمالاً کوتاه بودن زمان آبیگری و عدم وجود فرصت کافی جهت نفوذ ضدیخ و تشکیل بلورهای یخ در زمان ذوب، موجب آسیب غشایی و نفوذ محلول خارج سلولی به درون سلول می‌شود که می‌تواند علت نقص نسبی انجماد شیشه‌ای در مقایسه با انجماد آهسته کنترل نشده کوتاه مدت باشد. نتیجه حاصل از انجماد بافت بیضه با روش انجماد

از آن در روشهای کمک تولید مثلی می‌تواند بهترین راهکار در این رابطه باشد. در حال حاضر، این روش با توجه به عدم وجود دانش کافی در این زمینه عملی نیست، اما امید است با تحقیقات بیشتر در این زمینه، این روش عملی گردد.

نتیجه‌گیری . نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که درصد سلولهای سالم بافت بیضه منجمد شده با روش انجماد آهسته کوتاه مدت نسبت به روشهای دیگر بیشتر است و استفاده از ضدیخ DMSO در این روش انجماد، نسبت به ضدیخهای دیگر نتیجه بهتری را به همراه دارد. با انجماد بافت بیضه موش نابالغ و ذوب و پیوند آن بعد از بلوغ به صورت قطعات بافتی می‌توان به اسپرماتوزوئید کامل دست یافت. با بررسیهای بیشتر در انسان، این روش شاید کمکی در جهت حفظ توان تولید مثلی پسران نابالغ مبتلا به سرطان در طی روند درمان باشد.

تقدیر و تشکر . کلیه هزینه‌های مصرفی و غیر مصرفی این تحقیق بر اساس قرارداد شماره ۸۳/۱۶۵۷۵/۸۳ پر مورخ ۸۳/۹/۱۴ توسط پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی پرداخت شده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین محترم و پرسنل و کارشناسان پژوهشکده رویان ابراز می‌دارند.

وضعیت حیوان و عوامل ناشناخته دیگر می‌تواند در این مسأله مؤثر باشد. عدم وجود تفاوت معنی‌دار در رد یا پذیرش پیوند در بین گروههای پیوند شده می‌تواند مبین این مسأله باشد که نوع انجماد عامل مؤثری در رد یا پذیرش پیوند نبوده است. بررسی‌های بیشتر در این زمینه جهت دستیابی به پیوند با درصد موفقیت بالاتر مورد نیاز است. ۲۳ درصد پیوندها موفقیت آمیز بوده، اسپرماتوزوئید کامل در آن ایجاد شد (شکل B-۱). اگرچه این روش جهت باروری طبیعی کافی نیست، اما وجود روشهای پیشرفته کمک تولید مثلی و نیاز به تعداد اندک اسپرماتوزوئید در روش ICSI، امکان باروری را افزایش می‌دهد. این روش با بررسیهای بیشتر در پسران نابالغ مبتلا به سرطان می‌تواند به کار گرفته شود و قبل از شروع شیمی درمانی یا اشعه درمانی، بافت بیضه را منجمد و پس از درمان، بافت بیضه منجمد شده را ذوب و به صورت اتولوگ پیوند زد و به اسپرماتوزوئید دست یافت و از آن در روشهای کمک تولید مثلی (ART) استفاده نمود. اما باید در نظر داشت که با پیوند مجدد بافت حاوی سلولهای سرطانی به فرد ممکن است موجب ابتلای مجدد فرد به سرطان شویم. از طرف دیگر پیوند این بافتهای سرطانی به افراد دیگر غیر اخلاقی است. کشت آزمایشگاهی بافت بیضه منجمد - ذوب شده و دست یابی به اسپرماتوزوئید و استفاده

References

1. Tournaye H, Goossens E, Verheyen G, Fredericks V, Block GD, Devroey P, Steirteghem AV. Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. *Hum Reprod Update* 2004; 10(6), 525-523.
2. Schrader M, Muller M, Straub B, Miller K. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspect. *Reprod Toxicol* 2001; 15: 611-617.
3. Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod* 2005.
4. Huyghe E, Matsuda T, Daudin M, Chevreau C, Bachaud JM, Plante P, Bujan L, Thonneau P. Fertility after testicular cancer treatments: results of a large multicenter study. *Cancer* 2004; 100: 732- 737.
5. Hawkins MM, Stevens MCG. The long term survivors. *Br Med Bull* 1996; 52: 898-923.
6. Bleyer Wa. The impact of childhood cancer on the United States and the world. *CA Cancer J Clin* 1990; 40(6): 355-67.
7. Bahadur G, Chatterjee R, Ralph D. Testicular tissue cryopreservation in boys. Ethical and legal issues. *Hum Reprod* 2000; 15: 1416-1420.
8. Sanger Ws, Armitage JO, Schmidt MA. Feasibility of semen cryopreservation in patient with malignant iseases. *Am Med Assoc* 1980; 244:789-790.
9. Chen Su, Ho HN, Chen HF, Huang SC, Lee TY, Yang YS. Pregnancy achieved by ntracytoplasmic sperm injection using cryopreserved semen from a man with testicular cancer. *Hum Reprod* 1996; 11:2645- 2647.
10. Hallak J, Sharma RK, Thomas AJ, Agrawa A. Why cancer patients request disposal of cryopreserved semsen specimens post-therapy: a retrospective study. *Fertil Steril* 1998; 69: 889-893.
11. Lass A, Akagbosu F, Abusheikha N, Hassouneh M, Blayney M, Avery S, Brinsden P. A program of semen cryopreservation for patients with malignant disease in a tertiary infertility centre: lessons from 8 years' experience. *Hum Reprod* 1998; 13(11): 3256-61.
12. Naysmith TE, Blake DA, Harvey VJ, Johnson NP. Do men undergoing sterilizing cancer treatments have a fertile future? *Hum Reprod* 1998; 13(11): 3250-5.
13. Tournay H. Storing reproduction for oncological patients. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 27:133-136. Review.
14. Ginsburg ES, Yanushpolsky EH, Jakson KV. In vitro fertilization for cancer patients and survivors. *Fertil steril* 2000; 75:705-710.
15. Horne G, Atkinson A, Brison DR, Radford J, Yin JA, Edi-Osagie EC, Pease EH, Lieberman BA. Achieving pregnancy against the odds: successful implantation of frozen-Thawed embryos generated by ICSI using spermatozoa bancked prior to chemo-radiotherapy for Hodgkin's disease and acute leukemia. *Hum Reprod* 2001; 16:107-109.
16. Muller J, Soksen J, Sommer P, Schmiegelow M, Petersen PM, Heilman C, Schmiegelow K.

- Cryopreservation of semen from pubertal boys with cancer. *Med Pediatr Oncol* 2000; 34(3): 191-4.
17. Lass A, Akagbosu F, Abusheikha N, Hassounch M, Blayney M, Avery S, Brinsden P. A program of semen cryopreservation for patients with malignant disease in a tertiary infertility centre: lessons from 8 years' experience. *Hum Reprod* 1998; 7:3256-61.
18. Hovatta O. Cryobiology of ovary and testicular tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17:331- 342.
19. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11298- 302.
20. Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, et al. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Hum Reprod* 2002; 17(12): 3039- 45.
21. Schllat S, Honarammoz A, Boiani M, Scholer HR, Dobrinski I. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes. *Biol Reprod* 2003; 68:2331- 5.
22. Brook PF, Radford JA, Shalet SM, Joyce AD, Gosden RG. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril* 2001; 75: 269-274.
23. Meistrich ML, Van Beek ME. Spermatogonial stem cells. In Desjardins C and Ewing LL (eds) *cell and molec. Biol of the testis*. Oxford University Press, New York, PP: 266-295.
24. De Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 694-701.
25. Hovatta O. Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. *Hum Reprod Update*. 2001; 7(4): 378-383.
26. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med* 2000; 6: 29-34.
27. Nagano M, Mc Carrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testis. *Biol Reprod* 2001; 64: 1409-16.
28. Meistrich ML. Hormonal stimulation of the recovery of spermatogenesis following chemo- or radiotherapy. *Acta Pathol Microsc Immunol Scand* 1998; 106: 37-45.
29. Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update* 2000; 7: 363-369.
30. Dafopoulos K. Factors affecting outcome after ICSI with spermatozoa retrieved from cryopreserved testicular tissue in non-obstructive azospermia. *Hum Reprod* 2005; 10(4): 455-460.
31. Chen Su, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod* 2001; 16(11): 2350- 6.
32. Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pig. *Biol Reprod* 2002; 66(1): 21- 28.
33. Frederickx V, Michiels A, Goossens E, De Block G, Van Steiteghem AC, Tournaye H. Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen- thawed mouse germ cells. *Hum Reprod*.

2004; 19(4): 948- 53.

34. Mazur P. Cryobiology: The freezing of biological systems. Science 1970; 168: 939-949.

35. Mazur P, Rigopoulos N. Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes influence of warming rate. Cryobiology 1983; 274-89.

36. Lovelock JE. The hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. Biochim Biophys Acta 1953; 10:414-26.

37. Lovelock JE. The mechanism of the protective effect of glycerol against hemolysis by freezing and thawing. Biochim Biophys Acta 1953; 11: 28-36.

38. Kuleshova L, Lopota A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. Fertil Steril 2002; 78 (3).