مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
سال یازدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۲،ص:۳

انـجـماد تـخمدان

دکتر مژده صالح‌نیا*

چکیده

امروزه محققین به دنبال روشهای مناسبی جهت حفظ قدرت باروری افراد هستند. از جمله این روشها انجماد گامتها و جنین بافت تخمدان است .مهمترین دلایل بکارگیری انجماد تخمدان در مقایسه با انجماد تخمک، مربوط به وجود تعدادزیادی فولیکول در مراحل مختلف تکوینی است که می‌توان به دفعات در سیکل‌های متوالی از آن استفاده نمود که‌این امر در درمان ناباروری و یا در بیماران مبتلا به سرطان که تحت درمان با رادیوتراپی یا شیمی درمانی هستند و پس‌از درمان می‌خواهند به زندگی طبیعی خود برگردند اهمیت بسزایی دارد.اولین گزارش مربوط به انجماد بافت تخمدان خرگوش بود که در دهه ۱۹۵۰منتشر شد و اولین گزارش انجماد بافت تخمدان انسان در سال ۱۹۹۵ مطرح شد. هم اکنون این روش به وسیله‌محققین به عنوان روشی برای بهبود باروری در دست تحقیق است .سه روش عمده در انجماد تخمدان مطرح است :روش آهسته، شیشه‌ای و فوق سریع در هر سه روش محققین تلاش‌می‌کنند با کاستن از میزان تشکیل کریستال یخ داخل و خارج سلولی طی انجماد و ذوب، قدرت حیاتی بافت را افزایش دهند .دو فاکتور اساسی در این امر دخالت دارد یکی استفاده از ضدیخ که باعث خروج سریع آب داخل‌سلولی می‌شود و دیگری سرعت انجماد که برای هر سلول و بافت متفاوت است و بستگی به نفوذپذیری غشاء، نسبت سطح به حجم سلول و درجه حرارت دارد.جهت تکوین فولیکولهای بافت تخمدان منجمد شده روشهای گوناگونی توسط محققین مطرح و بکار گرفته شده‌است از جمله پیوند و یا کشت فولیکولهای ایزوله شده در In vitro و در محیطهای اختصاصی است.

مقدمه

امروزه محققین به دنبال روشهای مناسبی جهت نگهداری گامت و جنین جانوران هستند. از جمله این روشها انجمادبافت تخمدان است .مهمترین دلایل بکارگیری انجماد تخمدان در مقایسه با انجماد تخمک، مربوط به وجود تعدادزیادی فولیکول در مراحل مختلف تکوینی است که می‌توان به دفعات در سیکل‌های متوالی از آن استفاده نمود که‌این امر در درمان ناباروری و یا در بیماران مبتلا به سرطان که‌تحت درمان با رادیوتراپی یا شیمی درمانی هستند و پس‌ازدرمان می‌خواهند به زندگی طبیعی خود برگردند اهمیت بسزایی دارد[۱].

با توجه به اینکه در بیشتر موارد زمان لازم جهت تهیه تعداد مناسب تخمک برای انجماد وجود ندارد و یا تحریک تخمک‌گذاری به علت سندرم هیپراستیمولاسیون امکان‌پذیر نیست، لذا قبل از شیمی درمانی یا رادیوتراپی لازم است بافت تخمدان از بدن فرد بیمار خارج و منجمد شده تا در شرایط مناسب مجدداً به بدن فرد برگردانده شود که انتظار می‌رود پس از مدت کوتاهی دوباره تخمدان فعالیت نرمال خود را بازیابد و با از سرگیری فعالیت تخمدان‌های‌منجمد شده[۲]، علاوه بر بلوغ و تکوین فولیکول‌ها و تخمک، هورمونهای استروئیدی تخمدانی نیز ساخته شوند که‌می‌توان از این مورد اخیر در درمان بیمارانی که نیاز به هورمون درمانی دارند مثل منوپوز زودرس استفاده نمود[۳]. علاوه براین انجماد تخمدان می‌تواند برای بقای نسل و حفظ و تکثیر گونه‌های کمیاب جانوران[٤] از اهمیت

*استادیار گروه علوم تشریحی ـ دانشکده پزشکی
دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران

Archive
www.SID.ir

خاصی‌برخوردار باشد [٥]. از آنجا که بافت تخمدان حاوی تعداد فراوانی تخمک نابالغ بوده و این تخمکها حساسیت کمتری نسبت به تغییرات برودتی و حرارتی دارند، بنابراین استفاده از روش انجماد تخمدان در مقایسه با انجماد تخمک بالغ، روش پذیرفته‌تر و مناسب‌تر به نظر می‌رسد [٦].

علاوه براین انجماد تخمک و جنین در پروتکل‌هایIVF ، هزینه‌بر بوده و نسبت درصد موفقیت کمی داشته وشانس تولد در انتقال جنین‌های منجمد و ذوب شده تقریباً ١١٪ گزارش شده است [٧]، در حالی که انجماد بافت تخمدان‌می‌تواند با دارا بودن تعداد زیادی فولیکول در مراحل تکوینی مختلف، پتانسیل باروری بالایی را در بافت تخمدان‌منجمد شده حفظ کند.

انجماد بافت تخمدان برای اولین بار در دهه ١٩٥٠ توسط Deanselyو همکارانش مطرح شد [٨]. در سال ١٩٦٠، Parrot اولین گزارش در خصوص تولد نوزاد موش حاصل از پیوند بافت تخمدان منجمد شده را منتشر کرد [٩].انجمادبافت تخمدان گوسفند نیز برای اولین بار توسط Gosden در سال ١٩٩٤ منتشر شد [١٠]و هم اکنون این روش به وسیله‌محققین به عنوان روشی برای بهبود باروری در دست تحقیق است [١١و١٢].انجماد بافت تخمدان در انسان توسط Zhang در سال ١٩٩٥ مطرح شد [١٣].

مزایای انجماد بافت تخمدان

١- تهیه بافت تخمدان آسان بوده وبالغ بودن آن در زمان جمع‌آوری اهمیت زیادی ندارد و به نظر می‌رسد که‌تخمدان‌های نابالغ که حاوی تعداد زیادی فولیکول بدوی(Priomordial Follicle) بوده و می‌توانند در سیکلهای متوالی به رشد و تولیدتخمک بالغ ادامه دهند مناسب‌تر باشد.

٢- بافت تخمدان را می‌توان بدون اینکه آسیبی به آن وارد شود، در یخ به مدت بیشتر از ٢٤ ساعت نگهداری نمود.

٣- با توجه به مقاومتی که بافت تخمدان در برابر انجماد از خود نشان می‌دهد، یک دستورالعمل واحد را می‌توان‌برای انجماد تخمدان در تمام گونه‌ها مورد استفاده قرار داد.

٤- در مقایسه با انجماد جنین، در هنگام جمع‌آوری نمونه‌ی تخمدان نیازی به باروری نیست به عبارت دیگر نیازی به حضورسلول‌های جنسی نر در همان زمان نمی‌باشد لذا از نظر اخلاقی و حقوقی اهمیت پیدا می‌کند.

٥- گیرنده بافت تخمدان می‌تواند در هر سن و در هر مرحله از سیکل باشد.

٦- بافت برای مدت طولانی می‌تواند قدرت باروری داشته باشد.

٧- پس از پیوند، بافت می‌تواند فعالیت هورمون سازی خود را از سر بگیرد و از این جهت در درمان بیمارانی که دچارنقص هورمونی هستند بکار گرفته می شود.

معایب انجماد بافت تخمدان

١- اساس تخمکها به عنوان فولیکول‌های بدوی و در حال استراحت هستند که ممکن است مدت زمان طولانی(ماهها) صرف بالغ شدن فولیکول‌ها شود.

٢ - بافت، حامل آنتی‌ژنهای سازگار نسجی است که باعث برانگیختن پاسخ ایمنی فرد گیرنده می‌شود، لذا بدین منظورباید تدابیری اندیشید تا از بروز واکنش دفاعی میزبان کاسته شود.

٣ - پس از عمل پیوند، بیماری یا عفونت‌های ویروسی به راحتی قابل انتقال به فرد گیرنده می‌باشد.

روشهای انجماد بافت تخمدان

سه روش عمده در انجماد تخمدان مطرح است :روش آهسته، شیشه‌ای و فوق سریع .در هر سه روش محققین تلاش‌می‌کنند با کاستن از میزان تشکیل کریستال یخ داخل و خارج سلولی طی انجماد و ذوب، قدرت حیاتی بافت راافزایش دهند .دو فاکتور اساسی در این امر دخالت دارد: یکی استفاده از ضدیخ که باعث خروج سریع آب داخل‌سلولی می‌شود و دیگری سرعت انجماد که برای هر سلول و بافت متفاوت است و بستگی به نفوذپذیری غشا، نسبت‌سطح به حجم سلول و درجه حرارت دارد.

در روش انجماد آهسته ضدیخ‌های نفوذپذیر با غلظتی در حدود ١/٥مول به کار گرفته می‌شوند [١٤]بنابراین لازم‌است سرعت انجماد به گونه‌ای تنظیم گردد که فرصت لازم برای خروج آب از سلول و بافت در اختیار آن قرارگیرد.

امروزه جهت ساده کردن روش انجماد از انجماد شیشه‌ای استفاده می‌کنند [١٥].در این روش به علت استفاده ازغلظت بالای ضدیخ (حدود ٤٠ ٪) و کوتاهی زمان آب‌گیری (زمان تعادل) آب بسرعت از سلول خارج شده و در حین انجماد، محیط اطراف

Archive of SID
www.SID.ir

سلول به یکباره تبدیل به شیشه می‌شود[۱۶].در انجماد شیشه‌ای دو نکته حایز اهمیت است: انتخاب ضدیخ و غلظت مناسب آن. انتخاب این دو فاکتور باید به‌گونه‌ای باشد که اولاً کریستال یخ داخل و خارج‌سلول شکل نگیرد و ثانیاً غلظت به‌کار گرفته شده برای سلول کشنده نباشد .محلولهای انجماد شیشه‌ای معمولاً حاوی‌ضدیخ‌های نفوذپذیر (مثل گلیسرول، اتیلن گلیکول، ۱ و ۲ پروپاندیول)، دی ساکاریدهای کوچک (مثل ساکارز،تری‌هالز، گلوکز) و ماکرومولکولها (مثل پروپیلن گلیکول، فیکول ۷۰، آلبومین سرم گاوی) هستند[۱۷].

در روش فوق سریع غلظت ضد یخ به کار گرفته شده مشابه با روش انجماد آهسته است ولی سرعت انجماد بسیار بالابوده مشابه با انجماد شیشه‌ای[۱۳].

فاکتورهای مؤثر در بروز تغییرات بافت تخمدان طی انجماد و ذوب

نکته حایز اهمیت در انجماد بافت تخمدان و میزان زنده‌ماندن فولیکول‌ها مربوط به محل قرارگرفتن آنها در تخمدان‌است، فولیکول‌های اولیه و بدوی در نقاط سطحی‌تر تخمدان و فولیکول‌های ثانویه و آنترال در مناطق‌عمقی‌تر قرار گرفته اند، بنابراین میزان نفوذ و خروج ضد یخ طی مراحل انجماد و ذوب به فولیکول‌های بدوی و اولیه سرعت‌بیشتری داشته ولی در فولیکول‌هایی که در عمق تخمدان واقع شده‌اند سرعت کمتری دارد، بنابراین عواملی از جمله‌ناتوانایی نفوذ ضدیخ به مرکز بافت و تشکیل کریستال یخ و بروز مشکلات اسمزی در طی مراحل برودت و یا گرم‌شدن‌می‌تواند در بروز تغییرات مرفولوژی فولیکول‌های آنترال و پری‌آنترال مؤثر باشد[۱۸]. همچنین تعداد لایه‌های‌سلول‌های فولیکولر نیز می‌تواند در این امر مؤثر باشد. هرچه تعداد سلول‌های فولیکولر بیشتر باشد، قادر به ممانعت بیشتر در برابر نفوذ و یا خروج ضدیخ می‌باشند. در بسیاری از نتایج به دست آمده از محققین، این فرضیات بیشترتأیید می‌شود. به عنوان مثال Gosden [۱۹]در سال ۱۹۹۴و Carroll [۲۰] در سال ۱۹۹۰ نشان دادند که ۸۰ درصد ازفولیکول‌های بدوی و ۷۸ درصد از فولیکول‌های اولیه، پس از انجماد و ذوب سالم ماندند. این در حالی است که‌گزارشاتی وجود دارد که پس از انجماد و ذوب بافت تخمدان، تعدادی از فولیکول‌های ثانویه و آنترال پس از گذشت‌چندین روز دچار آترزی و مرگ سلولی شدند[۲۱،۲۳].

محل قرار گرفتن و اندازه فولیکول‌های درون بافت تخمدان می‌تواند بر میزان نفوذ ضد یخ تأثیر بگذارد. عواملی از جمله‌عدم نفوذ ضدیخ به مرکز بافت و نقص در حرکت آب داخل سلولی طی سرد و گرم شدن و اشکالات خروج ضدیخ‌پس از ذوب را می‌توان در بروز تغییرات مرفولوژی فولیکول‌ها مؤثر دانست.

از طرف دیگر، قدرت نفوذ سلول می‌تواندبا رشد فولیکول‌ها تغییر کند. به عنوان مثال با افزایش لایه‌های سلولی گرانولوزا و لایه تکا، ارتباطات سلولی پیچیده‌ترمی‌شوند.

به نظر می‌رسد که فولیکول‌ها قادر نیستند به اندازه‌ی طبیعی خود قبل از تخمک‌گذاری برسند[۲۴] و این ممکن است به‌علت نقص عروقی در محل پیوند باشد [۲۵].

تکوین فولیکولها پس از انجماد و ذوب

جهت تکوین فولیکولهای بافت تخمدان منجمد شده روشهای گوناگونی توسط محققین مطرح و بکار گرفته شده‌است:

۱- پیوند بافت: به عبارتی مطالعه به شکل In vivo به صورت‌های مختلف نظیر: ایزو[۹،۱۰،۲۶]، گزنو[۲۷،۲۹]، هموهتروگرافت[۳۰] و یا پیوند به جانور با نقص در سیستم ایمنی[۱۹] صورت گرفته است .پیوند بافت تخمدان منجمدشده یکی از روشهای بررسی میزان زنده ماندن وتکوین فولیکول‌ها در درازمدت است .البته یکی دیگر از اهداف موردتوجه محققین پس از پیوند، از سرگیری فعالیت اندوکرین بافت تخمدان به منظور تأمین نیاز سیکلیک بدن می باشد.

گزارش شده است که درصد فولیکول‌ها پس از پیوند در تخمدان‌های منجمد شده و یا نشده (کنترل) کاهش زیادی پیداکرده است. Candy و همکارانش اشاره داشتند که گرچه پس از ذوب بافت تخمدان منجمد شده موش با روش آهسته و بابکارگیری ضد یخ DMSO ، بیش از ۸۰ درصد از فولیکول‌ها زنده بودند اما پس از پیوند نمونه‌های کنترل و انجمادی درصدزیادی از فولیکول‌ها (بیش از ۵۰ درصد) تحلیل رفتند [۳۱].

Archive of SID

www.SID.ir

Gosden و همکارانش [١٠] نیز در گزارش سال ١٩٩٤ خود اعلام کردند که پس از انجماد بافت تخمدان گوسفند تعدادفولیکول‌های اولیه در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت .این درحالی است که Sztein پس از پیوند ارتوتوپیک بافت تخمدان منجمد شده‌ی گونه‌های موش و گوسفند تولد نوزادان آنها را گزارش داده است اما بهرحال‌تعداد بچه‌های حاصله بسیار کم بوده است و حتی پس از گذشت مدت طولانی، قدرت باروری میزبان پیوند کاهش‌یافته است [٣٢].

Van Den Broecke با انجماد بافت تخمدان انسان و پیوند آن به بدن موش دارای نقص ایمنی و با تزریق روزانهFSH مشخص کرد که درصد شکل گیری فولیکولهای آنترال بسیار کم اتفاق می‌افتد اما وقوع فولیکولهای اولیه و ثانویه درگروههای تحریک شده بیشتر است [٣٣]. نتایج حاصله از تحقیق Salehniaنشان داده است که پس از پیوند اتوگرافت تخمدان‌های بالغ منجمد شده موش با ضد یخ اتیلن گلیکول (٤٠٪) گرچه اکثریت فولیکول‌های بزرگ (پره‌آنترال، آنترال) چند روز پس از گذشت پیوند تحلیل رفته ولی در مجموع از تعداد فولیکول‌ها کاسته شد ولی فولیکول‌های بدوی و اولیه سالم و طبیعی که دارای اووسیت در مرحله ژرمینال وزیکول بودند قابل مشاهده‌بودند [٣٤].

شاید یکی از اصلی‌ترین علل تحلیل فولیکول‌ها پس از پیوند، ایسکمی بافت و عدم خون رسانی مناسب آن باشد چراکه پس از پیوند، تشکیل مجدد عروق خونی (Revascularisation) و ارتباطات عروق خونی از اهمیت خاصی برخوردارمی‌باشد و سعی می‌شود بافت را به محل پرخون‌تری مثل زیر کپسول کلیه منتقل نمایند .علاوه بر این فاکتورهای‌دیگری مثل سن دهنده‌ی بافت تخمدان، مقدار بافت تخمدان و حتی‌گونه‌ی جانور دهنده و میزبان نیز می‌تواند تأثیربسزایی در موفقیت پیوند داشته باشد.[١١]

با توجه به اینکه فولیکولهای ثانویه جهت تکوین خود نیاز به تحریک هورمونFSH دارند و گیرنده‌ی مربوط به این‌هورمون را طی مراحل رشدی به میزان مناسب کسب می‌کنند یا به عبارتی تکوین این فولیکولها وابسته به هورمون است [٣٥]، بسیاری از محققین سعی کرده‌اند با افزودن اگزوژنوس این هورمونها شرایط تکوین را بهتر نمایند ولی نتایج‌متفاوتی تا به حال بدست آمده است [٢٩،٣٦،٣٩].در تحقیقی که توسط Weissman و همکارانش انجام گرفت، بعد از پیوند زیرجلدی قشر تخمدان انسان به موش NODSCID، پتانسیل رشد فولیکول‌های بدوی حفظ شده و بعد از تحریک گنادوتروپین‌ها توانایی رشد و تشکیل فولیکول‌های آنترال در آنها مشاهده شد [٤٠].

Oktay در گزارش سال ٢٠٠٠ خود نشان داد که با بکارگیری FSH در مورد موشهایی که تخمدان منجمد نشده به‌آنهاپیوند شده بود رشد فولیکولها تا مرحله آنترال القا شد ولی در صورت عدم استعمال FSH فولیکولها تا مرحله پری‌آنترال بیشتر رشد نکردند [٢٩]. Gook نشان داد که اگر ٣٦ هفته پس از پیوند تخمدان منجمد شده به زیر کپسول‌کلیه موش دارای نقص ایمنی که هر دو تخمدانش خارج شده HCG تزریق شود، هیچ اختلافی در رشد فولیکولی یا نمای بافتی بین تخمدان‌های تازه پیوند شده پس از انجماد یا کنترلی که گنادوتروپین دریافت کرده بود رؤیت‌نشد [٣٦].

این در حالی است که Salehnia در گزارش خود نشان داد که با تزریق روزانه هورمون HMG به موشهایی که پیوندتخمدان منجمد شده داشتند نمای کلی بافت پس از گذشت یک یا دو سیکل، مشابه با گروه انجمادی و پیوندی بود که‌هیچ هورمونی دریافت نکرده بود به عبارتی HMG تأثیر مناسب بر تکوین فولیکولهای ثانویه نداشت [٣٧].

در گزارشات قبلی رشد فولیکول‌های نرمال و تخمک‌گذاری در پیوند هتروتوپیک بافت تخمدان منجمد و ذوب شده اعلام شد [٣٨]، ولی در تحقیقی که توسط Harlow [٢٤] در سال ١٩٨٨ انجام گرفت به نظر رسید که فولیکول‌ها قادرنیستند به اندازه طبیعی خود قبل از تخمک‌گذاری برسند و این ممکن است براثر فشارفیزیکی تحمیل شده به وسیله کپسول کلیه یا نقص عروقی در محل پیوند و یا عدم دریافت کامل و مناسب گنادوتروپین‌های‌محرک باشد. بنابراین فقدان گنادوتروپین‌ها می‌تواند باعث آترزی در فولیکول‌های پیش ازتخمک‌گذاری شده باشد. Wangدر مطالعه سال ٢٠٠٢ خود نشان داد که

Archive of SID

www.SID.ir

بکارگیری HMG قبل از پیوند بافت تخمدان‌منجمد شده موش درصد زنده ماندن و رشد فولیکولها را بهبود می‌بخشد [۴۱].
همچنین استفاده از آنتی اکسیدانها مثل آلفاتوکوفورول جهت بقای فولیکولها مطرح شده است [۲۵].

۲- کشت فولیکولهای ایزوله شده: می‌توان فولیکولها را در In vitro و در محیطهای اختصاصی با توجه به‌اندازه فولیکولها و نیز گونه مورد مطالعه کشت داد .در محیط کشت ترکیباتی مثل FSH, LH, ILGF, EGF, GM-CSF بکار گرفته شده است [۲۳،۳۹،۴۶].

اساس تجربیات برای بلوغ تخمکهای انسان در In vitro از ۶۵ سال پیش پایه‌گذاری شد .در تحقیقات انجام شده برروی حیوانات ثابت شد که تخمکهای خرگوش در مرحله ژرمینال وزیکول قادرند در In vitro رشد کرده و بالغ شوند [۴۳]. همچنین رشد فولیکول‌های بدوی موش در In vitro به طور موفق انجام گرفت که منجر به تولد موجود زنده‌شد [۴۷]. با کشت فولیکول‌های پری آنترال جدا شده‌ی گاو در نمونه‌های منجمد و غیرمنجمد شده به مدت بیشتر از ۴ هفته نتایج خوبی به دست آمد به طوری‌که حفره‌ی آنترال شکل گرفته و تخمک رشد کرده و فعالیت آنزیم آروماتازاستروژنیک تقریباً در ۲۰ درصد از این فولیکول‌هادیده شد [۴۸]. تأثیرات متقابل فیزیکی و متابولیکی سلول‌های‌گرانولوزا و تخمک باید در محیط کشت حفظ شود تا فولیکولهایی که فاقد عروق خونی هستند، به خوبی قادر به رشدباشد، لذا باید از مهاجرت سلول‌های گرانولوزا و دور شدن آنها از تخمک جلوگیری کرد. تخمکهای نابالغ بدون حضورسلول‌های گرانولوزا فقط برای چند روز در محیط کشت، پتانسیل رشد خود را حفظ کرده و در حضور مواد غذایی قادر به رشد می‌باشند، در نتیجه وابستگی متقابل تخمک و سلول‌های گرانولوزا برای حفظ رشد نرمال در بلوغ تخمک‌هاحایز اهمیت است [۴۹].

مطالعات انجام شده در ارتباط انجماد تخمدان

انجماد بافت تخمدان انسان

-در سال ۱۹۹۵، تحقیقی بر روی انجماد بافت تخمدان انسان توسط Zhang و همکارانش انجام شد. در این تحقیق،بافت تخمدان جنین انسان به روش انجماد فوق سریع و با بکارگیری ضدیخ دی متیل سولفوکسید با غلظت‌های ۲ و ۴ مول‌منجمد شد و در مراحل بعدی میزان رشد و بلوغ فولیکول‌های آن مورد بررسی قرار گرفت .در این مطالعه ثابت شد که‌می‌توان بافت تخمدان جنین را در محیط کشت و به مدت کمتر از ۶۵ روز نگهداری کرد و در حضور هورمون LH قادر به رشد و بلوغ است، همچنین نشان داد که انجماد و ذوب فوق سریع نمی‌تواند اثر مهمی بر روی ساختار و عملکردبافت تخمدان داشته باشد [۱۳].

- Hovatta و همکارانش در سال ۱۹۹۶، بر روی انجماد قطعاتی از قشر تخمدان ۱۹ زن با سنین ۴۴-۱۹ سال‌تحقیقی انجام دادند. آنها بافت تخمدان را با بکارگیری دو ضدیخ، انجماد آهسته نمودند. ۵ تا ۲۴ هفته پس از انجماد،بافت‌ها را ذوب نموده و از نظر مرفولوژی مورد بررسی قرار داده و نتیجه گرفتند که انجماد آهسته بافت تخمدان انسان با استفاده از دو ضد یخ دی متیل سولفوکسید و پروپاندیول روش مؤثری برای حفظ فولیکول‌ها است [۲۲].

- در سال ۱۹۹۷ تحقیق دیگری توسط همین محقق و همکارانش جهت بهبود بخشیدن به روش نگهداری‌فولیکول‌های بدوی و اولیه در تخمدان‌های منجمد شده‌ی انسانی و نمونه‌های منجمد نشده در محیط کشت به مدت‌طولانی انجام گرفت. نتایج بدست آمده حاکی ازآن بود که دو سوم از فولیکول‌های بافت تخمدان منجمد شده، بعد ازگذشت ۱۰ الی ۱۵ روز، هنوز قدرت حیاتی خود را در محیط کشت حفظ کرده بودند بنابراین کشت فولیکول‌های بدوی و اولیه انسان در محیط کشت ممکن بوده و فولیکول‌ها در بافت منجمد شده قدرت حیاتی خود را حفظ می‌کنند [۲۳].

-در سال ۱۹۹۶ توسط Newton و همکارانش تحقیقی بر روی نگهداری و سپس پیوند بافت تخمدان انسان دردرجه حرارت پایین انجام گرفت .تخمدان‌ها با استفاده از روش انجماد آهسته و بکارگیری ضدیخ‌های دی متیل‌سولفوکسید، اتیلن گلیکول، گلیسرول و پروپیلن گلیکول منجمد و ذوب شده و پس از پیوند نتایج بدست آمده حاکی ازآن بود که فراوانی فولیکول‌ها با درجه تکاملی بیشتر، زیاد نبوده در حالیکه فولیکول‌های بدوی با

Archive of SID

www.SID.ir

تخمک نرمال درسرتاسر استروما دیده شدند .تخمدان‌های منجمد شده با ضدیخ‌های دی متیل سولفوکسید، اتیلن گلیکول و پروپیلن‌گلیکول در مقایسه با گروههایی که از ضد یخ گلیسرول استفاده شده بود، حاوی تعداد بیشتری فولیکول بودند .بعد ازپیوند ایزوگرافت تخمدان‌های منجمد شده به حیوانات میزبان، فولیکول‌ها رشد و باروری خود را از سر گرفتند[۵۰].

-در سال ۱۹۹٦ توسط Bahadur و همکارانش گزارشی در رابطه با انجماد آهسته بافت تخمدان برای استفاده دربیمارانی که تحت درمان شیمیوتراپی یا رادیوتراپی قرار می‌گیرند به چاپ رسید و به کاربردهای کلینیکی بافت‌تخمدان منجمد شده اشاره شد [۵۱].

-در سال ۱۹۹۷ Wood و همکارانش، بافت تخمدان منجمد شده انسان را به زیر کپسول کلیه موش با ضعف ایمنی‌پیوند کرده و به دنبال آن رشد فولیکول‌های نرمال را در موش مشاهده کردند. پس از گذشت یک ماه از پیوند قطعه‌کوچک بافت تخمدان منجمد و ذوب شده انسان به موش، بافت شامل فولیکول‌های متعددی بوده که درمراحل مختلف رشد فولیکولی قرار داشتند. افزایش قطر فولیکول‌ها از ۳۷ mm با چند سلول گرانولوزا تا ۸۵mm، با یک‌یا دو لایه کامل از سلول‌های گرانولوزا مشاهده شد[۵۲].

ـ در سال ۱۹۹۷ تحقیقی توسط Oktay و همکارانش بر روی ویژگیهای فولیکول بدوی در تخمدان‌های منجمدشده و منجمد نشده انسان انجام گرفت. با مطالعات انجام شده توسط میکروسکوپ الکترونی مشخص شد که انجماد، تأثیر منفی بر فراساختار سلول‌ها نداشته است و فولیکول‌های بدوی می‌توانند با درجات بالایی از قدرت باروری از بافت تخمدان‌منجمد شده انسان جدا شوند[۵۳]. در همین سال Nugent و همکارانش، ضمن تحقیقی ثابت کردند که سلول‌های‌جنسی را می‌توان به صورت منجمد در بافت تخمدان نگهداری کرد به گونه‌ای که پس از پیوند، قدرت باروری خود راحفظ کنند[۵٤].

-در سال ۱۹۹۸، تحقیقی توسط Newton و همکارانش در رابطه با نفوذ عوامل ضدیخ مختلف به بافت تخمدان انسان، طی فرآیند انجماد آهسته صورت گرفت. در این تحقیق میزان نفوذ و تأثیر غلظت ضدیخ‌های پروپیلن گلیکول،گلیسرول، اتیلن گلیکول و دی‌متیل سولفوکسید مورد بررسی قرار گرفت .در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ پروپیلن گلیکول و گلیسرول‌در مقایسه با اتیلن گلیکول و یا دی‌متیل سولفوکسید، آهسته‌تر به داخل بافت نفوذ می‌کنند، در صورتی‌که در دمای بیشتراز ۳۷ $^{\circ}C$ ، تمام چهار ضدیخ نام برده شده، سریع به بافت نفوذ می‌کنند.نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که‌بهترین روش انجماد بافت تخمدان، آب‌گیری آن به مدت ۳۰ دقیقه با محلول ۱/۵ مول اتیلن گلیکول یا ۱/۵ مول دی‌متیل سولفوکسید است .همچنین گزارش شد که افزودن مقادیر کمی از ساکارز به محیط انجمادی، جهت حفاظت ازصدمات احتمالی ناشی از انجماد تأثیر مهمی نخواهد داشت [۵۵].

- در سال ۱۹۹۸ توسط Donnez و همکارانش تحقیقی مبنی بر انجماد بافت تخمدان در زنانی که تحت شیمی‌درمانی یا رادیودرمانی قرار می‌گیرند انجام گرفت. در این تحقیق به تعداد زیاد فولیکول‌های بدوی در تخمدان اشاره‌شد که هنوز وارد مرحله متافاز دوم از تقسیم میوز نشده‌اند (به علت حساسیت دوک تقسیم نسبت به انجماد) بنابراین،کمتر تحت تأثیرات مخرب انجماد قرار می‌گیرند و در این رابطه نتایج رضایت‌آمیزی حاصل شد .همچنین در این‌تحقیق به اهمیت سن بیمار اشاره می‌شود به طوری‌که در افرادی با سن بیشتر از ۳۸ سال، شانس موفقیت کمتر می‌باشد[۵٦].

-در سال ۱۹۹۹ تحقیقی توسط Rutherford و همکارانش بر روی انجماد آهسته بافت تخمدان انسان انجام شد. بافت قشری تخمدان در زنان جوان دارای تعداد زیادی فولیکول‌های بدوی می‌باشد که این بافت پس از پیوند به بدن‌میزبان می‌تواند باروری نرمالی را باعث شود. قطعاتی به ابعاد ٤ mm در طی بیوپسی از قشر تخمدان زنانی با سن‌تقریبی ۳۰ سال تهیه شد که هر بیوپسی تقریباً شامل ۱۰ تا ۳۰۰ عدد فولیکول در مراحل مختلف از رشد می‌باشد. تعدادی از این فولیکول‌ها در طی انجماد و ذوب و پیوند از بین می‌روندکه تقریباً یک سوم فولیکول‌ها در روند پیوند هتروتوپیک حفاظت شدند. نتایج بدست آمده حاکی از موفقیت این روش جهت حفظ قابلیت نگهداری و باروری‌نرمال خصوصاً در زنان جوانتر می‌باشد [۵۷].

Archive of SID

www.SID.ir

-در سال ۲۰۰۰ توسط Gosden تحقیقی بر روی انجماد و پیوند بافت تخمدان انسان با روش انجماد آهسته و بابکارگیری محلولهای ضدیخ دی متیل سولفوکسید، اتیلن گلیکول، پروپیلن گلیکول و گلیسرول انجام گرفت .قطعاتی ازبافت منجمد شده، در زیر کپسول کلیه، در موشهایی که سیستم ایمنی تضعیف شده داشتند، پیوند شد. سه هفته بعداز پیوند تعداد زیادی از فولیکولها زنده بودند. سپس به زنان داوطلب، قطعات کوچکی از بافت تخمدان به قسمت‌قدامی تخمدان اوتوگرافت شد. پس از ۳ الی ٤ ماه، فولیکولها در مراحل مختلف رشد دیده شدند، اما جمعیت آنها حدوداً به یک چهارم اولیه کاهش یافته بود. در تکرار آزمایش با پیوند گزنوگرافت در انسان یا ایزوگرافت به جوندگان نیز نتایج‌خوبی بدست آمد[۱۱].

-در سال ۲۰۰۰ توسط Nisolle تحقیقی بر روی اولترا استرکچر و هسیتولوژی پیوند تخمدانهای منجمد و ذوب‌شده و تخمدان‌های منجمد نشده انسان به روش گزنوگرافت صورت گرفت. در این تحقیق از دی متیل سولفوکسید۱۰ درصد و متد انجماد آهسته استفاده شد. پس از پیوند بافت منجمد و ذوب‌شده، در مقایسه با بافت منجمد نشده‌پدیده فیبروز بافتی بیشتر مشاهده شد. ٢٤ روز بعد از پیوند جمعیت فولیکولی مشابهی در بافت تخمدان منجمد وذوب شده در مقایسه با بافت منجمد نشده دیده شد. همچنین ویژگیهای اولتراساترکچر دو گروه مشابه بود. در بعضی‌موارد، فولیکولهایی با ظاهر دژنره شده، مشاهده شد .پیوند گزنوگرافت تخمدان به موشهایی با ضعف ایمنی می‌تواند مدل مفیدی برای بررسی قدرت حیاتی و رشد فولیکولها باشد. در این مطالعه مشخص شد که تعداد فولیکولها دربافت منجمد شده نسبت به بافت منجمد نشده کمتر بود. نتایج نشان داد که انجماد به تنهایی در کاهش فولیکولهاموثر نمی‌باشد و نحوه خون رسانی پیوند می‌تواند اهمیت زیادی داشته باشد. با وجود این حتی اگر کاهشی در تعدادفولیکولها مشاهده شود، فولیکولهای باقیمانده فنوتیپ طبیعی را از خود نشان می‌دهند.

در این تحقیق رشد فولیکولهای بدوی تا مرحله آنترال در بافت تخمدان انسانی که به بدن موش با سیستم ایمنی‌تضعیف شده پیوند گزنوگرافت شده بود، گزارش شد[۲۸].

- در سال ۲۰۰۰، تحقیقی توسط Picton و همکارانش بر روی رشد فولیکولهای بدوی موجود در تخمدان‌های‌منجمد و کشت‌شده در محیط کشت انجام گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که رشد فولیکولهای بدوی تامرحله فولیکول گراف به خوبی انجام‌پذیر است[۱۲].

در تحقیقی که توسط Nisolle در سال ۲۰۰۰ انجام گرفت، بیوپسی از تخمدان‌های طبیعی انسان به وسیلهTEM وSEM بررسی شد که در نتیجه فولیکولهایی با قطر کوچک مشاهده شده و فولیکولهای بدوی، اولیه و ثانویه‌خصوصیات طبیعی خود را نشان می‌دادند. معمولاً ساختمان تخمک و سلولهای فولیکولی به خوبی حفظ شده،اگرچه در بعضی موارد، مراحل اولیه‌ی دژنره‌شدن فولیکولها، شامل واکوئله شدن تخمک مشاهده می‌شد .در بیوپسی‌تخمدان‌های منجمد - ذوب شده انسان، فولیکولها مراحل رشدی مشابه با بافت منجمد نشده از خود نشان داده ودر بعضی موارد به نظر می‌رسید که آنها دژنره شده باشند و واکوئل‌های زیادی هم در تخمک و هم در اجزای سلولهای فولیکولر دیده می‌شد، اگرچه در موارد دیگر فولیکولها به خوبی ساختمانهای نرمالی را از خود نشان دادند[۲۸،۵۸].

در سال ۲۰۰۱ گزارشاتی توسط Oktay و همکارانش منتشر شد. آنان نشان دادند که پس از پیوند تخمدان منجمد شده‌در پریتونئوم و در جایگاه تخمدان، عملکرد تخمدان می‌تواند حفظ شود و بعد از گذشت ٤ ماه در پاسخ به تحریکات هورمونی با HMG بیماران تخمک گذاری کردند[۵۹]. Kim و همکارانش نشان دادند که خطر اصلی پیوند در افرادمبتلا به سرطان، انتقال سلولهای بدخیم است و حفظ پیوند از خطرات ایسکمی و انتشار دوباره مواد غذایی از اهمیت‌خاصی برخوردار است[۲۷،۶۰].

تخمدان موش و رت

-انجماد بافت تخمدان برای اولین بار در دهه ۱۹۵۰ توسط Deanselyو همکارانش مطرح شد. پس از پیوند تخمدان‌جنینی منجمد شده به موش، فولیکولها در تمامی مراحل رشد مشاهده شدند[۸].

Archive of SID
www.SID.ir

_در سال ۱۹۶۰، Parrot اولین گزارش در خصوص تولد نوزاد موش حاصل از پیوند بافت تخمدان منجمد شده رامنتشر کرد. در این تحقیق از گلیسرول به عنوان ضدیخ در روش انجماد آهسته استفاده شد که فقط ۲۰٪ از جمعیت‌فولیکول‌ها پس از پیوند اورتوتوپیک باقی مانده و بارور شدند [۹].

-در سال ۱۹۷۶ توسط Chihal و همکارانش تحقیقی روی تأثیر انجماد آهسته تخمدان بر روی قدرت‌تخمک‌گذاری و تولید هورمونهای استروئید در پیوند اتوگرافت تخمدان رت انجام شد. تخمدان منجمد-ذوب شده به طریقه‌ی زیر جلدی پیوند شد. در مقایسه با پیوند تخمدان منجمد نشده (کنترل)، اختلاف معنی‌داری مشاهده‌نشد [۶۱].

-در سال ۱۹۹۶ Cox و همکارانش، انتقال بافت تخمدان منجمدشده جنینی را به گیرنده‌های موش بالغ موردبررسی قرار دادند. تخمدان‌های جنین ۱۶ روزه‌ی موش به روش انجماد آهسته و با کمک ۱/۵ مول ضدیخ دی متیل‌سولفوکسید منجمد شدند. ٤ هفته بعد از پیوند تخمدان‌ها به محل‌های هتروتوپیک و ٦ هفته بعد از پیوند به محلهای‌اورتوتوپیک، رشد فولیکول‌ها و جسم زرد قابل مشاهده بود .در پیوند اورتوتوپیک به میزان ۳۳٪ حاملگی مشاهده شد. در روش ذوب سریع ۸٦٪ و در ذوب آهسته‌ی تخمدان‌ها ۲۵٪ پس از پیوند، باروری مشاهده شد. آنان چنین‌نتیجه گرفتند که پیوند بافت تخمدان جنینی منجمد شده به میزبان بالغ، موفقیت‌آمیز بوده و باعث باروری آنها می‌شود [۶۲].

-در سال ۱۹۹٦، تحقیقی توسط Shaw و همکارانش بر روی پیوند بافت تخمدان منجمد شده فرد دارنده‌ی لنفوما به موش انجام شد .آنان از روش انجماد آهسته و ضدیخ‌های دی‌متیل‌سولفوکسید، پروپاندیول، اتیلن گلیکول وگلیسرول استفاده کردند. در این تحقیق نتیجه‌گیری شد که بیماری قادر است از طریق پیوند به میزبان منتقل شود، زیراپس از گذشت تقریباً ٤۳ روز، منجر به مرگ میزبان شد [۶۳].

-در سال ۱۹۹۷، تحقیقی توسط Candy و همکارانش، در رابطه با اثرات غلظت ۱/۵ مول ضدیخ‌های دی متیل‌سولفوکسید، ۱و۲ پروپاندیول، اتاندیول و گلیسرول بر روی حفظ فولیکول‌ها در تخمدان‌های منجمد شده موش ۱۰روزه، به روش انجماد آهسته انجام شد .بیش از ٤۹٪ فولیکول‌های اولیه در طی انجماد حفظ شدند. هیچ اختلاف‌معنی‌داری در پیوندهای تخمدان‌های منجمد نشده (۹۲٪) و منجمد شده (۹۰٪) از نظر میزان زنده ماندن فولیکول‌هامشاهده نشد [۳۱].

_در سال ۱۹۹۷ توسط Gunasena و همکارانش، تحقیقی بر روی انتقال آلوژنیک و گزنوژنیک بافت منجمد شده تخمدان موش فاقد تیموس (Athymic) انجام شد. موفقیت در پیوند گزنوژنیک به موش با ضعف ایمنی، نشانگر حفظ قدرت‌باروری بافت تخمدان منجمد شده می‌باشد، همچنین کارایی بافت تخمدان منجمد شده برای مدت بیشتر از ٤ ماه به‌وسیله بررسی سیتولوژی واژن مشخص شد .در این تحقیق اولین گزارش از تولد منتج از بافت تخمدان منجمد شده وپیوند آلوژنیک آن به موش ارایه شد. حدوداً ۱۰ روز بعد از پیوند سیکل اوستروس از سرگرفته شد .در مطالعات قبلی‌نیز پیوند آلوژنیک بافت تخمدان منجمد شده به نژادهای دیگر موش اعلام شده بود و حتی در بعضی از مواردحاملگی گزارش شده است [۳۰].

-در تحقیق دیگری با پیوند سینژنیک (Syngeneic) تخمدان به بورسای تخمدانی در میزبانهایی که قبلا تخمدان‌هایشان برداشته‌شده بود، تخمک‌گذاری بالایی دیده شده و روند تولید جنین بهبود یافته بود [٦٤].

-در سال ۲۰۰۰ تحقیقی توسط Shaw و همکارانش بر روی عملکرد دراز مدت پیوندهای تخمدان منجمد شده‌در موش انجام گرفت. در تمام میزبانهایی که پیوند تخمدان جنینی منجمد نشده یا منجمد شده دریافت کرده بودند، فعالیت اوستروس مشاهده شد .بعد از گذشت ۵۲ هفته، از تعداد ۷ میزبان که پیوند تازه دریافت کرده بودند، تنها در ۳مورد از آنها قدرت باروری مشاهده شد که در مقایسه با گروه پیوند تخمدان منجمد شده یک مورد کمتر بود. تمام‌نوزادان، زنده و با ظاهری نرمال بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که پیوند تخمدان‌های منجمد شده به میزبان‌هایی که قبلاً تخمدانشان خارج شده، امکان‌پذیر می‌باشد به طوری‌که تخمدان در پایان یکسال پس از پیوند هنوز حاوی‌فولیکول‌هایی است که قادر به رشد و تولید تخمک می‌باشند [۵].

Archive of SID
www.SID.ir

-در سال ۲۰۰۰ توسط Candy و همکارانش تحقیقی در خصوص بررسی میزان باروری تخمدان‌های منجمد شده‌موش پس از پیوند اورتوتوپیک انجام دادند. در این روش تخمدان‌ها از موشهای ۱۰ روزه حاصل شد و بعد به طریق انجماد آهسته، منجمد و ذوب شدند. بعداً تخمدان‌ها به موشهایی که تخمدانشان خارج شده بود (نژاد B6CBF1)پیوند اورتوتوپیک شد و پس از جفت‌گیری تولد نوزادان بررسی شد. نتایج نشان داد که انجماد نمی‌تواند قدرت‌باروری دراز مدت تخمدان را تحت تأثیر قرار دهد و تخمدان‌های منجمد شده توانایی ذخیره سلول‌های ژرمینال یاتخمک را خواهند داشت [۶۵].

-Sugimoto و همکارانش در گزارش سال ۲۰۰۰ خود نشان دادند که با انجماد تخمدان رات‌های نابالغ با استفاده ازمحلول VS1و پیوند آن‌ها به زیر کپسول کلیه همان رات‌ها پس از گذشت ۸۴ روز، تعداد فولیکول‌های آنترال درتخمدان‌های منجمد و پیوند شده در مقایسه با تخمدان‌های تازه پیوند شده کمتر شده ولی با این حال فعالیت اندوکرین‌تخمدان‌های منجمدشده و پیوند شده مشابه با گروه کنترل بوده است [۶۶].

-Kagabuو همکارانش در گزارش سال ۲۰۰۰ خود نیز با بکارگیری همان ضد یخ مقایسه‌ای را بین گونه‌های موش،هامستر، خرگوش، میمون و رات انجام داد[۶۷]. او پس از انجماد و ذوب، تخمدان‌ها را به حفره‌ی رحمی رت‌های‌حامله کاذب منتقل ساخت تا میزان زنده ماندن را پس از گذشت ۷ روز بررسی کند .وی در یافته‌های خود نشان داد که‌روش انجماد شیشه‌ای می‌تواند روش خوبی از جهت حفظ مرفولوژی فولیکول‌های تخمدان باشد و اثر توکسیک برآنها ندارد.

- Salehnia و همکارانش تحقیقی در مورد انجماد شیشه‌ای تخمدان موش سوری با محلول انجمادی انجام دادند ونشان دادند که تغییرات مرفولوژیک [۶۸] و اولتراساختاری خاصی پس از انجماد و ذوب دیده نشد[۶۹،۷۰].

- Kim و همکارانش با انجماد تخمدان سه خانم و پیوند آنها در بدن موش با نقص سیستم ایمنی و تحریک آنها و با بکارگیری PMSG به مدت ٤ هفته و بعد از آن HCG میزان رشد فولیکولها را بین ۱۰۰-۳۳ درصد و تشکیل جسم زرد را بین ۵۰-۲۸ درصد مشاهده کردند [۷۱].

انجماد بافت تخمدان گوسفند

-در سال ۱۹۹٤ محققی بنام Gosden ، گزارش موفقیت‌آمیزی از انتقال اتولوگوس بافت تخمدان منجمد شده گوسفند به روش انجماد آهسته که سبب بهبود سیکل اوستروس و تولد نوزادان زنده شد را منتشر کرد[۱۰].

- در سال ۱۹۹۹، تحقیقی توسط Salle و همکارانش بر روی ترشح استروئیدهای تخمدان و بررسیهای‌هیستولوژیکی بعد از انجماد و ذوب و پیوند اتوگرافت در تخمدان گوسفند با استفاده از غلظت ۱۰٪ ضدیخ دی متیل‌سولفوکسید، طی انجماد آهسته انجام شد. تخمدان‌های منجمد -ذوب شده حاوی فولیکول‌های متعددی در مراحل‌مختلف بدوی، اولیه، ثانویه و آنترال بودند[۲۶]. نتایج بدست آمده تأییدی بر کار Gosden بود و رشد مجدد فولیکول‌ها را به اثبات رسانید[۱۰].

- در سال ۱۹۹۹ تحقیقی توسط Baird بر روی عملکرد درازمدت تخمدان منجمد شده گوسفند در طی پیونداتوگرافت به عمل آمد. بعد از گذشت ۲۲ ماه از پیوند بافت منجمد شده و یا اتوپسی به عمل آمده، مشخص شد که‌تمام تخمدان‌های پیوند شده به بدن گوسفند، دارای فولیکول‌های آنترال بزرگ و یا کیست بودند اما تعداد فولیکول بدوی آن‌ها کم بود (تقریباً۲۸٪)، نتایج بدست آمده ثابت می‌کند که علی‌رغم کاهش مؤثر در تعداد کل فولیکول‌های بدوی عملکرد سیکلی تخمدان در گوسفند در پیوند اتوگرافت حفظ شده است [۷۲]. بکارگیری انجماد شیشه‌ای با استفاده از ضد یخ اتیلن گلیکول و گلیسرول برای حفظ تخمدان گوسفند مطرح شده است [۷۳].

- Demirci و همکارانش در گزارش سال ۲۰۰۲ خود نشان دادند که پروسه انجماد و ذوب بر فرگمنتاسیونDNA تخمکهای موجود در فولیکول اولیه و بدوی تخمدان گوسفند تأثیر ندارد [۷٤].

- Al-aghbariو همکارانش در گزارش سال ۲۰۰۲ خود استفاده از انجماد شیشه‌ای با بکارگیری مخلوطی از اتیلن گلیکول۳۵٪ را برای تخمدان گوسفند مطرح کردند و پس از کشت فولیکولهای ایزوله شده نشان دادند که تفاوت معنی داری بین گروه انجمادی

Archive of SID
www.SID.ir

و غیر انجمادی از نظربلوغ در محیط کشت وجود ندارد [۷۵].

انجماد بافت تخمدان مارموست

-در سال ۱۹۹۵ توسط Candy تحقیقی بر روی رشد فولیکولی در بافت تخمدان منجمد شده مارموست بعد ازپیوند انجام گرفت. در این مطالعه قطعاتی از تخمدان با روش انجماد آهسته و بکارگیری غلظت ۱/۵مول ضدیخ دی‌متیل سولفوکسید منجمد شد .نتایج به دست آمده بیانگر آن است که فولیکول‌ها در تمام مراحل فولیکوژنزیس تا مرحله‌آنترال کوچک، در بافت منجمد شده حفظ شده و دیده شدند .بافت‌های تخمدان منجمد شده و نشده به زیر کپسول‌کلیه موش با ضعف ایمنی پیوند زده شدند. فعالیت استروژنیک (شاخی شدن اپیتلیوم واژن) در گروههای پیوندی‌منجمد نشده (کنترل) مشاهده شد [۱۸].

انجماد بافت تخمدان گوساله

-در سال ۱۹۹۹ توسط Paynter و همکارانش تحقیقی بر روی انجماد بافت تخمدان گوساله انجام گرفت. در این‌تحقیق تخمدان به روش انجماد آهسته و با استفاده از ضدیخ دی‌متیل‌سولفوکسید منجمد شد. در زمانهای ۰، ۱، ۲٤،٤ یا ٤۸ ساعت از کشت بافت درIn vitro ، تأثیرات انجماد یا در معرض قرار گرفتن با ضد یخ مورد بررسی قرار گرفت. تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه درون بافت‌هایی که در معرض ضدیخ قرار گرفته بودند به طور چشمگیری پس ازانجماد کاهش یافته بود، ۲٤ یا ٤۸ ساعت پس از کشت، درصدی از مورفولوژی نرمال بافت کاهش یافته بود. پس ازگذشت زمانهای متفاوت در محیط کشت هیچ اختلاف معنی‌داری از نظر درصد نرمالیتی در بافت کنترل و بافتی که فقط در معرض ضدیخ قرار گرفته بود، مشاهده نشد [۷٦].

انجماد بافت تخمدان فیل

-در سال ۱۹۹۸ تحقیقی توسط گروهی از محققین بر روی پیوند گزنوگرافت بافت تخمدان منجمد شده فیل آفریقایی انجام شد. در بررسی هیستولوژیکی ثابت شد که فولیکول‌ها تا مرحله آنترال رشد خوبی نشان داده‌اند، اگرچه تخمکها ظاهر مرفولوژیکی مناسبی نداشتند یا فقط در بعضی موارد کمپلکس‌های شبه کومولوس مشاهده شد [٦۱].

Archive of SID

References

1-Aubard Y., Plver P., Cogni Y., Fermeaux V., Poulin N. and Driancort M.A. ***Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep.*** Hum. Reprod. 1999, 8: 2149-2154.

2- Brison D.R., ***Fertility preservation in cancer patients.*** Hum. Fertil, 2002, 5(3): 99-101.

3- Lee D., Ouhibi N, Battaglia D. ***Cryopreservation of ovarian tissue: Banking reproductive potential for the future.*** Curr. Womens Health Rep, 2001, 1(2): 152-6,.

4- Shaw J.M., Trounson A.D. ***Ovarian tissue transplantation and cryopreservation. Application to maintenance and recovery of transgenic and inbred mouse lines.*** Methods Mol. Biol, 2002, 180: 229-51.

5- Shaw I.M., Cox S.L., Trounson A.O. and JenkinG. ***Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications.*** Molecular and Cellular Endocrinology, 2000, 161:103-110.

www.SID.ir

6- Gosden R.G. ***Gonadal tissue cryopreservation and transplantation.*** Reprod. Biomed. Online. 2002, 4(1): 64-67,

7- Out H.J., Mannaerts B.M., Driessen S.G. and Coelingh H.J. ***A prospective, randomised, assessor-blind, multicenter study comparing recombinant and urinary follicle stimulating hormone in vitro fertilisation.*** Hum.Reprod., 1995, 10: 2534-2540.

8- Deanesly R. ***Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing.*** J. Endocrinol. 1954, 11: 197-200.

9- Parrott D.M.V. ***The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue.*** J. Reprod. Fertil 1960, 1: 230-241.

10- Gosden R.G.,Baird D.T., Wade J.C. and Webb R: ***Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196³c.*** Hum. Reprod., 1994, 9: 597-603.

11- Gosden R.G. ***Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue.*** Molecular and Cellular Endocrinology, 2000, 163: 125-126-9.

12- Picton H.M. and Gosden R.G. ***In vitro growth of human primordial follicles from frozen-banked ovarian tissue.*** Molecular and Cellular Endocrinology, 2000, 166: 27-35.

13- Zhang J. and Dlmattina M. ***Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ovary.*** J. Assist. Reprod. Genet, 1995, 912: 361-368.

14- Whittingham D.G., Lebio S.P. and Mazur P. ***Survival of mouse embryos frozen to –196 ºC and 269ºC.*** Science, 1972, 178: 411.

15- Wininger J.D., Kort H.I. ***Cryopreservation of immature and mature human oocytes.*** Semin. Reprod. Med. 2002, 20(1): 45-49.

16- Rall W.F. and Fahy G.M. Ice-free cryopreservation of mouse ***embryos at -196ºC by vitrification.*** Nature, 1985, 314: 573-575.

17-Isachenko V.,Isachenko E.,Rahimi G., Krivokharchenk A., Alabart J.L., Naworth F. ***Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen negative effect of disacharides in vitrification solution.*** Cryo, Letters, 2002: 23(5): 333-44.

18- Paynter S., Cooper A., Fuller B. and Show R. ***Cryopreservation of bovine ovarian tissue: Structural normality of follicles after thawing and culture in vitro.*** Cryobiology, 1999, 38: 301-309.

19- Gosden R., Boulton M., Grant K. and Webb R. ***Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice.*** J. Reprod. Fertil., 1994, 104: 619-623.

20- Carroll J., Whittingham D., Wood M., Telfer E. and Gosden R. ***Extraovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles.*** Journal Reproduction Fertility, 1990, 90: 321-327.

21-Candy C.J.,Wood M.and Whittingham D. ***Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation.*** Medical Research Council Experimental Embryology and Teratology Unit. 1995: 2334-2338.

22- Hovatta O., Silye R., Krausz T. and Winston R. ***Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-***

Archive of SID

www.SID.ir

sucrose as cryoprotectants. Human Reproduction, 1996, 11: 1268-1272.

23- Hovatta O., Silye R., Abir R., Krausz T and Winston R. ***Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture.*** Hum. Reprod., 1997, 12:1032-1036.

24- Harlow C., Show H., Hillier S. and Hodges J. ***Factors influencing follicle-stimulating hormone-responsive steroidogenesis in marmoset granulosa cells: Effects of androgens and the stage of follicular maturity.*** Endocrinology, 1988,122: 2780-2787.

25- Tsafriri A. and Braw R. ***Experimental approaches to atresia in mammals.*** In Clarke J.R., 1984, 6: 226-265,.

26-Salle B., Jacqueline L., Banu D. and Fabien V. ***Restoration of ovarian steroid secretion and histologic assessment after freezing, thawing, and autograft of a hemi-ovary in sheep.*** Fertility and Sterility, 1999, 72: 366-370.

27- Kim S.S., Battaglia E., Soules R. ***The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: Fertility and beyond.*** Fertil. Steril. 2001, 75: 1049-1056.

28- Nisolle M., Roux F., Qu J.,Motta P.and Donnez J. ***Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mine.*** Fertility and Sterility, 2000, 74: 122-129.

29- Oktay K., Karlikaya G., Aydin A. ***Ovarian cryopreservation and transplantation: Basic aspects.*** MCE, 2000, 169: 105-108.

30- Gunasena K., Lakey J., Villines P. and Critser E. ***Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice.*** Biology of Reproduction, 1997, 57: 226-231.

31- Candy C.J., Wood M. and Whittingham D. ***Effect of cryoprotectants on the survial of follicles in frozen mouse ovaries.*** J. Reprod. Fertil. , 1997, 110: 11-19.

32- Sztein J, Sweet H., Farley J. ***Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: Newapproch in gamete banking.*** Biol. Reprod. 1998, 58: 1071-1074.

33- Van Den Broecke R., Liu J., Van Der Elst J., Dhont M. ***Timing of FSH-stimulation and follicular development in cryopreserved human ovarian grafts.*** Repord Biomed Online, 2002, 4(1): 21-6,.

34- Salehnia M. ***Autograft of vitrified mouse ovaries using ethylene glycol as cryoprotectant.*** Exp. Anim, 2002, 5(5):509-512.

35- Patino R., Yoshizaki G., Thomas P., Kagawa H. ***Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: The two-stage concept and its mechanisms.*** Comp. Biochem. Physiol. Part B, 2001: 129: 427-439.

36- Gook D.A., McCully B.A., Edgar D.H. and McBain J.C. ***Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting.*** Hum. Reprod, 2001, 16: 417-422.

37- Salehnia M., Moazzeni S.M. ***Human monoposal gonadotropin stimulation of follicles in grafted vitrifiedmouse ovaries.*** Daneshvar (Farsi) 2002, 38: 25-32.

Archive of SID

www.SID.ir

38- O'shaughnessy P.J., Mc Lelland D. and Mc Bride N.W. ***Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary.*** Biol. Reprod 1997, 57: 602-608.

39- Newton H. and Lilingworth P. ***In-vitro growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue.*** Hum. Reprod, 2001, 16: 423-429.

40- Weissman A., Gotlieb L., Colgan T., Jurisicova A. and Groonblan E. ***Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex tranplantation in the NOD-SCID mouse.*** Biol. Reprod., 1999, 60: 1462-1467.

41- Wang H.,Mooney S.,Wen Y.,Behr B.,Polan M.L., ***Follicle development in grafted mouse ovaries after cryopreservation and subcutaneous transplantation.*** Am. J. Obstet. Gynecol, 2002, 187(2): 370-374.

42- Dhali A.and Manik R.S. ***Post- vitrification survival and in vitro maturation rate of buffalo oocytes: Ethylene glycol concentration and exposure time.*** Animal Reproduction Science, 2000, 63: 159-165.

43- Thibault J. Kopecny V., Dvorak M., Pilka L., Kurilo L.F. ***Human non ovulatory cumulus oocyte complexes: Ultrastructural macromolecular synthesis and developmental potential.*** Gamete Res. 1984, 9: 153-165.

44- Smithz J.E., Cortrindt R.G. ***The earliest stages of folliculogenesis in vitro.*** Reprod, 2002 123: 185-202.

45- Trounson A., Anderiesz C. Jones G.M. Kausche A., Lolatgis N., Wood C. ***Oocyte maturation.*** Hum.Repeod. 1998, 13: 52-62.

46- Depalo R., Loverro G., Selvaggi L. ***In vitro maturation of primordial folicles after cryopreservation of human ovarian tissue: Problems remain.*** Med. Pediatr. Oncol. 2002, 38(3): 153-7.

47- Calarco P.G., Donahue R.P., Szollosi D. ***Germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte.*** J. Cell. Sci. 1972, 10: 369-385.

48- Kruip T.A.M., Cran D.G., Beneden T.H. Dieleman S.J. ***Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo.*** Gamete Res, 1983: 8; 29-47.

49- Piction H.M. ***Oocyte maturation in vitro.*** Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 2002, 14(3): 295-302.

50- Newton H., Aubard Y., Rutherford A., Sharma V. and Gosden R. ***Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue.*** Human Reproduction, 1996,11: 1487-1491.

51- Bahadur G., Steele S.J., ***Ovarian tissue cryopreservation for patients.*** Hum. Reprod., 1996, 11: 2215-2216.

52- Wood C., Show J. and Trounson A. ***Cryopreservation of ovarian tissue,*** M.J.A. 1997: 166: 366-369.

53- Oktay K., Nugent D., Newton H., Salha O., Chatterjee P. and Gosden R. ***Isolation and characterization of primoadial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue.*** Fertil. Steril., 1997, 67: 481-486.

Archive of SID

www.SID.ir

54- Nugent D., Meirow D., Brook P., Aubard Y. and Gosden R. ***Transplantation in reproductive medicine: Previous experience, present knowledge and future prospects.*** Hum. Reprod., 1997, 3: 267-280.

55- Newton H., Fisher J., Arnold J., Pegg D., Faddy M. and Gosden R. ***Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation.*** Hum. Reprod., 1998, 13: 376-380.

56- Donnez J. and Bassil S. ***Indications for cryopreservation of ovarian tissue.*** Hum. Reprod., 1998, 4: 248-259.

57- Rutherford A., Gosden R.G. ***Ovarian tissue cryopreservation: A practical option?*** Acta Paediater., 1999, 433: 13-8.

58- QU, Nisolle M., Dennez J. ***Expression of transforming growth facter-alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptorin follicles of human ovarian tissue beforeand after cryopreservation.*** Fertil.Steril. 2000, 74(1): 113-21.

59- Oktay K. Aydin B., Karlikaya G. ***A technique for laparascopic transplantation of frozen-banked ovarian tissue.*** Fertil. Steril. 2001, 75: 1212-1216.

60- Kim S.S., Soules M., Gosden R.G., Battaglia D. ***The evidence of follicle maturation and subsequent ovulation in human ovarian tissue xenografted into sever combined immunodeficient (SCID) mice.*** Fertil.Steril. 2000 47(suppl): 534.

61- Chihal H.J., Stone S. and Peppler R. ***The effect of frozen ovarian autografts on compensatory ovulation and steroid production in unilaterally ovariectomized rats.*** Am. J.Anat.,1976,145:433-41.

62- Cox S.L., Show J. and Jenkin G. ***Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice.*** J. Reprod. Fertil., 1996, 107: 315-22.

63- Show M., Bowles J., Koopman P. and Wood E. ***Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients.*** Hum. Reprod., 1996, 11: 1668-1673.

64- Carroll J. and Gosden R.G. ***Transplantation of frozen- thawed mouse primordial follicles.*** Hum. Reprod., 1993, 8:1163-1167.

65- Candy C.J., Wood M. and Whittingham D. ***Restoration of a normal reproductive Lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries.*** Human Reproduction, 2000, 15: 1300-1304.

66- Sugimoto M. Maeda S., Manabe N. and Miyamoto H. ***Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. Theriogenol.*** 2000, 15(53): 1093-10103.

67- Kagabu S. and Umezu M. ***Transplantation of cryopreserved mouse, chinese hamster, rabbit, japanese monkey and rat ovaries into rat recipients.*** Exp. Anim. 2000, 49: 17-21.

68- Salehnia M., Moazzeni S.M. ***Histological study of the effect of vitrification using ethylene glycol as cryoprotectant on the mouse ovarian tissue.*** Middle East Fertil. Scoi. J, 2001: 6: 233-238.

69- Salehnia M., Abasian. E., Rezazadeh M. ***Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue.*** Fertil. Steril. 2002, 78: 644-645.

Archive of SID

www.SID.ir

70- ***Ultrastructure of Primary follicles after vitrification of mouse ovary***. Med. J. Yaghted (Farsi) 2001: 3(9): 7-14.

71- Kim S.S., Soules M.R. Battaglia D.E. ***Follicular development. Ovulation and corpus luteum formation incryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation.*** Fertil. Steril. 2002: 78(1): 77-82.

72- Baird D., Webb R., Campbell B., Harkness L. and Gosden R. ***Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196°C.*** Endocrinology, 1999,140: 462-471.

73- Leoni G.,Bogliob L.,Pintus D,ledda S., Naitana S. ***Sheep embryos derived from FSH/ECG treatment havea lower in vitro viability after vitrification than those devived from FSH treatment.*** Reprod. Nutr. Dev. 2001, 41(3):239-46.

74- Demirci B., Salle B., Frappart L., Franck M., Guerin 7.4., Lornage J. ***Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary folicles after freezing-thawing of ovarian cortex in sheep.*** Fertil. Steril. 2002, 77(3): 595-600.

75- Al-aghbari A.M., Menino A.R. ***Survival of oocytes recovered from vitrifeid sheep ovarian tissues.*** Anim.Repord. Sci, 2002.. 15; 71: 101-10.

76- Gunasena K., Lakey J., Villines P. and Critser J. ***Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant ovarian tissue.*** Anim. Reprod, 1998, 53: 265-275.

Archive of SID

www.SID.ir